



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Jessica de Andrade Moraes Teixeira

**Dieta materna hipersódica e alterações renais
na prole de camundongos**

Rio de Janeiro

2014

Jessica de Andrade Moraes Teixeira

**Dieta materna hipersódica e alterações renais
na prole de camundongos**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T266 Teixeira, Jessica de Andrade Moraes.
Dieta materna hiperssódica e alterações renais na prole de camundongos / Jessica de Andrade Moraes Teixeira. – 2014.
94 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Rins - Doenças - Aspectos nutricionais - Teses. 2. Cloreto de Sódio na Dieta - Efeitos adversos. 3. Nutrição materna. 4. Néfrons - Embriologia. 5. Sistema Renina-Angiotensina - Teses. 6. Genes do Tumor de Wilms - Fisiologia. 7. Podócitos. 8. Glomérulos Renais - Fisiologia. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.61

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Jessica de Andrade Moraes Teixeira

**Dieta materna hipersódica e alterações renais
na prole de camundongos**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de janeiro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda
Faculdade Ciências Médicas - UERJ

Banca examinadora: _____
Prof. Dr. Mariano Guillermo A. Del Sol Calderon
Universidade da Fronteira

Prof. Dr. Omar da Rosa Santos
Universidade Federal no Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Mauricio Younes-Ibrahim
Faculdade Ciências Médicas - UERJ

Prof^a Dr^a Marcia Barbosa Aguila
Instituto de Nutrição - UERJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

À minha família e aos meus professores.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Leonardo Rangel, por compartilhar sua vida comigo. Obrigada pelo apoio e dedicação diária. Você é a personificação do amor. A minha filha Ana Luiza por ter me permitido experimentar o amor incondicional;

Aos meus pais Olivia de Andrade e Flávio Márcio Teixeira, padrasto José Lino Bastos e madrasta Ângela Bezerra. Aos meus irmãos Bruno e Thiago, as minhas cunhadas Maria Janaína e Daniele, meus sobrinhos Marina e Pablo. Aos meus sogros Luiz Renato Rangel e June Rangel. Aos meus avós maternos Oswaldo Teixeira ("in memoriam") e Ozélia Teixeira e aos meus avós paternos Homero Teixeira ("in memoriam") e Aylma Teixeira ("in memoriam"). Agradeço por toda educação, ensinamentos, companheirismo e incentivo. De fato, sem vocês, essa vitória não seria alcançada;

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda e a minha coorientadora Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda pelos anos dedicados ao meu aprendizado profissional, mas principalmente por terem permanecido ao meu lado no momento que eu mais precisei. Minha eterna gratidão e respeito;

Aos professores Ana Carolina Stumbo Machado, Andréa Monte Alto Costa, Bianca Martins Gregório, Bruna Romana de Souza, Antonio Claudio Mendes Ribeiro, Cristiane da Fonte Ramos, Francisco José Barcellos Sampaio, José Roberto Machado e Silva, Laís de Carvalho, Luís Cristovão de M. Sobrino Porto, Simone Carvalho, Tatiana Marlowe Cunha Brunini, Waldemar Silva Costa, pelo comprometimento e dedicação aos alunos do programa de pós-graduação Biologia Humana e Experimental;

Às professoras e amigas Vanessa de Souza Mello e Tatiane Faria e ao professor Jorge José de carvalho pela eterna ajuda;

Ao professor Maurício Younes-Ibrahim pelos ensinamentos e fundamental auxílio para a concretização desse trabalho;

Ao professor Luciano Favorito pela atenção e transmissão de conhecimento durante o programa de estágio docente;

À pós-doutoranda Sandra Barbosa por estar sempre disposta a ensinar,

obrigada pelos ensinamentos diários;

Aos alunos de doutorado Jorge Alves, Flávia Gombar, Fernanda Cavalcante, Eduardo Leze, Paula Fontoura, Fabiane Martins, Alini Schultz, D'Angelo Magliano e Thereza Bargut e aos alunos de mestrado: Francielle Graus, Victor Motta, Marcel Ferreira, Helder Gonçalves, Celina Borges, Verônica Aiceles, Tamiris Rachid e Thaís Ceciliano pelo carinho, atenção e companheirismo ao longo desta caminhada;

As alunas de iniciação científica, Michelle Rabello da Cunha e Rafaella Karen Sousa Monterlei pela incansável dedicação e responsabilidade durante todo o desenvolvimento do projeto;

As eternas amigas Eliete Dalla Corte Frantz, Thatiany Marinho, Aline Penna, Fernanda Ornellas e Alyne Félix e aos amigos André Barreto-Vianna e Milton Vieira Costa pela paciência, amizade, momentos de aprendizado e ajuda incondicional;

A amiga e companheira de trabalho Isabele Bringhenti por toda dedicação e ensinamentos. Foram meses vindo para a UERJ de domingo a domingo, compartilhando experiências, dúvidas, mas também muitas alegrias, obrigada pela amizade;

Aos Doutores Vinicius Rocha, Julio César Fraulob e Geraldo Oliveira pelo auxílio e ensinamentos;

À Ana Lucia Rosa Nascimento, Alan Cesar Nunes de Moraes, Leandro Layter Xavier, Willian Lannes, Michele Soares e Gezileia Lau pelo auxílio técnico e dedicação. Vocês são incansáveis;

Aos funcionários Izabel Mendes, Cristiane Baptista, José Carlos Gomes pelo suporte administrativo;

A CAPES, FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho e pela bolsa de doutoramento.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

RESUMO

Moraes-Teixeira, Jessica de Andrade. **Dieta materna hipersódica e alterações renais na prole de camundongos**. 94 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O aumento da prevalência de hipertensão arterial sistêmica nas sociedades ocidentais está associado com os altos níveis de consumo de sal. Camundongos fêmeas receberam uma dieta contendo ou 0,25% de cloreto de sódio (NaCl) - (dieta padrão, SC) ou 4% de NaCl (dieta high-salt, HS), durante oito semanas antes da gestação. As fêmeas foram acasaladas com camundongos machos alimentados com dieta SC. A prole foi analisada em três idades diferentes: ao nascimento, aos 10 dias, e aos três meses de idade. Após oito semanas em suas respectivas dietas, antes do acasalamento, as fêmeas HS apresentaram aumento nos níveis de glicemia, corticosterona e pressão arterial (PA) do que as fêmeas SC. Ao nascimento, a mortalidade neonatal foi maior na prole de fêmeas HS do que na prole de fêmeas SC. Aos três meses de idade, a prole HS apresentou maior glicemia e PA, glomérulos hipertrofiados, redução do número de glomérulos, e maior número de glomérulos esclerosados do que a prole SC. A prole HS também apresentou menor clearance de creatinina e clearance de uréia, menor taxa de filtração glomerular, e maior fração de excreção de sódio, potássio e uréia do que a prole SC. A proteinúria foi maior na prole HS do que na prole SC ($P=0,04$). No rim da prole, a expressão das proteínas renina e Ang II foi significativamente maior na prole HS do que na prole SC aos 10 dias de idade. Foi observado aumento nos níveis de expressão da proteína AT1R e diminuição nos níveis de expressão da proteína AT2R na prole HS em relação a prole SC. A expressão das proteínas WT1 e podocina foi menor na prole HS que na prole SC. Em resumo, a exposição da prole a uma dieta materna com alto teor de sal resulta em hipertrofia glomerular, esclerose, número reduzido de glomérulos, com consequente hipertensão e produz alteração na expressão renal de WT1, podocina, e SRA na vida adulta. Portanto, a função renal da prole HS se deteriora mais rapidamente do que a prole de mães alimentadas com uma dieta normal.

Palavras-chave: Dieta maternal hipersódica. Nefrogênese. Sistema Renina Angiotensina (SRA); Gene supressor de tumor de Wilms (WT1). Podocina. Número de glomérulo.

ABSTRACT

Moraes-Teixeira, Jessica de Andrade. ***Kidney changes in mice offspring from maternal high-salt diet.*** 94 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The increased prevalence of systemic arterial hypertension in Western societies is associated with the high levels of salt consumption. Beginning eight weeks before pregnancy, female mice received a diet containing either 0,25% sodium chloride (NaCl) - (standard chow, SC) or 4% NaCl (high-salt, HS). Females were mated with male mice fed a SC diet. Their offspring were analyzed at three different ages: at birth, at day 10, and at three months. After eight weeks on these diets, before mating, HS dams exhibited higher glycemia, higher corticosterone levels, and higher blood pressure (BP) than the SC dams. At birth, neonatal mortality was higher in the offspring of HS dams than in those from SC dams. At 3 months of age, HS offspring exhibited higher glycemia and higher BP, larger and fewer glomeruli, and a greater number of sclerotic glomeruli than SC offspring. They also exhibited lower creatinine clearance, lower blood urea nitrogen clearance, lower glomerular filtration rate, higher fractional excretion of sodium, potassium, and urea than SC offspring. Proteinuria was higher in HS offspring than in SC offspring ($P=0.04$). In the kidney of offspring, the protein expression of renin was significantly higher in HS than in SC offspring, and Ang II was higher in HS than in SC offspring at 10 days of age. AT1R levels were higher and AT2R levels lower in HS than in SC offspring. Gene Wilms tumor 1 (WT1) and podocin were lower in HS than in SC offspring. In summary, the exposure of offspring to a maternal diet with high salt content results in a glomerular hypertrophy, sclerosis, and low glomeruli number with consequent hypertension and produces a shift in the renal expression of WT1, podocin, and RAS at maturity. Therefore, the renal function of these offspring deteriorates more quickly than in the offspring of mothers fed a normal diet.

Keywords: Maternal high salt diet. Nephrogenesis. Renin-angiotensin system (RAS). Gene Wilms tumor 1 (WT1). Podocin. Glomeruli number.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Programação fetal e doenças na vida adulta	22
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do podócito	27
Figura 3 - O clássico sistema renina-angiotensina	31
Figura 4 - Atualização do sistema renina-angiotensina	33
Figura 5 - Fotomicrografia do rim	44
Figura 6 - Representação esquemática do método "disector"	47
Figura 7 - Tolerância à glicose da prole	57
Figura 8 - Esclerose e número glomerular da prole	58
Figura 9 - Volume e número glomerular da prole	59
Figura 10 - Nível protéico renal de renina, Ang II e AT1R na prole	64
Figura 11 - Nível protéico renal de WT1 e podocina na prole	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais.....	40
Tabela 2 - Dados das progenitoras	53
Tabela 3 - Dados da prole ao nascimento	54
Tabela 4 - Dados da prole	60
Tabela 5 - Função renal da prole	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN-93	<i>American Institute of Nutrition</i> do ano de 1993
Ang	Angiotensina
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
AT	Área teste
AT1R	Receptor tipo 1 da Ang II
AT2R	Receptor tipo 2 da Ang II
AT4R	Receptor tipo 4 da Ang II
bpm	batimento por minuto
BU	Broto do ureter
CD2AP	Proteína associada ao CD2
CEA	Comissão de ética no uso de animais
CNA	Comprimento naso-anal
DC	Débito cardíaco
DF	Diafragma de fenda
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DW	Ducto de Wolff
EA	Eficiência alimentar
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EPM	Erro padrão da média
Faks	Quinases de adesão focal
FeNa+	Fração de excreção do sódio
FeK+	Fração de excreção do potássio
FeUrea	Fração de excreção da uréia
g	grama
h	hora
HE	Hematoxilina e eosina
HS	Dieta <i>high salt</i>
LMMC	Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular
min	minuto

MC	Massa corporal
MR	Massa renal
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Nv	Densidade numérica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PT	Pontos totais do sistema teste
RCIU	Retardo do crescimento intrauterino
RPT	Resistência periférica total
SACN	<i>Scientific Advisory Committee on Nutrition</i>
SC	Dieta <i>standard chow</i>
siRNA	Ácido ribonucleico de interferência
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TME	Transição mesenquimal-epitelial
TFG	Taxa de filtração glomerular
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
u.a.	Unidade arbitrária
Vv	Densidade de volume
Vv[glom]	Densidade volumétrica do glomérulo
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT1	Gene supressor de tumor de Wilms 1
ZO	zônula oclusiva

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Programação fetal	18
1.2	Rim	24
1.3	Sistema renina-angiotensina (SRA)	29
2	OBJETIVOS	36
2.1	Geral	36
2.2	Específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Animais e dieta	37
3.2	Grupo das progenitoras	41
3.2.1	<u>Pressão arterial</u>	41
3.2.2	<u>Tolerância à glicose e corticosterona</u>	41
3.3	Grupo dos filhotes	42
3.3.1	<u>Biometria e eutanásia</u>	42
3.3.2	<u>Pressão arterial</u>	42
3.3.3	<u>Rim</u>	43
3.3.4	<u>Função renal</u>	48
3.3.5	<u>Western blot</u>	49
3.4	Análise estatística	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Dados maternos	51
4.1.1	<u>Massa corporal e eficiência alimentar</u>	51
4.1.2	<u>Tolerância à glicose</u>	52
4.1.3	<u>Ingestão Hídrica</u>	52
4.1.4	<u>Pressão arterial e corticosterona</u>	52
4.2	Dados da prole	54
4.2.1	<u>Ao nascimento</u>	54
4.2.2	<u>Massa corporal e massa renal</u>	54
4.2.3	<u>Glicemia</u>	55
4.2.4	<u>Pressão arterial</u>	55

4.2.5	<u>Tolerância à glicose</u>	55
4.2.6	<u>Rim</u>	56
4.2.7	<u>Função renal</u>	61
4.2.8	<u>Expressão de proteínas</u>	63
5	DISCUSSÃO	67
	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE - Artigo científico publicado.....	92
	ANEXO A - Comitê de ética em pesquisa.....	93
	ANEXO B - Confirmação de submissão do segundo artigo científico.....	94

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do rim é um processo complexo que requer um equilíbrio preciso entre a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose (Almeida *et al.*, 2003) e é modulado pela ação do sistema renina-angiotensina (SRA) (Garcia-Villalba *et al.*, 2003). Além disso, a podocina (um componente fundamental do diafragma de fenda glomerular) e o gene supressor de tumor de Wilms (WT1) são reguladores essenciais do desenvolvimento do rim (Burrow, 2000).

Estímulos ambientais e nutricionais podem alterar permanentemente a estrutura, os sistemas homeostáticos e as funções corporais durante o desenvolvimento. Esta influência tem sido referida como "programação" (Barker e Osmond, 1986). Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que os efeitos da programação influenciam o risco de doenças crônicas na vida adulta (Barker, 1998; Langley-Evans e McMullen, 2010). Assim, a redução do número de néfrons tem sido utilizada como uma explicação para a associação entre a restrição do crescimento intrauterino e hipertensão arterial na vida adulta (Almeida e Mandarim-de-Lacerda, 2005a, b). As adaptações compensatórias que acompanham o número reduzido de néfrons podem acelerar o declínio da função renal que acompanha o envelhecimento (Barker *et al.*, 2006; Woods, 2007). No entanto, a hipótese de hiperfiltração, devido à redução da massa renal e as suas consequências para os néfrons remanescentes, que leva a uma subsequente lesão glomerular com proteinúria, hipertensão e glomeruloesclerose, continuam sendo um assunto em debate (Brenner *et al.*, 1988; Schreuder e Nauta, 2007; Bertram *et al.*, 2011).

O aumento da prevalência de hipertensão arterial sistêmica nas sociedades ocidentais está muito associado a ingestão de sódio (Na) na comida ¹ (Ferreira *et al.*, 2010), juntamente com a resistência à insulina (Ogihara *et al.*, 2002).

A principal fonte de sódio na dieta é a partir do sal (Cloreto de sódio - NaCl). Os termos sal e sódio são muitas vezes usados como sinônimos, entretanto o sal é constituído de 40% de sódio e 60% de cloro, ou seja, 1 g de sódio é equivalente a 2,55

¹ Laticínios, embutidos e sopas prontas entraram na lista de alimentos que devem sofrer redução de sódio, porque o consumo elevado é um dos causadores de hipertensão arterial. A medida está no quarto acordo destinado a diminuir a quantidade do produto em alimentos industrializados. O documento foi assinado em 11/5/2013 pelo Ministério da Saúde e a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação.

g de sal (SACN, 2003).

Ingestão de sal, juntamente com o aumento do crescente ônus da hipertensão e doença cardiovascular global levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a recomendar que a ingestão de sal seja inferior a 5 g/dia (WHO, 2007), ou seja, ingestão de sódio inferior a 2g/dia. Estudo realizado pelo grupo INTERSALT avaliando o consumo de sal e a pressão arterial (PA), demonstrou que o consumo médio de sal em 32 países foi de 9,9 g/dia (1988). Estudo epidemiológico fornece evidências convincentes do efeito negativo do consumo de sódio na pressão arterial entre indivíduos hipertensos e normotensos (Sacks *et al.*, 2001). Além disso, pesquisa com animais indicam que o consumo elevado de sódio, assim como o consumo reduzido de sódio durante a gestação podem modificar a expressão de proteínas no rim da prole, causando alteração renal permanente (Koleganova *et al.*, 2011).

Estas observações nos levam a fazer a hipótese de que a administração de uma dieta hipersódica durante o período pré-concepcional e durante a gestação/lactação, pode alterar precoce e tardiamente a fisiopatologia e estrutura do rim, culminando em uma alteração da função renal na prole.

Para validar esta hipótese estabelecemos um protocolo experimental para avaliar a estrutura e a função renal de filhotes desde o nascimento até a maturidade em um modelo animal (camundongos).

Esta tese está dividida em seis capítulos: Revisão da literatura, Objetivos, Metodologia, Resultados, Discussão e Conclusão. Primeiramente, fez-se uma breve exposição sobre programação fetal, rim e sistema renina angiotensina, para expor algumas considerações sobre a dieta hipersódica e sua administração às mães. Depois segue-se a revisão do tema, com os objetivos do trabalho. Em seguida, a descrição da metodologia empregada e os resultados encontrados. A discussão e conclusão são apresentadas com base nos resultados do trabalho.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Programação fetal

Os genes e o estilo de vida dos adultos são os principais determinantes para o risco de desenvolvimento de doenças como o *diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares. Nos últimos anos dados epidemiológicos sugeriram que influências adversas durante o desenvolvimento precoce, em particular durante a vida fetal, aumentam o risco de desenvolvimento de doença na vida adulta (Osmond e Barker, 2000; Gluckman e Hanson, 2004b; de Boo e Harding, 2006). Este paradigma, conhecido como "programação fetal", pode ter um profundo impacto sobre estratégias de saúde pública para a prevenção das principais doenças. A ligação entre o ambiente intrauterino e doenças no adulto foi observada inicialmente pelo médico David Barker², que relatou a associação entre baixo peso ao nascer e o risco de desenvolver DM2 (Hales *et al.*, 1991; Ravelli *et al.*, 1998) e doença cardiovascular (Barker e Osmond, 1986; Barker *et al.*, 1989a).

A abordagem mais frequentemente utilizada para perturbar o ambiente uterino em estudos experimentais tem sido alterar a nutrição da mãe, normalmente submetendo o animal durante a gravidez à desnutrição proteica, o que resulta em alteração do metabolismo da glicose (Dahri *et al.*, 1991) e da função cardiovascular (Langley e Jackson, 1994) na prole. Além da restrição proteica, outros trabalhos foram desenvolvidos a fim de avaliar o efeito da dieta com restrição energética global sobre a prole. Segundo dados da literatura, roedores que sofreram restrição de 30% do conteúdo energético total da dieta durante a gestação, deram origem a filhotes que desenvolveram obesidade, hiperinsulinemia e hiperleptinemia na vida adulta, associados com quadro de hiperfagia e hipoatividade (Vickers *et al.*, 2000; Vickers *et al.*, 2003).

² David Barker é médico e Professor de Epidemiologia Clínica da Universidade de Southampton, Reino Unido e Professor do Departamento de Medicina Cardiovascular na Saúde e da Ciência da Universidade de Oregon, EUA. Vinte anos atrás, ele mostrou pela primeira vez que as pessoas que tiveram baixo peso ao nascer têm maior risco de desenvolver doença cardíaca coronária. Em 1995, o *British Medical Journal* chamou isso de "Hipótese Barker", agora amplamente aceita. Em 2010, a revista *Time* chamou os trabalhos de Barker de "New Science".

Além das alterações da nutrição materna, uma série de outras perturbações na fisiologia materna, tais como a administração de corticosteroides (Nyirenda *et al.*, 1998), citocinas (Dahlgren *et al.*, 2001), ou a redução experimental do fluxo sanguíneo uterino (Jansson e Lambert, 1999; Simmons *et al.*, 2001), tem sido estudadas como modelos que levam a programação fetal de diabetes e /ou hipertensão.

A programação fetal existe devido a plasticidade na formação dos órgãos e tecidos durante o desenvolvimento, onde os distúrbios durante períodos críticos do desenvolvimento fetal alteram a estrutura e/ou a função de células distintas, os sistemas orgânicos ou as vias homeostáticas (Gluckman e Hanson, 2004a). A plasticidade do feto ao responder às influências ambientais está associada com vantagens adaptativas no útero que, após o nascimento não se adaptam posteriormente ao ambiente metabólico pós-parto. No caso de restrição intrauterina de nutrientes a resposta adaptativa fetal pode ser inadequada se a vida pós-natal proporcionar uma abundância de nutrientes. Como consequência desse desequilíbrio, doenças podem aparecer na vida adulta (Gluckman e Hanson, 2004b). Os mecanismos que ligam um ambiente intrauterino adverso à doença no adulto estão sob intensa investigação. A possibilidade de que a regulação epigenética de vias metabólicas importantes representa um caminho comum para a programação fetal tem atraído muita atenção (Pham *et al.*, 2003; Lillycrop *et al.*, 2005). Além disso, a literatura descreve o envolvimento de alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Seckl e Meaney, 2006) e na sinalização da leptina (Vickers *et al.*, 2005), na programação da fisiologia fetal em resposta a estímulos ambientais.

O ambiente fetal é considerado fator essencial na etiologia da doença cardiovascular na vida adulta. A teoria de que as experiências no início da vida exercem grande influência sobre o risco cardiovascular foi relatada pela primeira vez pelo Dr. Anders Forsdahl³ em 1973 (Forsdahl, 1973). O Dr. David Barker avançou o conceito, sugerindo que as influências que levam ao aumento do risco cardiovascular podem ter suas origens na vida pré-natal. Ambas as observações originais destacam

³ Anders Fordahl foi médico de família muitos anos e só entrou na vida acadêmica depois que ele já tinha passado dos 40 anos. As observações feitas durante sua prática médica em uma comunidade de mineiros do município de Finnmark (Noruega), nos anos '60 e início dos anos '70, sem dúvida, teve um efeito importante sobre seu trabalho acadêmico mais tarde. Com base nessas observações, ele formulou a hipótese sobre a relação entre as condições de vida precárias na infância e importantes fatores de risco para doenças coronárias na vida adulta. Observando indivíduos na meia-idade (40-69 anos) viu que as taxas de mortalidade tinham correlação extremamente alta ($r=0,93$), com taxas de mortalidade infantil para o mesmo grupo antes. Hoje, essa constatação genérica é conhecida como a hipótese Forsdahl - Barker, considerando Forsdahl como a fonte original da ideia, e Barker como um desenvolvedor tardio desta ideia inovadora.

uma forte correlação positiva entre a doença cardíaca coronariana e a mortalidade infantil.

No entanto, Barker começou observando a relação inversa entre o peso ao nascimento e o risco de doença cardiovascular (Barker *et al.*, 1989b), formulando a hipótese do ambiente fetal ser um novo componente na etiologia da doença cardiovascular. Com base em suas observações, Barker considerou que a programação de desenvolvimento de doenças no adulto ocorre em resposta a um desequilíbrio durante a vida fetal entre as demandas fetais e de fornecimento de nutrientes, resultando em desnutrição fetal (Barker e Osmond, 1988). Assim, retardo do crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer levam ao comprometimento do desenvolvimento fetal,

com mudanças adaptativas moleculares e fisiológicas (Barker, 1995). Embora estas adaptações fetais permitam a sobrevivência fetal, muitas consequências ocorrem a longo prazo, tais como alterações na fisiologia e na estrutura dos sistemas cardiovascular, renal, metabólico, respiratório, endócrino e nervoso (Barker, 1995; Fowden *et al.*, 2006).

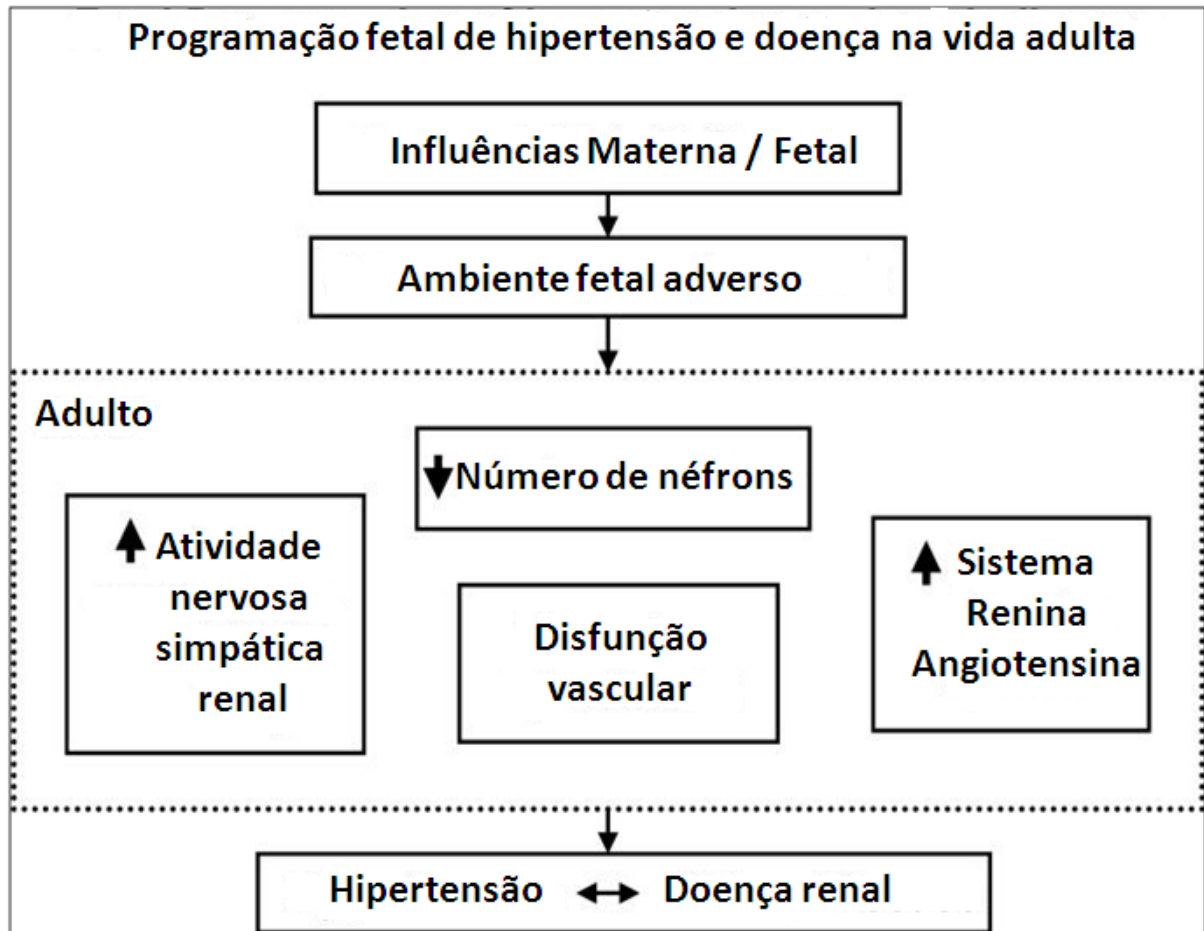
Pesquisadores utilizam modelos animais para induzir um ambiente fetal adverso e mimetizar a condição humana de crescimento fetal e elucidar as vias envolvidas na programação do desenvolvimento de doença em adultos (Langley-Evans, 2001; Moritz *et al.*, 2003; Vehaskari e Woods, 2005; Alexander, 2006; Nathanielsz, 2006). Os períodos críticos do desenvolvimento envolvem tanto o ambiente intrauterino (ambiente fetal) como o período de lactação (ambiente pós-natal). Diferentes métodos têm sido utilizados para induzir um ambiente fetal desfavorável em estudos experimentais. Apesar das diferenças sutis no método do insulto, os resultados observados são similares (Figura 1) e demonstram restrição do crescimento fetal (Barker, 1995), diminuição do número néfrons (Hughson *et al.*, 2006), função vascular prejudicada (Goodfellow *et al.*, 1998) e aumento significativo na pressão arterial (Barker e Osmond, 1988).

Estudos prévios utilizaram modelos de desnutrição materna proteica para demonstrar que o momento da lesão durante a gestação é crítica para a resposta adaptativa fetal. No rato, alterações acentuadas na morfologia renal e aumento da pressão arterial são observados quando o insulto nutricional coincide com o período da nefrogênese. No entanto, o mesmo insulto iniciado antes do período da nefrogênese não altera a estrutura dos rins ou a regulação da pressão arterial (Langley-Evans *et al.*,

1999; Woods *et al.*, 2004).

Os rins são conhecidos por desempenhar papel importante na regulação a longo prazo da pressão arterial (Guyton *et al.*, 1972; Brenner *et al.*, 1988). Então, estudos sobre programação de pressão arterial sugerem que um insulto durante o desenvolvimento do rim leva à "programação" dos rins, resultando alterações nos mecanismos complexos que estão associados com a regulação da pressão arterial. Modelos animais de programação fetal induzida por desnutrição proteica gestacional e insuficiência placentária relatam alterações temporais comuns no SRA (Woods *et al.*, 2001; Riviere *et al.*, 2005; Grigore *et al.*, 2007). A supressão do SRA intrarrenal ao nascimento é seguida por ativação posterior do SRA, incluindo o aumento da expressão dos receptores AT1 (Sahajpal e Ashton, 2003; Vehaskari *et al.*, 2004) e da enzima conversora de angiotensina (ECA) renal (Gilbert *et al.*, 2005; Grigore *et al.*, 2007). Além disso, o bloqueio do SRA previne ou suprime a hipertensão arterial na prole de mães que sofreram restrição proteica ou uma redução na perfusão uterina, demonstrando, assim, a importância do SRA na etiologia da hipertensão programada (Manning e Vehaskari, 2001; Grigore *et al.*, 2007).

Figura 1 - Programação fetal e doenças na vida adulta



Nota: Um ambiente fetal adverso, devido a influências materna ou fetal leva a alterações no desenvolvimento renal e alterações adaptativas comuns nos sistemas críticos do controle a longo prazo da pressão arterial, resultando em hipertensão e aumento do risco para a doença renal na vida adulta.

Fonte: (Ojeda *et al.*, 2008).

Uma nefrogênese deficiente resulta na redução do número de néfrons sendo este um resultado comumente observado na programação fetal em muitos modelos com diferentes animais e também em estudos humanos relacionados com retardo do crescimento intrauterino (Woods *et al.*, 2001; Moritz *et al.*, 2003; Hughson *et al.*, 2006). O aumento da apoptose renal e da expressão de genes-chave da apoptose pode contribuir para a redução do número de néfrons quando ocorre um insulto fetal (Murotsuki *et al.*, 1997; Vehaskari *et al.*, 2001). Estas mudanças de adaptação durante a programação fetal apontam o rim como um alvo importante na programação fetal e

ênfatizam a importância dos rins na regulação a longo prazo do controle da pressão arterial.

A obesidade materna também pode ser uma importante influência na programação, com grande relevância para as sociedades modernas que apresentam aumento importante da frequência de obesidade/sobrepeso na população (Shamseddeen *et al.*, 2011). A obesidade altera muitos aspectos do ambiente vivenciado pelo feto, incluindo a qualidade e a quantidade dos nutrientes fornecidos através da placenta e do meio endócrino. As mulheres obesas, naturalmente, apresentam um maior risco de complicações na gravidez, incluindo diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e parto pré-termo (Jensen *et al.*, 2003). A obesidade materna em camundongos induzida várias semanas antes do acasalamento, leva a prole a apresentar também obesidade com aumento da pressão arterial, maior adiposidade e resistência à insulina (Samuelsson *et al.*, 2008; Ornellas *et al.*, 2013).

As preocupações existentes sobre a nutrição das mulheres em países desenvolvidos estão focadas mais no excesso nutricional, do que na deficiência de nutrientes específicos. Surpreendentemente, os experimentos que fazem restrição nutricional em fêmeas no período gestacional quase universalmente resultam em pressão alta, intolerância à glicose, resistência à insulina e maior propensão para a prole se tornar obesa (Langley-Evans, 2006). Entretanto, os experimentos que fazem manipulação nutricional na direção oposta (obesidade) têm quase exatamente os mesmos resultados. A alimentação com dieta rica em gordura durante a gravidez de ratas está associada com uma elevação da pressão arterial e disfunção endotelial vascular na prole resultante (Khan *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005). A exposição fetal a dieta com alto teor de proteína provoca desequilíbrio no gasto energético conduzindo à obesidade (Daenzer *et al.*, 2002).

Dados recentes revelam que alguns fatores circulantes da mãe, como hormônios (leptina, insulina), nutrientes (ácidos graxos, triglicerídeos e glicose) e citocinas inflamatórias ocupam importante papel na gênese de doenças crônicas na prole (Sullivan *et al.*, 2011). A placenta constitui a interface ativa entre as circulações sanguíneas materna e fetal, regulando as mudanças fisiológicas maternas na gestação e o crescimento fetal e desempenha um papel importante no desenvolvimento de muitas complicações na gravidez (Godfrey, 2002). A relação entre função da placenta e nutrição fetal é complexa. Em períodos críticos da gravidez o fluxo de nutrientes através da placenta (por exemplo, em mols do soluto/g placenta/min.) pode ser

insuficiente para satisfazer as exigências do feto para o seu crescimento e desenvolvimento. Isto limita a capacidade do feto para atingir o potencial de crescimento. O oposto também pode ocorrer - o fluxo de nutrientes através da placenta, na verdade, pode ser superior à necessária para o feto, limitando o feto a atingir o potencial genético de crescimento, gerando conseqüentemente situações clínicas graves de restrição do crescimento fetal (Atkinson *et al.*, 2006). Esta última situação leva ao crescimento excessivo ou macrosomia fetal, como é frequentemente encontrado quando as mulheres grávidas são diabéticas ou obesas (Catalano e Ehrenberg, 2006).

1.2 Rim

O desenvolvimento embrionário do sistema urogenital nos vertebrados requer a formação progressiva de três tipos de rins pelo mesoderma intermediário: o pronefro, o mesonefro e metanefro. Nos mamíferos, o pronefro é uma estrutura vestigial rapidamente substituída pelo mesonefro, que funciona durante o desenvolvimento embrionário. O mesonefro irá degenerar ou diferenciar-se em parte do sistema reprodutor no macho (Saxen e Sariola, 1987). No rato, o ducto de Wolff (DW) cresce rostro-caudalmente ao longo do eixo do embrião. Como se alonga caudalmente primeiro induz o pronefro, em seguida o mesonefro e, finalmente, o metanefro ao nível do membro posterior (Saxen e Sariola, 1987). O desenvolvimento renal metanéfrico é iniciado por volta da metade da gestação, quando a parte caudal do DW começa a proliferar e um espessamento epitelial chamado broto do ureter (BU) se alonga para invadir o mesênquima metanéfrico adjacente. Interações entre o mesênquima metanéfrico e a extremidade do BU levam ao estabelecimento de um complexo de interações de sinalização epitélio-mesenquimal (Costantini, 2006). Estas interações são fundamentais para a iniciação do crescimento e da ramificação do BU que irá gerar o sistema coletor renal definitivo e induzir a formação das vesículas renais. As vesículas renais são os precursores dos néfrons (Dressler, 2006). Os néfrons são as unidades básicas funcionais dos rins e são essenciais para a regulação do teor de água e remoção de substâncias residuais solúveis, filtrando o sangue (Schedl, 2007).

De fato, malformações do trato urinário estão entre os defeitos de nascimento

mais comuns em humanos e representam quase 1% de todos os defeitos congênitos (Scott e Renwick, 1988). O crescimento e o posicionamento correto do BU são cruciais no processo para evitar a maioria dos defeitos de desenvolvimento que afetam os rins (Mendelsohn, 2009). Além disso, o número de néfrons é principalmente determinado pela quantidade de ramificações geradas durante a morfogênese metanéfrica do rim. Portanto, defeitos na ramificação da morfogênese metanéfrica renal pode predispor as pessoas para o futuro, a doença renal crônica (Schedl, 2007; Costantini e Kopan, 2010).

O gene supressor de tumor de Wilms (WT1) é essencial para o desenvolvimento de certos tecidos derivados do mesoderma, incluindo os rins, gônadas, vasculatura cardíaca, baço e também para a proliferação de certas células progenitoras neuronais (Hohenstein e Hastie, 2006). A completa ausência dos rins em camundongos deficientes em WT1 tem dificultado o estudo do papel do WT1 no desenvolvimento renal (Kreidberg *et al.*, 1993). Dados na literatura demonstram que a utilização da combinação de cultura de rim *in vitro* e o tratamento com siRNA, foram capazes de mostrar que o WT1 é necessário para induzir a transição mesenquimal-epitelial que conduz à formação dos néfrons (Davies *et al.*, 2004).

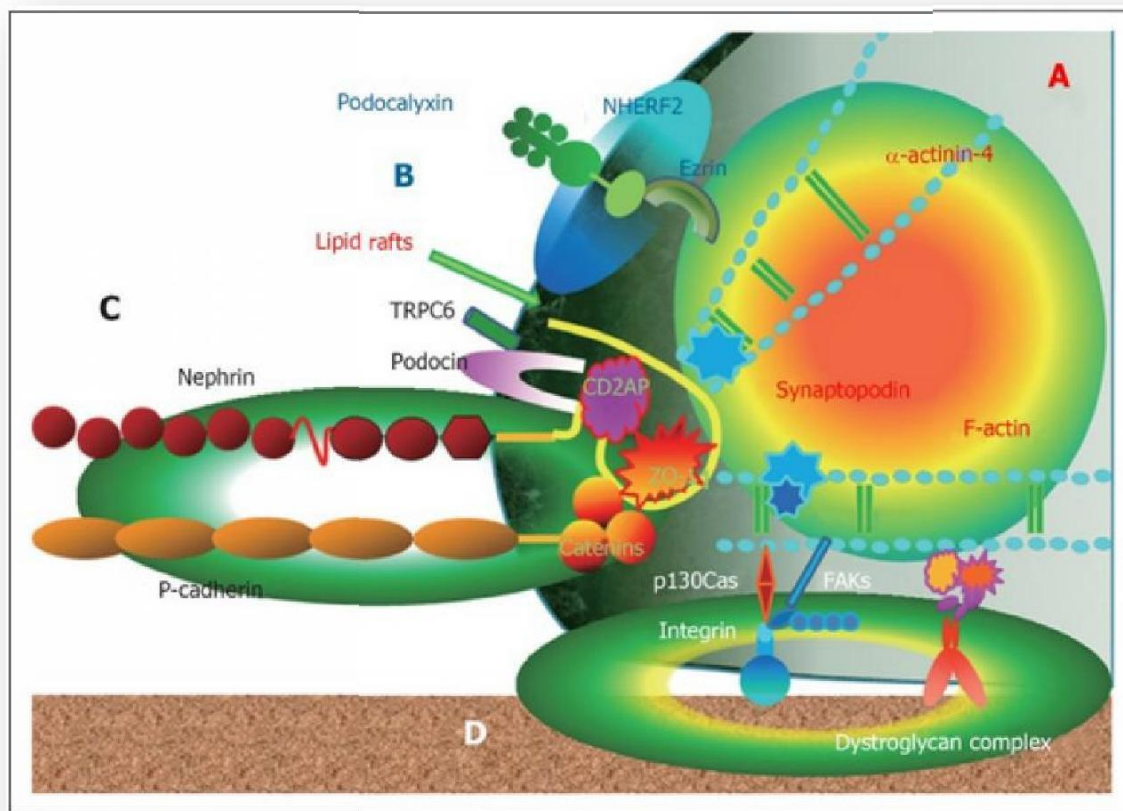
Os rins são formados por néfrons, estes são constituídos pelo corpúsculo renal (glomérulo renal e cápsula glomerular), túbulo renal proximal, alça néfrica e o túbulo renal distal. O glomérulo renal é composto por um tufo de capilares circundados por uma membrana denominada cápsula glomerular, esta é formada por dois folhetos, um visceral ou interno que possui células modificadas durante o desenvolvimento embrionário renal, originando os podócitos, e outro parietal ou externo, que formam os limites do corpúsculo renal. Entre esses dois folhetos existe o espaço capsular (Junqueira e Carneiro, 1999).

Os podócitos glomerulares são células altamente especializadas e têm citoarquitetura complexa. Sua característica mais importante é a interdigitação dos processos podais dos podócitos adjacentes com as fendas de filtração entre eles. Estes são interligados pelo diafragma de fenda (DF), o qual desempenha papel importante no estabelecimento da permeabilidade seletiva da barreira de filtração glomerular. Lesão nos podócitos leva a proteinúria, característica da maioria das doenças glomerulares (Pavenstadt *et al.*, 2003). O DF é mantido por múltiplas interações moleculares que asseguram a ancoragem estável dos complexos de membrana com o citoesqueleto de actina (Pavenstadt *et al.*, 2003; Remuzzi *et al.*,

2006). Várias proteínas dos podócitos desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade do DF (Figura 2).

A nefrina é uma proteína transmembranar que constitui um importante esqueleto estrutural do DF (Kestila *et al.*, 1998). A podocina é uma proteína integral da membrana com 42 kD, que interage com a nefrina no DF (Boute *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2001). Semelhante a caveolina, a podocina está presente em complexos oligoméricos de alta ordem e localizada nos chamados "*rafts*", microdomínios de membrana especializados, onde esfingolipídios e colesterol são altamente enriquecidos (Simons e Toomre, 2000; Schwarz *et al.*, 2001). Os complexos multiproteicos do DF são montados através dos *rafts* (Tryggvason *et al.*, 2006).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do podócito



Nota: Representação esquemática da estrutura do podócito. A: citoesqueleto; B: Domínio apical da membrana; C: Complexo de proteínas do diafragma de fenda; D: Domínio basal da membrana. Proteínas adaptadoras de ligação principalmente entre o diafragma de fenda e o citoesqueleto. Faks: cinases de adesão focal; ZO: zô nula oclusiva; CD2AP: proteína associada ao CD 2.

Fonte: (Ha, 2013).

Os rins desempenham papel central na homeostase cardiovascular, garantindo o equilíbrio entre a quantidade de líquido consumido e excretado durante as atividades cotidianas. Isso garante a estabilidade do volume de fluido extracelular e manutenção dos níveis normais de pressão arterial (Johns, 2013), que é expressa como um produto do débito cardíaco e da resistência periférica total (Robbins *et al.*, 2000). O fluido renal é controlado através de influências neurais e humoral. A atividade nos nervos simpáticos renais é feita a partir de uma integração de informações dos barorreceptores, dos sistemas somatossensorial e visceral, bem como dos centros corticais superiores. Em estados patofisiológicos, tais como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e doença renal crônica, pode haver uma excitação simpática causando retenção inadequada de sódio que agrava o processo da doença (Johns, 2013).

Pequena elevação nos níveis de renina, angiotensina (Ang) II ou aldosterona circulantes, ou ativação do fluxo simpático renal, podem alterar a função renal de tal forma que as respostas natriuréticas e diuréticas normais à pressão arterial são prejudicadas significativamente. Sob estas circunstâncias, a manutenção normal de sódio e da excreção de água exige uma elevação significativa da pressão arterial. Assim, o comprometimento da função renal leva a elevação da pressão arterial para manter o equilíbrio de sódio e de água adequado durante os períodos de aumento da ingestão de sódio (Osborn, 1991).

O mecanismo renal para o controle de volume de líquido e da pressão arterial é poderoso, tão poderoso que é impossível ou quase impossível para a pressão arterial ser ajustada para qualquer outro valor além do nível ditado por este mecanismo. A razão para a grande potência deste mecanismo no controle da pressão arterial é que nunca deixa de funcionar até que a entrada e saída de sódio e o volume de líquido cheguem a um exato estado de equilíbrio (Wang *et al.*, 2013). Alguns dos fatores que tornam este mecanismo de volume do fluido renal como um excelente regulador da pressão arterial englobam o seguinte: a) uma vez que o mecanismo barorreceptor para o controle da pressão arterial se torna adaptado, a pressão arterial sistêmica é afetada significativamente pelos níveis de volume de líquido extracelular e do volume de sangue; b) o mecanismo de autorregulação do fluxo sanguíneo aumenta ainda mais o efeito de pequenas alterações no volume de

fluido sobre a pressão arterial, aumentando a eficácia do sistema de controle de pressão; c) o SRA desempenha um papel importante no aumento da sensibilidade do sistema de controle da pressão arterial; quando a ingestão de sódio é muito grande, a produção renal de renina e subsequente formação de angiotensina diminuem drasticamente.

Colocando todos os fatores acima em conjunto, verifica-se que ligeiras mudanças no nível do volume de líquido no organismo podem ter efeitos drásticos sobre a pressão arterial. Ligeiras alterações na pressão arterial acima ou abaixo do nível normal podem iniciar grandes mudanças no débito urinário de sódio e de água, retornando rapidamente à pressão arterial para níveis normais (Guyton, 1989).

1.3 Sistema Renina Angiotensina

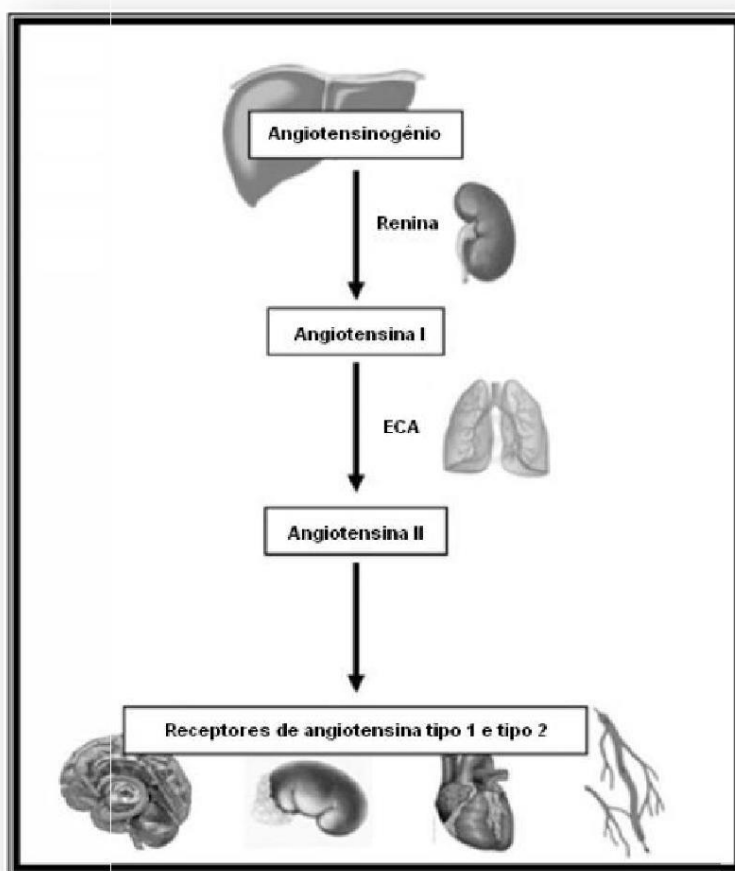
O SRA é conhecido por seu papel crítico na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e função cardiovascular (Krause e Sakai, 2007). A maioria das ações fisiológicas do SRA é exercida pelo peptídeo efetor Ang-II, que é formado a partir do angiotensinogênio através de uma série de eventos de clivagem proteolítica (Figura 3).

No SRA sistêmico ou clássico, o angiotensinogênio é sintetizado principalmente no fígado e secretado para a circulação, onde é clivado pela renina, uma enzima circulante, cuja síntese e secreção são feitas pelos rins, transformando o angiotensinogênio em angiotensina-I (Ang-I). Ang-I é então transformada pela ECA (principalmente a partir do pulmão) em Ang-II, que exerce efeitos fisiológicos sobre vários tecidos, incluindo o córtex suprarrenal, rim, músculo liso vascular e cerebral. Após a síntese, a Ang-II, se liga aos seus receptores nestas áreas alvo, ou é clivada para se obter produtos de degradação, e alguns destes produtos são peptídeos biologicamente ativos, incluindo, como descrito recentemente a Ang (1-7) (Tipnis *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008), bem como Ang-III e Ang-IV, que influenciam diversos processos como aprendizagem e a memória (Wright *et al.*, 1999).

Os receptores de Ang-II (receptor de Ang-II tipo-1 [AT1] e receptor de Ang-II

tipo-2 [AT2]) são receptores acoplados à proteína G. Em roedores, o receptor AT1 pode ser ainda dividido em AT1a e AT1b baseado em algumas diferenças de aminoácidos e são o alvo da maior parte das ações fisiológicas conhecidas da Ang-II, tais como vasoconstrição, a indução de sódio e o consumo de água. Por outro lado, a ativação do AT2R antagoniza a ativação do AT1R em muitos aspectos (Yayama e Okamoto, 2008). Atuando em seus receptores, a Ang-II desencadeia uma série de vias de transdução de sinal intracelular, tais como JAK / STAT e cascatas de sinalização intracelulares MAPK ou ERK (Sadoshima *et al.*, 1995; Velloso *et al.*, 1996) e muitas das funções clássicas do SRA foram atribuídas à ativação de uma ou mais destas cascatas de sinalização (Daniels *et al.*, 2009). A Ang-II estimula a ingestão de água e NaCl através de vias de sinalização celular distintas em ratos.

Figura 3 - O clássico sistema renina-angiotensina



Nota: O clássico sistema renina-angiotensina (endócrino). Ang-II é formada a partir do angiotensinogênio sintetizado no fígado através de uma série de eventos de clivagem proteolítica. O angiotensinogênio é primeiramente clivado pela enzima renina (formada e secretada pelos rins) em Ang-I. Ang-I é então transformada pela ECA (a partir do pulmão) em Ang-II. Ang-II circulante ativa os receptores AT1 e AT2 em vários tecidos, tais como o cérebro, suprarrenal e tecido vascular para modular a homeostase cardiovascular e hidroeletrólítica.

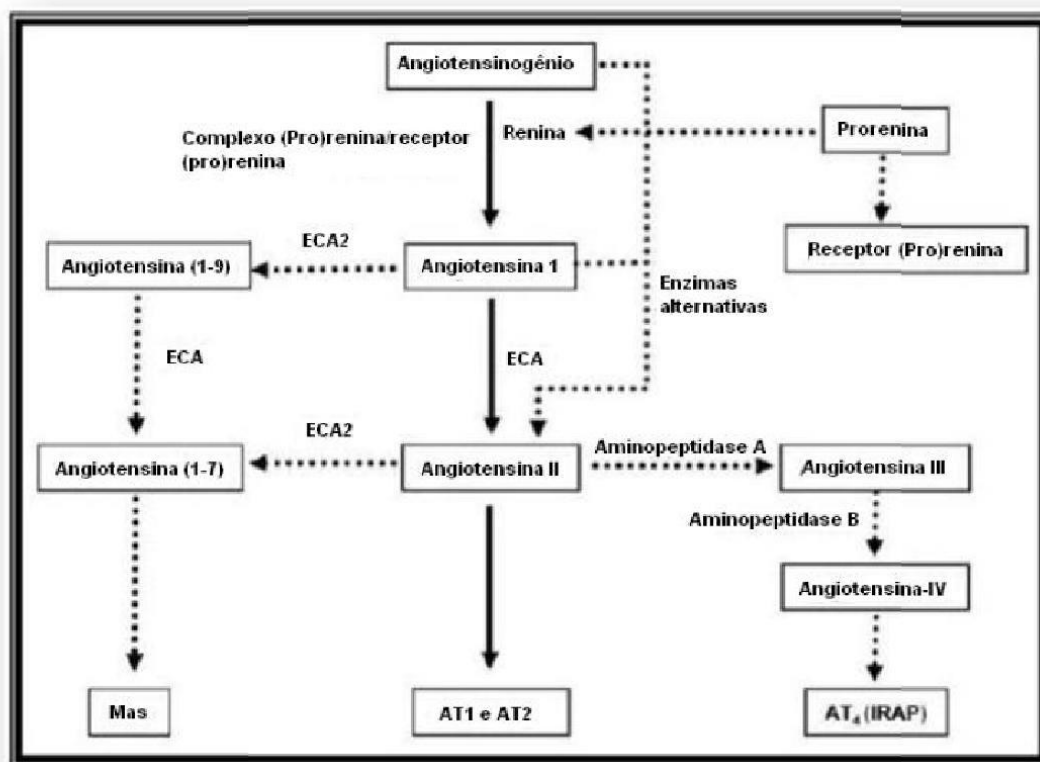
Fonte: (de Kloet *et al.*, 2010).

Uma nuance relativamente recente sobre o SRA é que além da parte endócrina classicamente descrita do SRA, todos os componentes críticos necessários para sintetizar Ang-II localmente são também expressos em outros tecidos, incluindo pâncreas, cérebro, coração, ovário, placenta e tecido adiposo, o que sugere que além das funções endócrinas clássicas, existem também SRAs específicos em tecidos que podem exercer ações autócrinas e parácrinas (Kalinyak *et al.*, 1991; Hagemann *et al.*, 1994; Poisner, 1998; Paul *et al.*, 2006). No cérebro, o

SRA produz Ang-II local, que funciona como um neurotransmissor (Li e Ferguson, 1993). No tecido adiposo, a Ang-II é sintetizada localmente, em parte, para promover o crescimento dos adipócitos (Massiera *et al.*, 2001). Outra nuance é o crescente reconhecimento da complexidade dos produtos finais ativos do SRA (Figura 4). Por exemplo, existe um receptor (pró) renina que se liga a renina, assim com o seu precursor, a pro-renina. Após a ligação a este receptor, a pro-renina ativa cascatas de sinalização intracelular e é ela própria ativada também, permitindo a conversão de Ang-I a Ang-II (Nguyen *et al.*, 2002). Tem sido proposto que o receptor (pró) renina desempenha um papel importante em determinados tecidos específicos do SRAs, como por exemplo, o cérebro (Nguyen *et al.*, 2002; Nguyen e Contrepas, 2008; Cuadra *et al.*, 2010).

Uma segunda enzima conversora da angiotensina, chamada ECA2, foi identificada mais recentemente (Donoghue *et al.*, 2000). A ECA2 é uma carboxipeptidase ligada à membrana, expressa em vários tecidos do corpo, que pode ser clivada a partir da membrana pelo fator de necrose tumoral (TNF)- α convertase (Gembardt *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2005). A ECA2 converte o octapeptídeo Ang-II em heptapeptídeo angiotensina (1-7), que não ativa AT1R ou AT2R, mas sim atua nos receptores acoplados à proteína G Mas (Santos *et al.*, 2003). A ativação desse receptor promove a liberação de óxido nítrico através de uma via fosfoinositídeo-3-quinase/Akt-dependente, resultando em vasodilatação e inibição do crescimento celular, em aparente oposição aos efeitos vasoconstritores e proliferativos da Ang-II (Santos *et al.*, 2003; Kostenis *et al.*, 2005). Existe também um número de enzimas alternativas para a produção de Ang -II, e parte destes componentes não tradicionais do SRA possui relevante função na regulação da energia, da glicose e da homeostase cardiovascular.

Figura 4- Atualização do sistema renina-angiotensina



Nota: Atualização do sistema renina-angiotensina. Além da cascata enzimática para a síntese clássica Ang-II, existem várias vias alternativas para a síntese da Ang-II. A ligação da pró-renina no receptor (pró) renina ativa as vias de sinalização intracelular e permite também a conversão do angiotensinogênio em Ang-I pelo complexo pro-renina / receptor (pró)renina. Existem também os peptídeos angiotensina ativos alternativos, incluindo a angiotensina (1-7) e angiotensina-IV, que são formados por outras enzimas. Esses peptídeos ativam o receptor Mas e o receptor aminopeptidase regulada por insulina (IRAP) respectivamente.

Fonte: (de Kloet *et al.*, 2010).

Um dos principais SRA extrarrenal durante a gravidez está na placenta. Em 1967, Hodari *et al.* descreveram o SRA na placenta e identificou uma substância semelhante a renina no tecido placentário humano (Hodari *et al.*, 1967). A expressão de renina em cultura de células coriônicas foi primeiramente relatada por Symonds em 1968 (Symonds *et al.*, 1968). Desde então, pró-renina, angiotensinogênio, ECA, Ang I e Ang II, foram todos identificados em tecidos placentários fetais. A expressão do receptor AT1 na vasculatura da placenta fetal também já foi demonstrada (Li *et al.*, 1998). Muitos outros experimentos utilizando decídua humana do primeiro trimestre mostram expressão de renina, angiotensinogênio, ECA e receptores AT1 (Shaw *et al.*, 1989). Estudos mais recentes, utilizando células decíduais humanas do terceiro trimestre também indicam a presença de angiotensinogênio e renina (Li *et al.*, 2000). Estudos de localização ao redor das artérias espiraladas decíduais mostram expressão de angiotensinogênio, renina, ECA e receptores AT1 (Morgan *et al.*, 1998). Assim, na mulher grávida, os tecidos da decídua materna e placenta fetal contêm todos os componentes necessários para um SRA funcional.

Nos seres humanos, o SRA sofre grandes alterações em resposta à gravidez. Há um aumento no início de renina devido à liberação local extrarrenal pelos ovários e decídua materna (Hsueh *et al.*, 1982). A síntese de angiotensinogênio pelo fígado é aumentada pelo estrogênio circulante produzido pelo crescimento da placenta. Isto leva ao aumento sérico de Ang II e aldosterona (Brown *et al.*, 1988). A ECA é o único componente do SRA que diminui durante a gravidez (Merrill *et al.*, 2002). Um estudo realizado por Assali *et al.* demonstraram que a mulher grávida requer o dobro de Ang II durante uma infusão intravenosa do que a mulher não grávida para atingir a mesma resposta vasomotora (Assali e Westersten, 1961). Isto é provavelmente devido ao aumento de progesterona e prostaciclina, que podem diminuir a sensibilidade de Ang II (Gant *et al.*, 1980). Além disso, na gestação normal, os receptores AT1 são monoméricos e são inativados por espécies reativas de oxigênio. Isso é em comparação ao estado heterodimérico visto nas condições sensíveis a Ang II (AbdAlla *et al.*, 2001). Estes fatos ajudam a explicar por que um estímulo maior de Ang II é necessário para alcançar resposta vasomotora apropriada nas gestações normotensas.

Trofoblastos são ricos em receptores AT1 e, portanto, são sensíveis às alterações nas concentrações de Ang II que ocorrem durante a gravidez. Estudos

recentes demonstram que vários genes são regulados pela sinalização do receptor AT1 e incluem aqueles que codificam proteínas associadas com a invasão do trofoblasto (por exemplo, inibidor do ativador de plasminogênio-1) e a angiogênese (receptor 1 do fator de crescimento endotelial). A sinalização de Ang II também ativa NF-kappa B e estimula a síntese de NADPH-oxidase pelos trofoblastos (Dechend *et al.*, 2003). Ang II diminui a atividade do sistema transportador de aminoácido A em fragmentos das vilosidades da placenta humana através de ativação do receptor AT1, uma característica que pode contribuir para RCIU em alguns casos (Shibata *et al.*, 2006). Além da regulação da expressão de genes específicos o SRA possui um papel regulador fundamental na circulação feto-placentária, permitindo fluxo sanguíneo placentário adequado para oxigenação fetal e maturação. Estudos recentes sugerem que o tecido decidual serve como fonte de produção de Ang II e os trofoblastos servem como alvos parácrinos da sinalização de Ang II através da ativação dos receptores AT1.

Os resultados obtidos com tecido humano foram confirmados e expandidos para estudos em camundongos. Takimoto *et al.* acasalaram camundongos machos transgênicos portadores do gene da renina humana com fêmeas transgênicas portadoras do gene do angiotensinogênio humano. Eles mostraram ativação da expressão do gene da renina nas células trofoblásticas no final da gestação e que renina humana é liberada pela placenta para a circulação materna (Takimoto *et al.*, 1996). Considerados em conjunto, ambos os estudos em seres humanos e em animais indicam que o SRA sofre alterações específicas e necessárias durante a gravidez normal.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Analisar o efeito da administração de dieta materna hipersódica (período pré-gestacional, durante a gestação e lactação) sobre o desenvolvimento do rim dos filhotes machos.

2.2 Específicos

- a) Avaliar o efeito da dieta hipersódica nas mães sobre o ganho de massa corporal, a ingestão e a eficiência alimentar, a pressão arterial, a tolerância à glicose e a concentração de corticosterona;
- b) Estudar nos filhotes as possíveis diferenças na maturação glomerular;
- c) Analisar nos filhotes se a dieta materna hipersódica está relacionada com o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta da prole, principalmente hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina/diabetes, disfunções renais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para utilização e cuidados dos animais experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (protocolo número CEA/050/2010, no anexo). Este estudo foi realizado em conformidade com a diretriz de "Cuidado e Uso de Animais de Laboratório" – US National Institute of Health 85-23, revisado em 1996.

Camundongos fêmeas virgens da linhagem C57BL/6 foram alocados no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular (LMMC), em caixas de polipropileno, mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$), com livre acesso à comida e a água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro e de renovação de ar (15 min/h)⁴.

A partir de quatro semanas de idade, fêmeas virgens C57BL/6 foram separadas aleatoriamente em um dos dois grupos nutricionais:

- a) grupo dieta padrão (*standard chow*, SC, n = 20) que recebeu dieta para camundongos, contendo 0,25 % NaCl, sendo 0,1% de Na;
- b) grupo dieta hipersódica (*high-salt*, HS, n = 20) que recebeu dieta contendo 4% NaCl, sendo 1,6% de Na.

O conteúdo de vitaminas e minerais foi idêntico em ambas as dietas – exceto para o cloreto de sódio - e seguiram os padrões recomendados para dietas de roedores pelo Instituto Americano de Nutrição para apoiar o crescimento durante a gravidez, lactação e pós-desmame (Reeves *et al.*, 1993).

⁴ O comitê local para o cuidado e uso de animais experimentais tem enfatizado a necessidade de aumentar os esforços para reduzir o uso de animais em estudos experimentais. Estamos alinhados com esta preocupação. Nós reduzimos o número de animais no estudo, compartilhando as mães do grupo SC deste estudo com outro estudo do nosso grupo, mas mantendo a garantia da qualidade dos resultados (Bringhenti *et al.*, 2013).

A dieta padrão contém 2,5g de NaCl que está contido nos 35g da mistura de minerais, em 1000g de dieta, perfazendo um percentual de 0,25% de NaCl na dieta. Como o Na representa 40% do NaCl, tem-se 1g de Na em 1000g de dieta, perfazendo um percentual de 0,1% de Na na dieta.

A dieta hipersódica teve a adição de 40g de NaCl (adicionados aos 2,5g de NaCl, já presentes na mistura de minerais em 1000g de dieta). Esta dieta contém então 42,5g de NaCl em 1040g de dieta, perfazendo um percentual de 4,08% de NaCl. Há 17g de Na em 1040g de dieta, correspondendo um percentual de 1,6% de Na na dieta hipersódica.

Ambas as dietas experimentais foram fabricados pela PragSoluções (Jau, São Paulo, Brasil) e a composição nutricional está detalhada na Tabela 1.

Após 8 semanas em suas respectivas dietas, fêmeas com 12 semanas de idade foram acasaladas com machos C57BL/6 alimentados com dieta controle. No dia em que foi identificado o "plug" vaginal positivo, este foi considerado o primeiro dia da gestação. Fêmeas grávidas foram transferidas para caixas individuais e mantidas nas suas respectivas dietas durante a gestação e lactação.

Durante todo o período experimental foram mensuradas semanalmente a massa corporal (MC) e a ingestão de água das progenitoras; o consumo alimentar foi mensurado diariamente. As dietas experimentais foram renovadas diariamente e a ração não digerida foi descartada. O consumo alimentar dos camundongos foi mensurado pelo Compulse v 2.7.13 (Harvard / Panlab, Barcelona, Espanha) durante 72 h e, além disso, a ingestão alimentar foi monitorada diariamente (sempre no mesmo horário, às 12h), mediante subtração entre a quantidade total de ração fornecida e a quantidade de ração remanescente na caixa. O consumo de energia foi calculado como o produto do consumo alimentar pelo conteúdo energético da ração. Adicionalmente, a eficiência alimentar (EA) das progenitoras foi calculada a partir da relação entre o ganho de MC (em g) e o consumo alimentar (em KJ) por animal, apresentado como percentual. Os animais tiveram livre acesso as rações experimentais e a água.

No dia do nascimento o sexo dos filhotes foi identificado analisando a distância ânus-genital, que é dimórfica sexual em camundongos, com a distância ânus-genital do macho aproximadamente duas vezes maior que da fêmea (Hotchkiss e Vandenberg, 2005).

A seguir, a MC dos filhotes foi medida individualmente. Depois, o tamanho da ninhada foi fixado, aleatoriamente, em seis animais a fim de uniformizar a alimentação dos filhotes durante o período de lactação, garantindo a nutrição adequada para todos os filhotes (Langley-Evans *et al.*, 1996).

Os filhotes foram denominados de acordo com dieta materna, ou seja, filhotes SC foram provenientes das mães alimentadas com ração padrão; filhotes HS foram provenientes das mães alimentadas com ração hipersódica. Ambos os grupos de filhotes, SC e HS, foram estudados em três idades diferentes: no dia do nascimento (0 dia), aos 10 dias de idade, e aos três meses após o nascimento. Um macho de cada ninhada foi designado aleatoriamente para os grupos experimentais.

O mesmo protocolo foi utilizado para as ninhadas SC e HS. Em resumo, sete filhotes machos provenientes de sete ninhadas diferentes (tanto SC como HS) foram mortos ao nascimento ($n = 7$). Outros sete filhotes machos foram mortos com 10 dias de idade ($n = 7$). Após o desmame o restante dos filhotes machos foram separados e ao completarem três meses de idade foram mortos ($n = 6$). A massa corporal (MC) e o comprimento naso-anal (CNA) também foram aferidos no dia do nascimento, aos 10 dias de idade e aos três meses de idade.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais.

Diets Experimentais		
Ingredientes, g/kg	SC	HS
Caseína	190,0	190,0
Maisena	539.486	539.486
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Fibra	50,0	50,0
Mistura de vitaminas*	10,0	10,0
Mistura de minerais**	35,0	35,0
Cistina	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,014	0,014
Total	1.000,0	1.000,0
NaCl (adicional)	0,0	40,0
Total	1.000,0	1.040,0
Energia (Kcal/Kg)	3.950,0	3.950,0
Carboidrato (%)	64	64
Proteína (%)	19	19
Lipídios (%)	17	17

Nota: Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo a recomendação da AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993). Mistura de minerais** - contém na sua composição 2,5g de NaCl em 1000g de dieta.

3.2 Grupos de mães

3.2.1 Pressão arterial

Duas semanas antes do experimento, os animais foram condicionados ao procedimento, colocados no plestimógrafo para se habituarem ao equipamento e a manipulação. As medidas de pressão arterial sistólica (PA) foram feitas semanalmente (toda quinta-feira às 13 h) em camundongos conscientes durante as oito semanas pré-gestacionais, utilizando método não invasivo de pletismografia da artéria da cauda (Letica LE 5100, Harvard / Panlab, Barcelona, Espanha). Foi considerada a média de três medições em cada momento.

3.2.2 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e corticosterona sérica

Todas as progenitoras foram submetidas ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) antes da administração das dietas e após oito semanas do período pré-gestacional. As mães ficaram em jejum durante 6 h e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril- 0,9% NaCl) na dosagem de 1 g/kg. O sangue foi coletado da veia caudal após os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min, sendo que os níveis glicêmicos foram medidos com glicosímetro (Accu-Chek, Roche, Alemanha). Para a avaliação da intolerância à glicose foi considerada a "área sob a curva", no gráfico da evolução da glicemia, mensurada com o programa Prism (versão 6.03 para Windows, GraphPad, San Diego, CA, USA). O nível de glicemia no tempo 0 foi considerado o nível de glicose em jejum.

Após o desmame, as fêmeas foram profundamente anestesiadas com pentobarbital sódico (150 mg/kg) por via intraperitoneal. O tórax foi aberto e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O soro das mães foi obtido para a análise subsequente de corticosterona pelo método de ELISA. As concentrações séricas de

corticosterona foram determinadas a partir de um kit para camundongos (Corticosterone ELISA kit ab 108821; Abcam Inc, Cambridge, USA). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com um coeficiente de variação de 4,4% para corticosterona.

3.3 Grupos de filhotes

3.3.1 Biometria e eutanásia

A MC e o CNA foram avaliados desde o nascimento até três meses de idade. Vale ressaltar que os animais foram alimentados com uma dieta padrão desde o desmame até três meses de idade.

Ao nascimento e aos 10 dias de idade, os filhotes machos foram mortos por decapitação e a glicemia foi aferida usando glicosímetro (Accu-Check, Roche, Alemanha). Aos três meses de idade, foi realizado TOTG da mesma maneira como descrito para as progenitoras. Após duas semanas, os animais foram profundamente anestesiados (pentobarbital sódico intraperitoneal, 150 mg/kg) e em seguida mortos por exsanguinação. Amostras de sangue foram coletadas e o plasma foi obtido para análises bioquímicas subsequentes.

Em todas as idades (ao nascimento, aos 10 dias e aos três meses) os rins direitos foram dissecados, pesados e fixados para microscopia de luz (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1 M tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 h em temperatura ambiente. Os rins esquerdos foram congelados a -80° C para análises moleculares.

3.3.2 Pressão arterial

As PA foi aferida aos três meses de idade (toda quinta-feira às 13:00) em camundongos conscientes utilizando método não invasivo de pletismografia caudal

(Letica LE 5100, Harvard / Panlab, Barcelona, Espanha). A média de três medições em cada momento foi considerada. Desde duas semanas antes de completarem três meses de idade, os animais foram colocados no plestimógrafo para minimizar o estresse causado pelo procedimento.

3.3.3 Rim

Ao nascimento e aos 10 dias de idade os rins direitos dos filhotes foram dissecados, pesados e divididos longitudinalmente em duas metades, e rapidamente fixados (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1 M tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 h em temperatura ambiente e, em seguida, incluídos com a face cortada para baixo em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os blocos foram cortados em série com 5 µm de espessura e, então, corados com hematoxilina e eosina.

Glomérulos imaturos e maduros foram estimados ao nascimento e aos 10 dias (quando se estima estar terminada a glomerulogênese em roedores). Glomérulos imaturos foram identificados como aqueles que apresentavam formato em vírgula ou formato em S. Glomérulos maduros são vascularizados e formados por um aumento no citoplasma de podócitos e invaginações para o centro da área mesangial, criando uma estrutura relativamente circular ao corte (Figura 5) (Almeida e Mandarim-de-Lacerda, 2002; Almeida *et al.*, 2003).

Figura 5 – Fotomicrografia do rim



Nota: Fotomicrografia do rim, ilustrando as formas de glomérulos imaturos (de cima para baixo, formato em vírgula, formato em S) e maduro (abaixo).

Fonte: A autora, 2014.

Aos três meses de idade, o número e o volume médio de glomérulos foram estimados com estereologia. Após a dissecação da gordura ao redor do rim, os rins direitos foram pesados, e cortados ao meio longitudinalmente. A metade ventral foi fixada (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1 M tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 h em temperatura ambiente e, em seguida, foi incluído com a face de corte para baixo em Paraplast plus (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A estimativa do número de glomérulos foi realizada pelo método do *fractionator/disector*.

O bloco foi cortado em série com 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e montados em lâminas de vidro. Em uma série consecutiva de cortes, começando em um corte aleatório, vários “pares de disectors” foram construídos com intervalo de 20 µm (d), que representou cerca de 1/3 a 1/4 do diâmetro médio glomerular, determinado previamente. A partir daí um “par de disectors” foi selecionado considerando cada décimo corte a partir do primeiro corte escolhido de forma aleatória, e o terceiro corte a partir do décimo corte (*disector* físico – Fig. 6). Resumidamente, em cada “par de disectors” foram obtidas imagens digitais de áreas semelhantes em ambos os cortes, com base em pontos anatômicos de referência, com um microscópio Leica DMRBE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e a câmera Infinity 1-5c (Lumenera Co., Ottawa , ON, Canadá). As imagens foram obtidas com uma objetiva de 20x e aumento final de 200 vezes. A seguir, foram utilizados dois computadores portáteis idênticos com tela de 14 polegadas onde as duas imagens foram analisadas simultaneamente, a primeira imagem no primeiro computador e a segunda imagem no segundo computador. Em ambos os computadores portáteis, foi colocada uma área-teste (A_T) produzida com o programa Stepanizer via internet (www.stepanizer.com) (Tschanz *et al.*, 2011).

Foram contados os perfis glomerulares que apareceram na primeira imagem (computador da esquerda, considerado plano “look-up”), mas não no plano subsequente (computador da direita, considerado plano “look-down”). Também não se contou o glomérulo cortado pela “linha proibida” ou suas extensões (Gundersen, 1977).

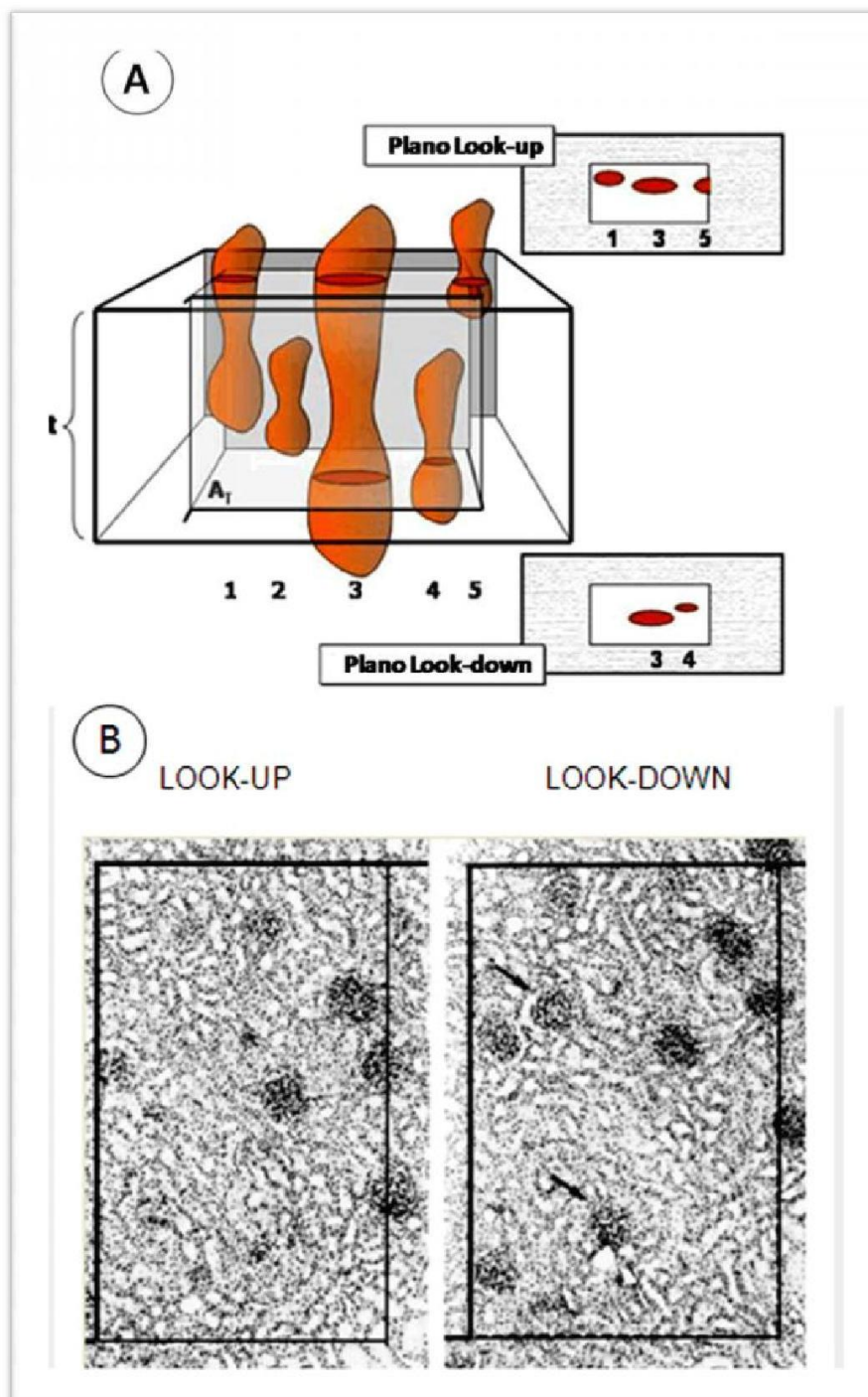
A densidade numérica dos glomérulos do rim direito ($N_v[\text{glom}]$) foi estimada como $N_v[\text{glom}] = \sum Q^- / d \cdot A_T$, onde Q^- é o número de perfis glomerulares contados com o *disector*, d é a distância entre os “*pares de disector*”. O número total de glomérulos do rim direito ($N[\text{glom}]$) foi estimado como $N[\text{glom}] = (1/f_1) \cdot (1/f_2) \cdot \sum Q^-$

considerando f1 e f2 como frações de amostragem (amostras da metade do rim, e as áreas dos cortes da amostra).

Nas imagens consideradas planos "look-up" foi depois colocado um sistema-teste com 49 pontos (P_T) produzida com o Stepanizer. A densidade de volume dos glomérulos $Vv[glom]$ foi estimada com a técnica de "contagem de pontos", sendo: $Vv[glom] = P[glom]/P_T$, sendo $P[glom]$ o número de pontos sobrejacentes aos glomérulos. O volume médio do glomérulo foi estimado pela razão entre $Vv[glom]/Nv[glom]$ (Nyengaard, 1999). Neste estudo não separamos glomérulos justamedulares de glomérulos corticais para fins de estimativas quantitativas.

Outro conjunto de cortes, incluindo os cortes não utilizados para o método do *fractionator/disector*, foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS, para realçar as membranas basais dos capilares glomerulares e do epitélio tubular e cápsula glomerular). Nestes cortes, considerou-se "glomérulo esclerosado" o glomérulo que apresentasse ruptura da cápsula glomerular ou colapso das alças capilares com uma cicatriz em qualquer parte do glomérulo. Estimou-se a razão entre glomérulos esclerosados e não-esclerosados, em percentagem, em pelo menos dez campos aleatórios da metade dorsal do córtex renal do rim direito de cada animal. As contagens foram feitas dentro de uma área-teste obtida com o programa Stepanizer (Santos *et al.*, 2013)

Figura 6 - Representação esquemática do método "disector"



Legenda: Representação esquemática do "disector" (A) e do "par de disectores" na técnica do "disector físico" usado no rim (B).

Fonte: (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

3.3.4 Função Renal

As amostras de urina foram coletadas aos três meses de idade, uma semana antes da eutanásia. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (n = 6 por grupo) e mantidos durante 48 h para se aclimatarem com livre acesso a comida e água. Depois foram mantidos durante três dias para medir o consumo de água e o volume de urina de 24 h. A urina foi coletada e centrifugada (120 g por 15 min) para remover os resíduos sólidos. Após 24 h, o débito urinário e a ingestão de água foram ajustados pela MC (mL/g MC). Foram medidas as concentrações de ureia, creatinina, proteinúria através do método colorimétrico (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil), e as concentrações dos eletrólitos sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) com o equipamento Drake Iselab eletrólitos Analyzer) (Iselab, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) *clearance* da creatinina = $(1000 \times [\text{volume da urina (mL)}] \times [\text{concentração da creatinina na urina (mg/dL)}] / [\text{concentração da creatinina sérica (mg/dL)}] / \text{massa corporal})$;
- b) *clearance* da ureia = $([\text{volume da urina (mL)}] \times [\text{concentração de ureia na urina (mg/dL)}] / [\text{concentração de ureia sérica (mg/dL)}] / \text{massa corporal})$;
- c) taxa de filtração glomerular (TFG) = (media aritmética entre *clearance* de creatinina e *clearance* da uréia/ massa corporal); (Pico *et al.*, 2012);
- d) Fração de excreção do sódio (FeNa⁺) = $([\text{sódio urinário/sódio sérico}] / [\text{creatinina urinária/creatinina sérica}])$;
- e) Fração de excreção do potássio (FeK⁺) = $([\text{potássio urinário /potássio sérico}] / [\text{creatinina urinária/creatinina sérica}])$;
- f) Fração de excreção da ureia (FeU) = $([\text{ureia urinária/ureia sérica}] / [\text{creatinina urinária/creatinina sérica}])$.

3.3.5 Western blotting

Após a eutanásia, rapidamente o rim esquerdo foi retirado e homogeneizado no gelo, com um homogeneizador durante 15 s em tampão contendo 25mM Tris-HCl, 100 µg PMSF, 2mM EDTA, 1% triton 100 e *cocktail* de inibidores de protease. O homogeneizado resultante foi centrifugado a 7.380 rpm a 4° C durante 20 min, e o sobrenadante foi coletado. As proteínas foram desnaturadas em banho seco durante 5 min a 5° C (Digital Dry bath, Accu Block, Labnet International, Inc.). A concentração de proteína lisada foi determinada utilizando um kit de avaliação de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Após desnaturação, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA).

As membranas foram então incubadas em leite em pó desnatado a 6% (w/v) dissolvido em T-TBS (Tampão tris salina), contendo Tris-HCL a 20 mmol /L (pH 7,4) e 500 mmol /L de NaCl por 1,5 h em temperatura ambiente para o bloqueio de sítios de ligações e sequencialmente incubada durante toda a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários:

- a) anti-renina (SC137252; Santa Cruz Biotechnology, 1:1000),
- b) anti-Ang-II (ab89892; Abcam, 1:1000),
- c) anti-AT1R (SC579, Santa Cruz Biotechnology; 1:1000),
- d) anti-AT2R (SC48452, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000),
- e) anti-podocina (SC21009, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000),
- f) anti-WT1 (SC192, Santa Cruz Biotechnology, 1:500).

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário durante 1h em temperatura ambiente.

A seguir a membrana foi incubada com reagente de detecção de quimioluminescência aumentada (ECL, Amersham BioCiencies, PiCataway, NJ, USA) e imagens do blot foram obtidas utilizando um sistema de imagem molecular ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade de quimioluminescência das bandas foi quantificada utilizando o software ImageJ,

versão 1.47j) (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA). O anticorpo monoclonal para beta-actina (anti-mouse, SC81178; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000) foi usado para corrigir os valores das proteínas utilizadas no estudo.

3.4 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram testados para a distribuição normal e a homogeneidade de variância, sendo reportados como média e erro padrão da média.

As diferenças entre os grupos foram estabelecidas com o teste-*t* de Student não pareado, ou por análise de variância (ANOVA) de um fator, com pós-teste de Holm-Sydk.

O teste exato de Fisher foi utilizado para testar as diferenças na frequência de progenitoras grávidas, bem como a taxa de mortalidade na prole.

Em todos os casos, o nível de significância adotado foi $P \leq 0,05$ (GraphPad Prism versão 6.03 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Dados maternos

4.1.1 Massa corporal e eficiência alimentar

O ganho de MC foi avaliado durante todo experimento. Durante as oito semanas antes da gestação, não houve diferença no ganho da MC entre o grupo SC e o grupo HS ($5,11 \pm 0,60$ g vs. $3,88 \pm 0,55$ g, $P=0,162$). Durante a gestação, o ganho de MC foi 2,71 vezes maior nas fêmeas do grupo HS do que nas fêmeas do grupo SC ($11,64 \pm 0,95$ g vs. $3,13 \pm 0,45$ g, $P<0,0001$). Antes da gestação, a EA não foi diferente entre os grupos SC e HS. Durante a gestação, EA foi 2,66 vezes maior nas fêmeas do grupo HS do que nas fêmeas do grupo SC ($6,92 \pm 0,59$ g /kJ vs. $1,89 \pm 0,27$ g /kJ, $P<0,0001$). No 10º dia do período de lactação, as fêmeas do grupo HS estavam 0,20 vezes mais pesadas do que as fêmeas do grupo SC ($23,8 \pm 1,03$ g vs. $19,7 \pm 0,42$ g, $P=0,001$). As fêmeas do grupo HS tiveram um aumento de 0,84 vezes na ingestão alimentar em relação às fêmeas do grupo SC ($5,9 \pm 0,40$ g/dia vs. $3,2 \pm 0,20$ g/dia, $P<0,0001$). Portanto, as fêmeas do grupo HS apresentaram um aumento de 0,86 vezes no consumo de energia em relação às fêmeas do grupo SC ($98,6 \pm 6,64$ kJ vs. $52,8 \pm 1,10$ kJ, $P<0,0001$) (Tabela 2).

De acordo com a AIN93G, 1g de alimento é composto por 0,64 g de hidrato de carbono, 0,20 g de proteína e 0,07 g de lipídio. Portanto, é possível calcular o consumo diário em gramas destes componentes alimentares. Para as mães SC, estimou-se $2,05 \pm 0,19$ g de hidrato de carbono, $0,64 \pm 0,04$ g de proteína, $0,22 \pm 0,01$ g de lipídio, e $3,2 \pm 4$ mg de Na. Para as mães HS, estimou-se $3,78 \pm 0,25$ g de hidrato de carbono, de $1,18 \pm 0,08$ g de proteína, $0,41 \pm 0,03$ g de lipídio, e $96,2 \pm 10$ mg de Na. As diferenças foram significativas, entre os grupos de mães SC e HS ($P<0,0001$) para todos os componentes.

4.1.2 Teste oral de tolerância à glicose

O TOTG foi realizado em dois momentos distintos: antes da administração das dietas e após as oito semanas de dietas experimentais (referente ao período pré-gestacional). No período que antecedeu a administração das dietas, não houve diferença no TOTG das progenitoras dos grupos SC e HS. Entretanto, ao final das oito semanas de dieta, as mães do grupo HS apresentaram níveis de glicose em jejum 0,63 vezes maior do que as mães do grupo SC ($7,7 \pm 0,13$ mmol/L vs.. $4,7 \pm 0,21$ mmol/L, $P < 0,0001$) e um aumento significativo da área sob a curva em relação ao grupo SC (0,22 vezes maior no grupo HS do que no grupo SC, $14,5 \pm 0,84$ a.u. vs.. $11,8 \pm 0,54$ a.u.; $P = 0,02$) (Tabela 2). Este resultado mostra que houve alteração do metabolismo dos carboidratos das mães do grupo HS.

4.1.3 Ingestão Hídrica

As mães do grupo HS apresentaram um consumo hídrico 2,00 vezes maior do que as mães do grupo SC ($10,8 \pm 11,3$ mL vs.. $3,6 \pm 1,6$ mL, $P = 0,0003$) (Tabela 2).

4.1.4 Pressão arterial e corticosterona sérica

A PA das mães foi aferida durante todo o período pré-gestacional. As mães do grupo HS apresentaram elevação importante dos valores pressóricos em relação às mães do grupo SC (0,43 vezes maior no grupo HS do que no grupo SC; $181,1 \pm 2,32$ mmHg vs.. $126,4 \pm 2,41$ mmHg, $P < 0,0001$) (Tabela 2).

Em relação às concentrações de corticosterona sérica, as mães do grupo HS apresentaram aumento significativo de corticosterona quando comparadas às mães do grupo SC (2,00 vezes maior no grupo HS do que no grupo SC; $8,8 \pm 1,40$ ng/ml vs. $2,9 \pm 0,19$ ng/ml, $P = 0,01$) (Tabela 2).

Tabela 2- Dados das progenitoras que receberam dieta padrão (SC) ou dieta hipersódica (HS) durante as oito semanas antecedentes a gestação e durante a gestação (valores em média \pm EPM), n=10..

Progenitoras	SC	HS	P
Eficiência alimentar pré-gestacional, g/kJ	0,99 \pm 0,04	1,13 \pm 0,13	Ns
Eficiência alimentar durante a gestação, g/kJ	1,89 \pm 0,27	6,92 \pm 0,59	<0,0001
Massa corporal (10 dias do período de lactação), g	19,7 \pm 0,42	23,8 \pm 1,03	0,001
Ingestão alimentar (período de lactação), g/dia/animal	3,2 \pm 0,20	5,9 \pm 0,40	<0,0001
Consumo energético (período de lactação), kJ/dia/animal	52,8 \pm 1,10	98,6 \pm 6,64	<0,0001
TOTG antes da administração das dietas, ASC, a.u.	13,2 \pm 0,36	13,2 \pm 0,53	Ns
TOTG após 8 semanas (período pré-gestacional), AUC, a.u.	11,8 \pm 0,54	14,5 \pm 0,84	0,02
Glicemia de jejum, mmol/L	4,7 \pm 0,21	7,7 \pm 0,13	<0,0001
Ingestão hídrica, mL/dia	3,6 \pm 1,60	10,8 \pm 11,30	0,0003
Cortiscosterona, ng/mL	2,9 \pm 0,19	8,8 \pm 1,40	0,01
Pressão arterial (antes da gestação), mmHg	126,4 \pm 2,41	181,1 \pm 2,32	<0,0001

Nota: As diferenças entre os grupos são indicados pelo valor do P (teste-t não pareado). Legenda: u.a. = Unidades arbitrárias; ASC = área sob a curva; ns = não significativo; TOTG = teste oral de tolerância à glicose

4.2 Dados da prole

4.2.1 Ao nascimento

O tamanho das ninhadas e a massa corporal dos filhotes não foram diferentes entre os grupos SC e HS. Entretanto, a mortalidade neonatal foi maior na prole de mães HS do que na prole de mães SC ($P=0.002$) (Tabela 3).

Tabela 3- Dados da prole de mães que receberam dieta padrão (SC) ou dieta hipersódica (HS) desde oito semanas antes da gestação e durante a gestação e lactação (valores em média \pm EPM), $n=7$.

Dados da prole (ao nascimento)	SC	HS	P
Relação macho-fêmea	1:1	1:1	ns
Tamanho da ninhada	7 \pm 1	7 \pm 1	ns
Massa corporal, g	1,30 \pm 0,03	1,26 \pm 0,15	ns
Número de natimortos por grupo de mães,%	3/126	20/114	0,002

Nota: As diferenças entre os grupos são indicados pelo valor do P (teste-t não pareado ou teste exato de Fisher). Legenda: ns = não significativo.

4.2.2 Massa corporal e massa renal

A MC não apresentou diferença entre os filhotes dos grupos HS e SC, ao nascimento (1,26 \pm 0,07 g vs.. 1,29 \pm 0,01 g; $P=0,679$), aos 10 dias de idade (5,09 \pm 0,10g vs.. 5,30 \pm 0,24 g; $P=0,435$), e aos três meses de idade (23,75 \pm 0,59 g vs.. 22,60 \pm 1,14 g; $P=0,388$).

Ao nascimento não foi observada diferença na razão da massa renal/ MC entre os filhotes dos grupos HS e SC (0,0046 \pm 0,0002 vs.. 0,0043 \pm 0,0001; $P=1,0$).

Entretanto, as diferenças foram significativas aos 10 dias de idade ($0,0055 \pm 0,0002$ vs.. $0,0046 \pm 0,0001$; $P < 0,001$), e aos três meses de idade ($0,0052 \pm 0,0002$ vs.. $0,0045 \pm 0,0001$; $P < 0,001$) (Tabela 4).

4.2.3 Glicemia

Em relação aos níveis de glicose sanguínea, não houve diferença entre os filhotes dos grupos HS e SC ao nascimento ($2,0 \pm 0,16$ mmol/L vs.. $2,0 \pm 0,30$ mmol/L; $P=1,0$) e aos 10 dias de idade ($6,9 \pm 0,36$ mmol/L vs.. $7,1 \pm 0,04$ mmol/L; $P=0,591$).

Aos três meses de idade, os níveis de glicose sanguínea nos filhotes do grupo HS foram 0,48 vezes maiores do que os filhotes do grupo SC ($7,8 \pm 0,37$ mmol/L vs.. $11,6 \pm 0,57$ mmol/L, $P < 0,0001$) (Tabela 4).

4.2.4 Pressão arterial

Aos três meses de idade a PA foi maior 0,21 vezes nos filhotes do grupo HS do que nos filhotes do grupo SC ($115,4 \pm 2,3$ mmHg vs.. $140,2 \pm 4,5$ mmHg; $P=0,001$) (Tabela 4).

4.2.5 TOTG

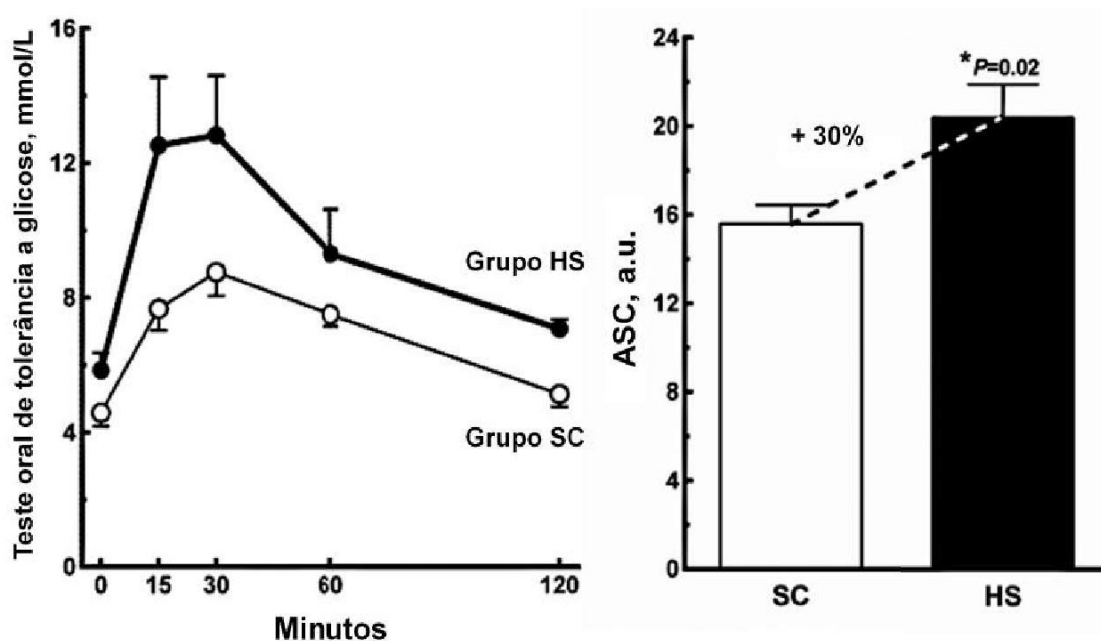
Aos três meses de idade, o TOTG foi 0,30 vezes maior nos filhotes do grupo HS do que nos filhotes do grupo SC ($20,354 \pm 1,469$ a.u vs. $15,585 \pm 829,0$ a.u.; $P=0,02$), indicando uma intolerância à glicose no grupo HS (Figura 7).

4.2.6 Rim

Aos 10 dias de idade, os filhotes do grupo HS apresentaram imaturidade glomerular maior do os que os filhotes do grupo SC. Os percentuais de maturidade nos filhotes do grupo HS e SC foram $94 \pm 0,3 \%$ vs. 100% , respectivamente ($P < 0,0001$).

Aos três meses de idade, o número de glomérulos foi 0,50 vezes menor nos filhotes do grupo HS em relação aos filhotes do grupo SC ($P < 0,0001$) (Figuras 8 e 9), e o volume glomerular foi 2,00 vezes maior nos filhotes do grupo HS do que nos filhotes do grupo SC ($P = 0,0009$) (Figura 10). Adicionalmente, os filhotes do grupo HS apresentaram um aumento de 2,60 vezes no índice de esclerose glomerular do que os filhotes do grupo SC ($36 \pm 3 \%$ vs. $10 \pm 2 \%$; $P < 0,0001$) (Figura 8 e Tabela 4).

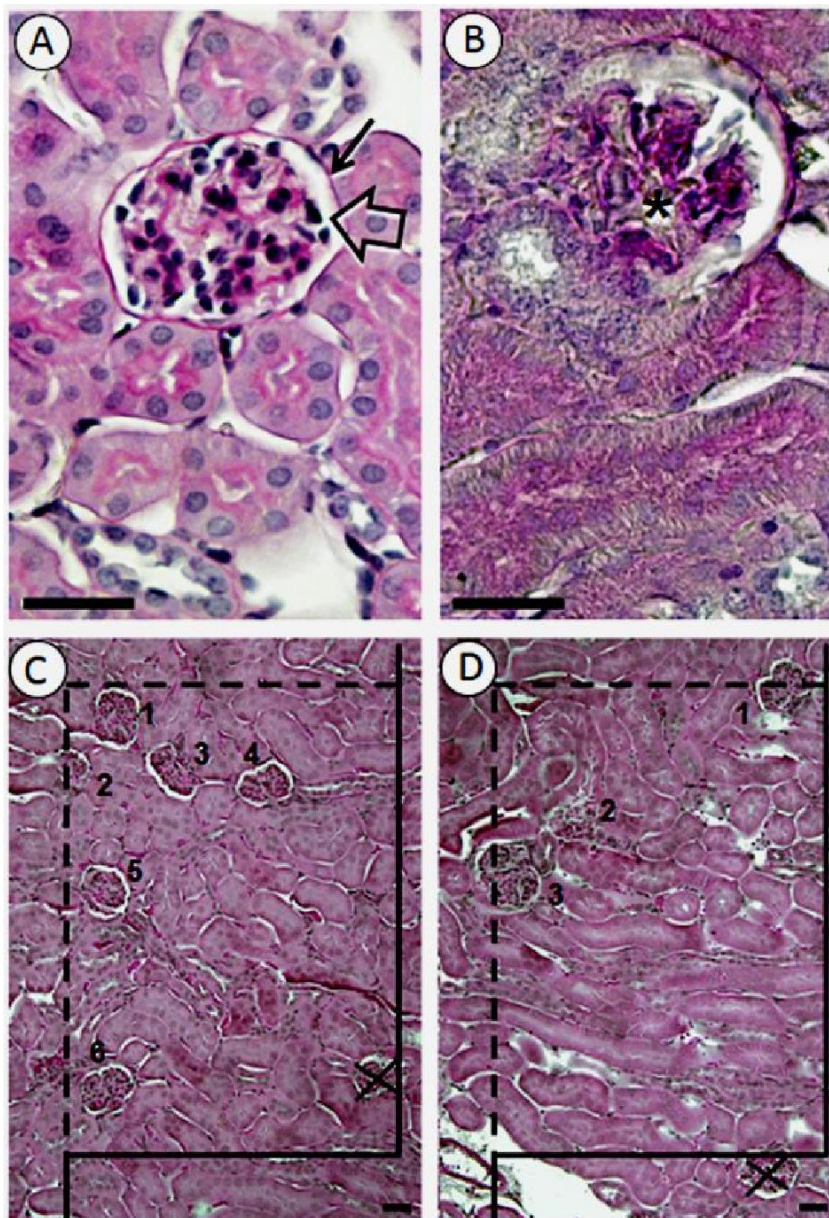
Figura 7 - Tolerância à glicose da prole



Nota: Teste Oral de Tolerância à Glicose da prole aos três meses de idade.

Legenda: Valores em média \pm EPM; $n = 5$. As diferenças foram avaliadas com teste-t não pareado. Nos casos assinalados, $P < 0,05$, [*] quando comparado ao SC. Abreviações: ASC, área sob a curva, a.u., unidades arbitrárias; SC, grupo dieta materna padrão; HS, grupo dieta materna hipersódica.

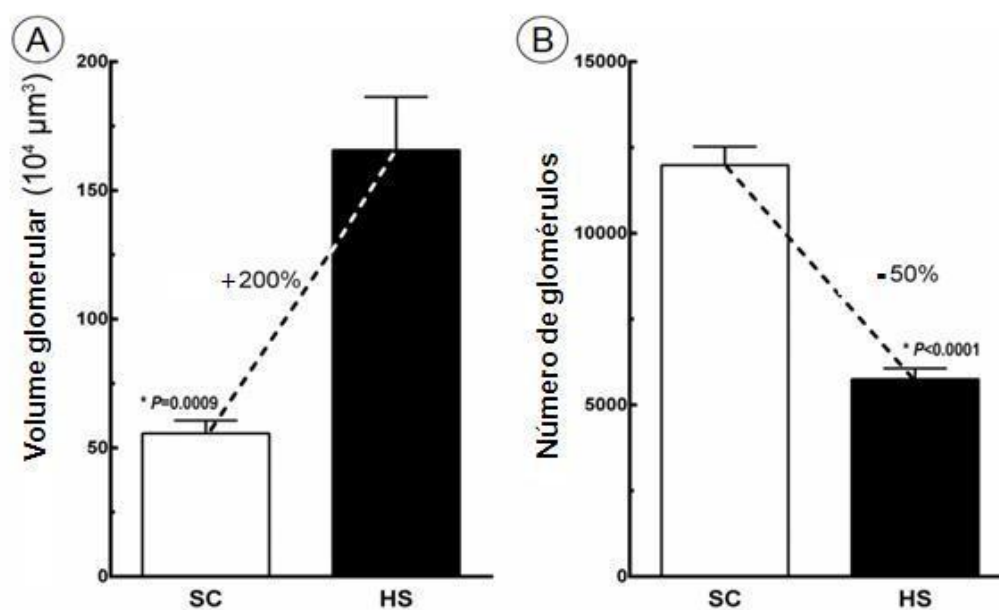
Figura 8 - Esclerose e número glomerular da prole



Nota: Fotomicrografias do córtex renal da prole aos três meses de idade (barra de calibração = 50 μ m).

Legenda: (A) prole SC (coloração PAS), mostrando um glomérulo perfeito com cápsula glomerular contínua (seta), espaço capsular (seta aberta) e capilares abertos no tufo glomerular. (B) prole HS (coloração PAS), com um glomérulo esclerosado mostrando a cápsula glomerular interrompida e uma cicatriz no meio do glomérulo (*). (C) prole SC (coloração HE) e (D) prole HS (coloração HE): fotomicrografias com uma área teste sobreposta, com a "linha proibida" (linha contínua), incorporada. Temos seis glomérulos em (C), e três glomérulos em (D). As cruzes representam glomérulos atingidos pela "linha proibida". Além disso, observam-se maiores glomérulos em (D) do que em (C). Abreviações: SC, grupo dieta ma terna padrão; HS, grupo dieta materna hipersódica.

Figura 9 - Volume e número glomerular da prole



Nota: Dados glomerulares da prole aos 3 meses de idade.

Legenda: Valores em média \pm EPM; $n = 5$. As diferenças foram avaliadas com teste-t não pareado. Nos casos assinalados [*], $P<0,05$.

Tabela 4 – Dados da prole de mães que receberam dieta padrão (SC) ou dieta hipersódica (HS) desde oito semanas antes da gestação e durante a gestação e lactação (valores em média \pm EPM), n=5.

Prole	Dia 0 (n=5)		Dia 10 (n=5)		Dia 90 (n=5)	
	SC	HS	SC	HS	SC	HS
Massa Corporal, g	1,29 \pm 0,01	1,26 \pm 0,07	5,09 \pm 0,10 ^x	5,30 \pm 0,24 ^x	23,75 \pm 0,59 ^{x§}	22,60 \pm 1,14 ^{x§}
Massa renal/Massa corporal ($\times 10^{-2}$),	0,46 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,55 \pm 0,02	0,46 \pm 0,01 [*]	0,52 \pm 0,02	0,45 \pm 0,01 [*]
Glicose, mmol/L	2,0 \pm 0,30	2,0 \pm 0,16	7,1 \pm 0,04 ^x	6,9 \pm 0,36 ^x	7,8 \pm 0,37 ^x	11,6 \pm 0,57 ^{x§}
Maturidade dos corpúsculos, %	42 \pm 0,2	38 \pm 0,3 [*]	100 ^x	94 \pm 0,3 ^{x*}	100 ^x	100 ^{x§}
Número de glomérulos, mm ⁰	-	-	-	-	11.990 \pm 537	5.751 \pm 314 [*]
Volume glomerular médio, μm^3	-	-	-	-	556 \pm 50,2	1.657 \pm 206,8 [*]
Índice de esclerose glomerular, %	-	-	-	-	10 \pm 2	36 \pm 3 [*]
Pressão arterial, mmHg	-	-	-	-	115,4 \pm 2,3	140,2 \pm 4,5 [*]
Frequência cardíaca, bpm	-	-	-	-	423 \pm 4	412 \pm 4

Nota: As diferenças foram avaliadas com one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sydk. Aos 90 dias, alguns dados existentes apenas nesses grupos foram testados com o teste-*t* não pareado. Nos casos assinalados, *P* < 0,05, [*] quando comparado com o SC; [x] comparado a 0 dia; [§] comparado a 10 dias. Grupos: SC, prole de mães alimentadas com dieta SC; HS, prole de mães alimentadas com dieta HS.

4.2.7 Função renal

Aos três meses de idade, o débito urinário de 24 h ajustado pela MC foi significativamente menor nos filhotes do grupo HS do que nos filhotes do grupo SC ($P=0,01$). A excreção de creatinina urinária também encontra-se reduzida nos filhotes do grupo HS, quando comparada com os filhotes do grupo SC ($P=0,01$). A elevação da creatinina sérica nos filhotes do grupo HS indica o comprometimento da função renal nestes animais, quando comparado aos controles ($P<0,0001$). Aos três meses de idade, como consequência dos eventos que acompanharam a dieta, a média do *clearance* de creatinina nos filhotes do grupo HS estava em apenas 10% daquela apresentada pelos filhotes do grupo SC ($P=0,004$).

No mesmo sentido, a ureia urinária foi menor nos filhotes do grupo HS ($P=0,02$) e a ureia sérica estava mais elevada nos filhotes do grupo HS ($P<0,0001$). Portanto, o *clearance* de ureia foi 0,90 vezes menor nos filhotes do grupo HS quando comparado com os filhotes do grupo SC ($P=0,01$). Consequentemente, se atribuímos os valores da Taxa de Filtração Glomerular como a média dos *clearances* de ureia e creatinina, constatamos que filhotes do grupo HS apresentaram apenas 11% da função verificada nos animais do grupo controle ($P=0,002$).

A fração de excreção de sódio foi calculada e se mostrou cerca de 15 vezes maior nos filhotes do grupo HS ($P<0,0001$); a fração de excreção de potássio foi 21 vezes maior nos filhotes do grupo HS ($P= 0,006$) e a fração de excreção da ureia foi cerca de 5 vezes maior nos filhotes do grupo HS ($P=0,04$). A proteinúria que é um indicador de lesão glomerular, foi de $4,64\pm 1,6$ g/L nos filhotes do grupo HS contra $0,68\pm 0,1$ g/L nos filhotes do grupo SC ($P= 0,04$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Função renal da prole aos três meses de idade (valores em média \pm EPM), n=5.

Dados	SC (n=5)	HS (n=5)	P
Ingestão hídrica (mL/dia/animal)	5,2 \pm 4,31	7,1 \pm 5,22	ns
Diurese (ml/dia)	1,7 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,01
Creatinina urinária (mg/dL)	53,06 \pm 5,52	28,60 \pm 5,13	0,01
Creatinina sérica (mg/dL)	1,41 \pm 0,03	11,44 \pm 0,02	<0,0001
<i>Clearance</i> de creatinina (mL/min/g)	1,56 \pm 0,17	0,15 \pm 0,02	0,004
Uréia urinária (mg/dL)	105,49 \pm 8,29	51,97 \pm 15,70	0,02
Uréia sérica (mg/dL)	13,10 \pm 0,35	17,78 \pm 0,06	<0,0001
<i>Clearance</i> da ureia (mL/min/g)	0,41 \pm 0,07	0,04 \pm 0,01	0,01
Taxa de filtração glomerular (mL/min/g)	0,86 \pm 0,12	0,09 \pm 0,02	0,002
Fração de excreção de sódio	1,42 \pm 0,09	22,69 \pm 3,2	<0,0001
Fração de excreção de potássio	0,02 \pm 0,001	0,45 \pm 0,117	0,006
Fração de excreção da ureia	0,21 \pm 0,01	1,12 \pm 0,39	0,04
Proteinúria (g/L)	0,68 \pm 0,1	4,64 \pm 1,6	0,04

Nota: As diferenças entre os grupos são indicados pelo valor do P (teste-t não pareado). Grupos: SC, prole de mães alimentadas com dieta SC; HS, prole de mães alimentadas com dieta HS.

4.2.8 Expressão de proteínas

Os dados do *Western blotting* foram corrigidos pela expressão de beta-actina, que foi utilizada como um controle. Não foram observadas diferenças na expressão de beta-actina entre os grupos SC e HS (dados não mostrados).

a) renina, angiotensina II, AT1R, AT2R

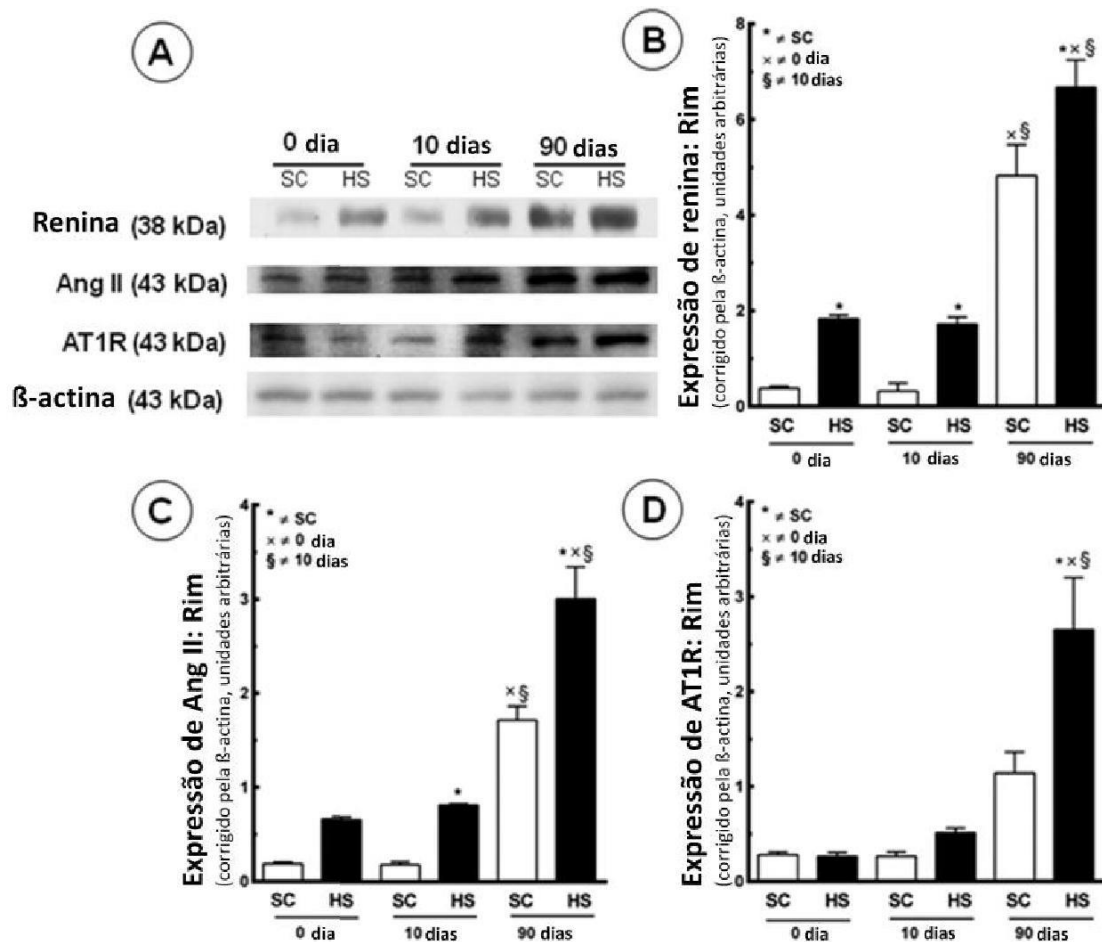
A expressão de renina foi significativamente maior nos filhotes do grupo HS quando comparado com os filhotes do grupo SC: ao nascimento (3,82 vezes maior no grupo HS do que no grupo SC, $P=0,04$), aos 10 dias de idade (4,39 vezes maior no grupo HS do que no grupo SC, $P=0,04$), e aos três meses de idade (0,38 vezes maior no grupo HS do que no grupo SC ($P=0,01$)) (Figura 10).

Não houve diferença na expressão de Ang-II entre os filhotes dos grupos HS e SC ao nascimento. Entretanto, aos 10 dias de idade, os filhotes do grupo HS apresentaram uma expressão de Ang-II 3,49 vezes maior no grupo HS do que no grupo SC ($P=0,04$). Aos três meses de idade, ambos os grupos de filhotes (SC e HS) apresentaram um aumento na expressão de Ang-II, quando comparados aos seus respectivos grupos ao nascimento (8,33 vezes maior no grupo SC três meses do que no grupo SC ao nascimento, $P<0,0001$, e 3,55 vezes maior no grupo HS três meses do que no grupo HS ao nascimento, $P<0,0001$), e aos 10 dias de idade (8,45 vezes maior no grupo SC três meses do que no grupo SC 10 dias, $P<0,0001$, e 2,68 vezes maior no grupo HS três meses do que no grupo HS 10 dias, $P<0,0001$) (Figura 10).

Não houve diferença na expressão de AT1R entre os filhotes dos grupos HS e SC ao nascimento e aos 10 dias de idade. Aos três meses de idade, entretanto, os níveis de AT1R foi 1,32 vezes maior nos filhotes do grupo HS do que nos filhotes do grupo SC ($P=0,002$) (Figura 10).

Aos três meses de idade, a expressão de AT2R foi menor 0,45 vezes nos filhotes do grupo HS quando comparado com os filhotes do grupo SC ($P=0,03$).

Figura 10 - Nível protéico renal de renina, Ang II e AT1R na prole



Nota: Análise da expressão de proteínas no rim, ao nascimento, aos 10 dias de idade e aos 3 meses de idade.

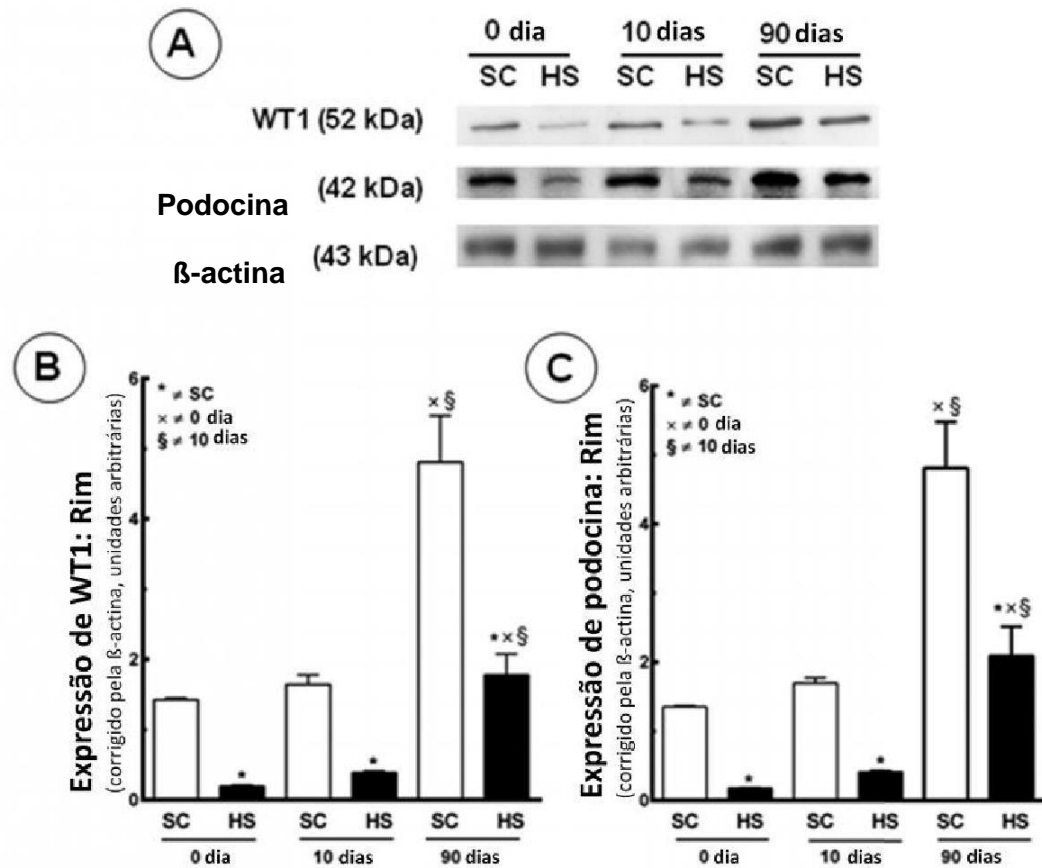
Legenda: (A) blots representativos da expressão das proteínas; (B) expressão de renina; (C) expressão de Ang- II; (D) expressão de AT1R. Os dados foram padronizados pela expressão de beta-actina (valores em média \pm EPM; n= 5). As diferenças foram avaliadas com one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Nos casos assinalados, $P < 0,05$; [*] quando comparado ao SC; [x] comparado a 0 dia; [§] comparado a 10 dias. Abreviação: Ang-II, Angiotensina II; AT1R, receptor de angiotensina II 1; Grupos: SC, prole de mães alimentadas com dieta SC; HS, prole de mães alimentadas com dieta HS.

b) WT1 e Podocina

A expressão de WT1 foi 0,89 vezes menor nos filhotes do grupo HS quando comparada com os filhotes do grupo SC ao nascimento ($P=0,04$), 0,88 vezes menor no grupo HS do que no grupo SC, aos 10 dias de idade ($P=0,04$) e 0,63 vezes menor no grupo HS do que no grupo SC, aos três meses de idade ($P<0,0001$) (Figura 11).

A expressão de podocina foi 0,89 vezes menor nos filhotes do grupo HS quando comparada com os filhotes do grupo SC ao nascimento ($P= 0,04$), 0,88 vezes menor no grupo HS do que no grupo SC, aos 10 dias de idade ($P=0,04$) e 0,57 vezes menor no grupo HS do que no SC, aos três meses de idade ($P<0,0001$) (Figura 11).

Figura 11 – Nível proteico renal de WT1 e podocina na prole



Nota: Análise da expressão de proteínas no rim, ao nascimento, aos 10 dias de idade e aos 3 meses de idade.

Legenda: (A) blots representativos da expressão das proteínas; (B) expressão de WT1; (C) expressão de podocina. Os dados foram padronizados pela expressão de beta-actina (valores em média ± EPM; n= 5). As diferenças foram avaliadas com one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Nos casos assinalados, P<0,05; [*] quando comparado ao SC; [x] comparado a 0 dia; [§] comparado a 10 dias. Abreviação: WT1, Gene supressor de tumor de Wilms; Grupos: SC, prole de mães alimentadas com dieta SC; HS, prole de mães alimentadas com dieta HS.

5 DISCUSSÃO

Conforme demonstramos, quando as mães ingerem uma dieta hipersódica resultam alterações significativas no desenvolvimento dos rins de sua prole. Vale lembrar que os filhotes foram alimentados com dieta normossódica durante toda a sua vida.

O período de lactação é uma das etapas mais importantes do desenvolvimento dos mamíferos, uma vez que o leite é a única fonte de alimento até ao início da alimentação independente (Fiorotto *et al.*, 1991). A nutrição materna durante este período pode ser fundamental na programação da saúde metabólica da prole. Em roedores, não se deve esquecer que o período de lactação, ao menos até a cercania do 10^o dia após o nascimento, é um período em que a organogênese está sendo finalizada. Neste sentido, a identificação das condições nutricionais e ambientais materna, que podem afetar a composição do leite, torna-se muito importante na prevenção de doenças futuras na prole (Pico *et al.*, 2012).

A prole de mães alimentadas com dieta hipersódica teve uma redução no número final de glomérulos, com conseqüente aumento da PA. Adicionalmente, as expressões renais de diversas proteínas importantes, tais como: renina, Ang-II, AT1R, AT2R, podocina e WT1 foram alteradas na prole dessas mães. Além disso, os filhos de mães submetidas à dieta hipersódica, quando adultos, mostraram alteração de indicadores da função renal, quando comparados os filhos de mães com dieta normossódica. Essa observação contribui para evidências crescentes que indicam que a disfunção renal e alterações na PA estão ligadas às condições de saúde materna, tais como obesidade e diabetes gestacional (Brighenti *et al.*, 2013; Ornellas *et al.*, 2013), desnutrição (Almeida e Mandarim-de-Lacerda, 2005a; Villar-Martini *et al.*, 2009), carências de micronutrientes, como a vitamina D (Nascimento *et al.*, 2012), e a exposição a determinadas substâncias durante a gestação, tais como o sódio (Chong e Yosypiv, 2012).

Em um estudo experimental prévio, observou-se que a administração de dieta com alto teor de gordura rica em sódio levou a alterações ultraestruturais de miócitos cardíacos, aumento da produção de peptídeo natriurético atrial com redução da quantidade de renina no rim (Costa *et al.*, 2012). No presente estudo, as mães

alimentadas com uma dieta hipersódica apresentaram aumento no ganho de MC e da EA, em relação as mães alimentadas com dieta normossódica no mesmo período.

Uma das consequências mais evidentes de um ambiente intrauterino ou neonatal de qualidade inferior é a redução do peso do filho ao nascimento, que tem sido utilizada como indicador de "programação fetal" (de Gusmao Correia *et al.*, 2012). Não houve diferença significativa na massa total dos filhotes e no tamanho da ninhada entre os grupos HS e SC do presente estudo. Estudos anteriores corroboram esse resultado, demonstrando que alguns tipos de "programação fetal", principalmente os que não alteram o teor proteico e a energia final da dieta, podem ter efeitos sobre o rim mesmo sem qualquer efeito na MC ao nascimento (Kett e Bertram, 2004; Moritz *et al.*, 2009). Em animais adultos, a administração de dieta hipersódica está associada com diminuição da sensibilidade à insulina e ao aumento dos níveis de glicocorticoides em ratos hipertensos sensíveis ao sódio (Usukura *et al.*, 2009).

Uma das principais vias de insultos maternos que podem resultar em redução da nefrogênese e da massa renal, é a via que expõe o feto a altos níveis de glicocorticoides (Kett e Denton, 2011). A administração de glicocorticoides exógenos em ratas grávidas leva a redução do número de néfrons, possivelmente por baixa na regulação de genes relacionados à morfogênese do broto do ureter e resulta em hipertensão arterial na vida adulta (Figueroa *et al.*, 2005; Dickinson *et al.*, 2007). O aumento da sensibilidade ao glicocorticoide, em casos de exposição fetal aumentada aos glicocorticoides, é semelhante aos efeitos observados na programação fetal por restrição proteica materna ou desnutrição global durante a gravidez (Almond *et al.*, 2012). Este resultado é compatível com a observação de que os níveis séricos de corticosterona estavam aumentados nas mães que receberam dieta hipersódica no presente estudo.

Também se observou intolerância à glicose/RI nas mães que receberam dieta hipersódica. A ingestão excessiva de sódio pode impedir a captação de glicose pelas células dos tecidos periféricos e, assim, levar a diminuição tardia das concentrações de glicose no plasma após uma carga de glicose (ter Maaten *et al.*, 1999; Giner *et al.*, 2001). Os mecanismos que estabelecem relação entre a sensibilidade ao sódio e a captação periférica de glicose ainda não estão bem definidos. A RI e a intolerância

à glicose estão associadas com um aumento do risco de surgimento da hipertensão arterial na gravidez, a pré-eclâmpsia, o que apoia à hipótese de que a RI pode desempenhar um papel na patogênese desta doença (Vidinho *et al.*, 2004; Negrato *et al.*, 2009). A associação entre a expressão local do SRA e o pâncreas endócrino pode explicar a concomitância de RI e hipertensão arterial (Carlsson, 2001; Frantz *et al.*, 2013). Além disso, não podemos descartar o efeito do aumento do consumo alimentar por parte das mães que receberam dieta hipersódica e os resultados do TOTG e glicemia de jejum no presente estudo.

A Ang-II pode ter grande responsabilidade em desencadear um processo inflamatório pela indução do estresse oxidativo, resultando na regulação positiva dos mediadores inflamatórios (Ferrario e Strawn, 2006). A Ang-II também desempenha papel importante na mediação da RI (Henriksen, 2007; Saiki *et al.*, 2009) e na diminuição da tolerância à glicose (Mitsuishi *et al.*, 2009), o que contribui para o desenvolvimento do DM2. Desta forma, este mecanismo pode estar envolvido com uma alteração do metabolismo de carboidratos nas fêmeas alimentadas com uma dieta hipersódica.

A função renal foi muito alterada na prole de mães com dieta hipersódica, tendo o *clearance* de creatinina, o *clearance* da ureia e a TFG significativamente reduzidos, enquanto que as frações de excreção de sódio e potássio foram aumentadas. Além disso, a prole de mães com dieta hipersódica apresentou elevados níveis de proteinúria, o que por si só é um indicador de aumento de risco a curto prazo para o desenvolvimento da doença renal (Alt *et al.*, 1980; Ando *et al.*, 2011). Todos estes parâmetros são importantes para demonstrar como a dieta materna hipersódica pode prejudicar a função renal da prole, ao menos na primeira geração. Um estudo subsequente que se apresenta é o de observar como outras gerações subsequentes se comportariam. Há estudos no Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular feitos com duas gerações subsequentes àquela cujas mães sofreram algum tipo de insulto, e, em alguns casos, foi observado que a F2 ainda é afetada pelo insulto de mães F0 (Pinheiro *et al.*, 2008; Frantz *et al.*, 2011; Peixoto-Silva *et al.*, 2011).

O *clearance* de creatinina é um indicador confiável para avaliar a função excretora renal, porque reflete com precisão os efeitos a longo prazo das alterações da função renal (Bauer *et al.*, 2000), mesmo o *clearance* de inulina sendo

considerado um indicador melhor (Hernandez Ocampo *et al.*, 2010).

Os filhotes HS aos três meses de idade desenvolveram alterações bioquímicas séricas e urinárias que são totalmente compatíveis com o estado urêmico secundário à doença renal crônica e são consistentes com as mudanças estruturais encontradas nas avaliações histopatológicas. A perda de massa renal e reduções crônicas na população de néfrons induzem adaptações paralelas aos processos de transporte tubular, incluindo alterações no transporte de sódio. Experimentalmente, há evidências de que a fração de excreção de sódio é inversamente proporcional à taxa de filtração glomerular (Hayslett, 1979). No presente estudo, o nível sérico de sódio não foi diferente entre a prole HS e SC, indicando que a fração de excreção de sódio elevada nos filhotes HS não foi devido a níveis séricos muito elevados, mas sim pela baixa proporção de reabsorção de sódio tubular. Além disso, nos animais urêmicos, uma fração de excreção de sódio elevada não se correlaciona necessariamente com um nível de sódio sérico elevado, e nem necessariamente implica na redução da pressão arterial. Não houve diferença significativa no consumo de água e na ingestão alimentar entre a prole HS e SC aos três meses de idade ($P = 0,20$) (dados não mostrados). Assim, o débito urinário reduzido nos filhotes HS é compatível com diminuição da função renal.

A ingestão de uma dieta materna hipersódica parece resultar em alterações na estrutura e função do rim semelhantes àquelas produzidas pela restrição proteica durante a gestação (Wyrwoll *et al.*, 2007). Adicionalmente, a ingestão de uma dieta materna hipersódica durante a gestação leva a uma hipodisplasia renal em camundongos com deficiência de receptor β_2 da bradicinina, indicando que fatores ambientais podem atuar em conjunto com as mutações de um único gene causando um desenvolvimento renal anormal (El-Dahr *et al.*, 2000).

Estudos epidemiológico e clínico demonstraram que a ingestão de sal é um fator significativo na determinação do nível de pressão arterial, e, desse modo, da prevalência de hipertensão arterial (Carvalho *et al.*, 1989; Cutler *et al.*, 1997). Gu *et al.* demonstraram que a hipertensão pode ser induzida por uma dieta prolongada com alto teor de sódio e que está associada com aumento de lesão renal e mudanças significativas nos perfis de expressão gênica de citocinas renais, que estão intimamente relacionados com resposta pró-inflamatória, formação de matriz e disfunção endotelial (Gu *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Di Nicolantonio *et*

al., observou-se redução na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) adultos, que nasceram de mães que foram alimentadas com uma dieta de restrição de sódio durante a gestação (Di Nicolantonio *et al.*, 1990).

Além disso, em roedores, a ingestão materna excessivamente alta ou baixa de sódio causa uma expressão anormal de genes críticos para organogênese metanéfrica normal e reduzem o número final de glomérulos na prole, predispondo à hipertensão arterial na vida adulta (Swenson *et al.*, 2004; Koleganova *et al.*, 2011). Isto está concordante com os resultados do presente estudo. A hipertensão arterial persistente observada na prole de mães alimentadas com uma dieta hipersódica provavelmente se deve à sobrecarga de sódio ofertada às mães durante o período inicial do desenvolvimento fetal, induzindo a importantes adaptações, especialmente no SRA (Contreras *et al.*, 2000; Moritz *et al.*, 2008). Uma dieta com alto teor de sódio induz a ativação inapropriada dos SRA local, o que pode ser observado em pacientes sensíveis ao sódio que têm PA alta e baixa atividade de supressão de renina plasmática em resposta à elevada ingestão de sódio (Drenjancevic-Peric *et al.*, 2011).

O SRA desempenha um papel importante não só na regulação da pressão arterial e da função renal no adulto, mas também no desenvolvimento estrutural e funcional do rim fetal, com isso o SRA intrarrenal se tornou foco nos estudos que investigam possíveis mecanismos em modelos de programação de doença cardiovascular e renal (Moritz *et al.*, 2008).

No geral, os estudos até o momento sugerem que as alterações no SRA desempenham um papel na patogênese da hipertensão e no desenvolvimento da programação. No entanto, os relatórios têm sido conflitantes com alta ou baixa regulação de quase todos os componentes do SRA intrarrenal. Em grande parte, isso se deve à multiplicidade de modelos empregados e a ampla faixa etária em que as proles foram estudadas. Em termos gerais, no entanto, os dados em modelos de programação sugerem uma resposta bifásica temporal com a expressão reduzida do SRA no recém-nascido, que se torna normalizada com a idade. No entanto, deve-se notar que esta normalização no adulto pode, na verdade, representar ativação do SRA inapropriado para o nível determinado da pressão arterial na prole (Kett e Denton, 2011).

Um estudo de associação genética em humanos realizado por Giner *et al.* e Poch *et al.* avaliou a associação entre a hipertensão sensível ao sal e polimorfismos genéticos do SRA em seres humanos. O estudo demonstrou uma associação significativa entre o polimorfismo de inserção/deleção (I / D) do gene da ECA e hipertensão sensível ao sal (Giner *et al.*, 2000; Poch *et al.*, 2001).

Alterações no SRA local também foram observadas por pesquisadores em diferentes tecidos de várias estirpes de ratos. Stewen *et al.* demonstraram aumento na densidade do receptor AT1 no córtex renal de ratos espontaneamente hipertensos após crônica ingestão elevada de sal (Stewen *et al.*, 2003). Foi relatado na literatura que as expressões proteicas de renina, AT1R e ECA estavam elevadas sete dias após o nascimento, indicando uma modulação transplacentária do SRA induzida por uma dieta materna hipersódica e uma possível via de escape parcial da sobrecarga de sódio durante a amamentação (Koleganova *et al.*, 2011). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas na expressão de AT1R entre as proles HS e SC ao nascimento e aos 10 dias de idade. No entanto, aos três meses de idade, filhotes HS exibiram altos níveis de AT1R.

A Ang-II intrarrenal desempenha um papel na inflamação renal, que leva a um dano cortical renal, proteinúria e a redução na hemodinâmica renal (Lin *et al.*, 2009). Os filhos de mães que receberam dieta hipersódica aparentemente não são afetados imediatamente, pois no presente estudo não foi observada diferença na expressão de Ang-II entre as proles HS e SC prole ao nascimento. No entanto, aos 10 dias de idade e aos três meses de idade, os filhotes HS apresentaram valores significativamente mais elevados da expressão de Ang-II. Podemos, então, supor que os valores aumentados na expressão de Ang-II na idade madura podem estar correlacionados com as alterações encontradas nesses filhotes, principalmente a proteinúria.

A glomeruloesclerose acontecendo ao longo da vida promove a degradação funcional do rim, independentemente da causa da doença. Quando a glomeruloesclerose está aumentada por algum motivo, podemos esperar que o aparecimento de insuficiência renal crônica será antecipado (Anderson e Brenner, 1986). A proliferação mesangial e o acúmulo de matriz são processos que antecedem a glomeruloesclerose (Fogo, 1999), e alterações nas células epiteliais residentes são fundamentais para a progressão da glomeruloesclerose (Kriz *et al.*,

1998; D'Agati, 2008).

Cabe ressaltar que acontecem modificações na hemodinâmica glomerular no rim remanescente depois da ablação de um dos rins. Estas modificações funcionais são acompanhadas por lesões estruturais e sugerem que a permanente hiperfiltração em um rim remanescente tem consequências adaptativas que danificam este rim (Hostetter *et al.*, 2001). No caso em que há redução do número de glomérulos, como foi visto no presente estudo nos filhotes de mães que receberam dieta hipersódica, isto equivale a uma ablação renal. Podemos entender que os glomérulos remanescentes estão submetidos a um regime de hiperfiltração com a consequente lesão estrutural subjacente, o que explicaria um aumento na esclerose glomerular. No estudo atual os glomérulos dos filhotes de mães que receberam dieta hipersódica estavam hipertrofiados em todas as idades estudadas.

Analizou-se a expressão de algumas proteínas-chave no rim. WT1 é expressa por podócitos humanos e desempenha um papel importante nas diferentes fases da nefrogênese em animais e em humanos, e tem papel principal na regulação do processo de transição mesenquimal-epitelial, e no desenvolvimento e maturação dos podócitos (Abdelmalek *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012). Além disso, o gene WT1 desempenha um papel fundamental em três fases diferentes do desenvolvimento rim: o início da formação do rim, a progressão da formação do rim e a manutenção da função normal do rim.

O desenvolvimento de modelos animais, nos últimos anos, contribuiu consideravelmente para melhor compreensão das atividades biológicas do WT1 (Menke e Schedl, 2003). Em um estudo prévio, observou-se que a expressão induzida de WT1, em precursores de células embrionárias de rim de ratos, leva à indução de Podocalixina endógena, a principal proteína estrutural de membrana dos podócitos glomerulares, a qual está envolvida na manutenção das fendas de filtração (Palmer *et al.*, 2001). A interrupção do WT1 pode resultar em um conjunto de doenças renais que variam desde o desenvolvimento de tumor à formas de insuficiência renal. No entanto, os mecanismos fundamentais ainda não são completamente conhecidos (Bertinat *et al.*, 2012).

O número crescente de pacientes em todo o mundo com doença renal em estágio final ressalta a necessidade de identificar as vias moleculares envolvidas na

fisiopatologia renal, que podem servir como alvos para uma intervenção terapêutica (de Borst *et al.*, 2008).

Os principais componentes do diafragma de fenda são constituídos principalmente por uma proteína chamada nefrina que é produto do gene NPHS1 (Akhtar e Al Mana, 2004). Podocina é outra proteína importante, produzida pelo gene NPHS2. Essas proteínas desempenham um papel crucial nos processos responsáveis pela filtração glomerular. Mutações no NPHS1 podem levar à síndrome nefrótica congênita do tipo finlandês, enquanto que mutações no gene NPHS2 resultam em glomeruloesclerose segmentar focal. Juntamente com a podocina e a proteína associada ao CD2 (CD2AP), a nefrina forma um complexo que determina a integridade do diafragma de fenda, porém sua função ainda não foi completamente compreendida e as vias de transdução de sinal, precisam ser estudadas (Musial e Zwolinska, 2005).

Assim, uma redução nas expressões de nefrina e podocina é observada em podócitos de pacientes com glomerulopatias adquiridas (Barisoni e Mundel, 2003). No presente estudo vimos que as expressões de WT1 e podocina foram significativamente diminuídas na prole de mães com dieta hipersódica, desde o nascimento até os três meses de idade. Portanto, pode-se especular que esses achados estão associados com a disfunção renal observada na prole das mães com dieta hipersódica.

A influência positiva da diminuição da ingestão de sal sobre a progressão da insuficiência renal foi confirmada em estudos experimentais. Entretanto, em estudos randomizados com humanos, estes resultados ainda não foram estabelecidos de forma evidente (Matousovic e Podracka, 2012). Marin *et al* demonstraram aumento da pressão arterial, albuminúria e diminuição da taxa de filtração glomerular na prole de mãe alimentadas com dieta hipersódica antes da realização de uma nefrectomia, não havendo diferença nesses parâmetros entre os grupos após a cirurgia. Concluindo que a alta ingestão de sal durante a gestação e lactação em ratos leva a mudanças estruturais e funcionais no rim da prole na fase adulta (Marin *et al.*, 2008). Os filhotes de mães alimentadas com dieta hipersódica apresentaram, aos três meses de idade, elevada proteinúria e tiveram diminuição do *clearance* de creatinina e do *clearance* de ureia, com conseqüente redução na TFG, sugerindo lesão

glomerular. Além disso, as frações de excreção de sódio, de potássio e de ureia estavam todas elevadas na prole de mães com dieta hipersódica.

Constatamos, finalmente, que a dieta hipersódica ingerida pelas mães constitui um insulto importante e também caracteriza uma programação fetal com relevantes consequências na vida adulta dos filhos.

CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo permitem concluir que:

- a) Há aumento da pressão arterial nos filhotes de mães com dieta hipersódica, cuja explicação, ao menos em parte, pode ser pelo sistema renina-angiotensina estimulado e pela redução do número de glomérulos nos filhotes, com hipertrofia e hiperfiltração glomerular;
- b) As proteínas do sistema renina-angiotensina têm a expressão aumentada, indicando que este sistema está estimulado nos filhotes de mães que receberam dieta hipersódica;
- c) A diminuição da expressão de proteína de tumor de Wilms e de podocina deve estar associada com as alterações estruturais no desenvolvimento glomerular;
- d) Há retardo na maturidade glomerular nos filhotes de mães submetidas a dieta hipersódica e isto pode estar relacionado a diminuição da formação de glomérulos;
- e) Filhotes de mães com dieta hipersódica desenvolvem um número reduzido de glomérulos renais e conseqüentemente aumento da glomerulosclerose nos glomérulos remanescentes;
- f) A exposição materna a uma dieta contendo um alto teor de sódio leva a "programação fetal" dos filhotes e a alterações na vida adulta.

REFERÊNCIAS

- Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ* 1988; 297:319-328.
- AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 2001; 7:1003-1009.
- Abdelmalek MF, Lazo M, Horska A, Bonekamp S, Lipkin EW, Balasubramanyam A, Bantle JP, Johnson RJ, Diehl AM, Clark JM, Fatty Liver Subgroup of Look ARG. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology* 2012; 56:952-960.
- Akhtar M, Al Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 2004; 11:304-309.
- Alexander BT. Fetal programming of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290:R1-R10.
- Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal gestational protein-calorie restriction decreases the number of glomeruli and causes glomerular hypertrophy in adult hypertensive rats. *Am J Obstet Gynecol* 2005a; 192:945-951.
- Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. Overweight is gender-dependent in prenatal protein--calorie restricted adult rats acting on the blood pressure and the adverse cardiac remodeling. *Life Sci* 2005b; 77:1307-1318.
- Almeida JR, Passos MA, Souza ER, Mandarim-De-Lacerda CA. Glomerular developmental chronology in human fetuses. *J Cell Mol Med* 2003; 7:492-493.
- Almond K, Bikker P, Lomax M, Symonds ME, Mostyn A. The influence of maternal protein nutrition on offspring development and metabolism: the role of glucocorticoids. *Proc Nutr Soc* 2012; 71:198-203.
- Alt JM, Hackbarth H, Deerberg F, Stolte H. Proteinuria in rats in relation to age-dependent renal changes. *Lab Anim* 1980; 14:95-101.
- Anderson S, Brenner BM. Effects of aging on the renal glomerulus. *Am J Med* 1986; 80:435-442.
- Ando M, Yanagisawa N, Ajisawa A, Tsuchiya K, Nitta K. Urinary albumin excretion within the normal range is an independent risk for near-term development of kidney disease in HIV-infected patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:3923-3929.
- Assali NS, Westersten A. Regional flow-pressure relationship in response to angiotensin in the intact dog and sheep. *Circ Res* 1961; 9:189-193.

Atkinson DE, Sibley CP, Fairbairn LJ, Greenwood SL. MDR1 P-gp expression and activity in intact human placental tissue; upregulation by retroviral transduction. *Placenta* 2006; 27:707-714.

Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 2003; 23:353-360.

Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1995; 1:418-423.

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95:115-128.

Barker DJ, Bagby SP, Hanson MA. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2:700-707.

Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986; 1:1077-1081.

Barker DJ, Osmond C. Low birth weight and hypertension. *BMJ* 1988; 297:134-135.

Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989a; 298:564-567.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989b; 2:577-580.

Bauer R, Walter B, Zwiener U. Comparison between inulin clearance and endogenous creatinine clearance in newborn normal weight and growth restricted newborn piglets. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52:367-372.

Bertinat R, Pontigo JP, Perez M, Concha, II, San Martin R, Guinovart JJ, Slebe JC, Yanez AJ. Nuclear accumulation of fructose 1,6-bisphosphatase is impaired in diabetic rat liver. *J Cell Biochem* 2012; 113:848-856.

Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE. Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatr Nephrol* 2011; 26:1529-1533.

Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24:349-354.

Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988; 1:335-347.

Bringhenti I, Moraes-Teixeira JA, Cunha MR, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilu MB. Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. *PLoS One* 2013; 8:e55711.

- Brown MA, Gallery ED, Ross MR, Esber RP. Sodium excretion in normal and hypertensive pregnancy: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:297-307.
- Burrow CR. Regulatory molecules in kidney development. *Pediatr Nephrol* 2000; 14:240-253.
- Carlsson PO. The renin-angiotensin system in the endocrine pancreas. *JOP* 2001; 2:26-32.
- Carvalho JJ, Baruzzi RG, Howard PF, Poulter N, Alpers MP, Franco LJ, Marcopito LF, Spooner VJ, Dyer AR, Elliott P, et al. Blood pressure in four remote populations in the INTERSALT Study. *Hypertension* 1989; 14:238-246.
- Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG* 2006; 113:1126-1133.
- Chong E, Yosypiv IV. Developmental programming of hypertension and kidney disease. *Int J Nephrol* 2012; 2012:760580.
- Contreras RJ, Wong DL, Henderson R, Curtis KS, Smith JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. *Physiol Behav* 2000; 71:173-181.
- Costa MV, Fernandes-Santos C, Faria Tda S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Diets rich in saturated fat and/or salt differentially modulate atrial natriuretic peptide and renin expression in C57BL/6 mice. *Eur J Nutr* 2012; 51:89-96.
- Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation* 2006; 74:402-421.
- Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell* 2010; 18:698-712.
- Cuadra AE, Shan Z, Sumners C, Raizada MK. A current view of brain renin-angiotensin system: Is the (pro)renin receptor the missing link? *Pharmacol Ther* 2010; 125:27-38.
- Cutler JA, Follmann D, Allender PS. Randomized trials of sodium reduction: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:643S-651S.
- D'Agati VD. Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models (a play in five acts). *Kidney Int* 2008; 73:399-406.
- Daenzer M, Ortmann S, Klaus S, Metges CC. Prenatal high protein exposure decreases energy expenditure and increases adiposity in young rats. *J Nutr* 2002; 132:142-144.
- Dahlgren J, Nilsson C, Jennische E, Ho HP, Eriksson E, Niklasson A, Bjorntorp P, Albertsson Wikland K, Holmang A. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281:E326-334.

- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 1991; 40 Suppl 2:115-120.
- Daniels D, Mietlicki EG, Nowak EL, Fluharty SJ. Angiotensin II stimulates water and NaCl intake through separate cell signalling pathways in rats. *Exp Physiol* 2009; 94:130-137.
- Davies JA, Ladomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* 2004; 13:235-246.
- de Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46:4-14.
- de Borst MH, Benigni A, Remuzzi G. Primer: strategies for identifying genes involved in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4:265-276.
- de Gusmao Correia ML, Volpato AM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Developmental origins of health and disease: experimental and human evidence of fetal programming for metabolic syndrome. *J Hum Hypertens* 2012; 26:405-419.
- de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 2010; 100:525-534.
- Dechend R, Viedt C, Muller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 2003; 107:1632-1639.
- Di Nicolantonio R, Hoy K, Spargo S, Morgan TO. Perinatal salt intake alters blood pressure and salt balance in hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 15:177-182.
- Dickinson H, Walker DW, Wintour EM, Moritz K. Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292:R453-461.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87:E1-9.
- Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res* 2011; 34:1-11.
- Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22:509-529.

- El-Dahr SS, Harrison-Bernard LM, Dipp S, Yosipiv IV, Meleg-Smith S. Bradykinin B2 null mice are prone to renal dysplasia: gene-environment interactions in kidney development. *Physiol Genomics* 2000; 3:121-131.
- Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98:121-128.
- Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, Rosa KT, Furukawa LN, Coelho MS, Casarini DE, Heimann JC. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in Wistar rats. *J Nutr* 2010; 140:1742-1751.
- Figuroa JP, Rose JC, Massmann GA, Zhang J, Acuna G. Alterations in fetal kidney development and elevations in arterial blood pressure in young adult sheep after clinical doses of antenatal glucocorticoids. *Pediatr Res* 2005; 58:510-515.
- Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol* 1991; 260:R1104-1113.
- Fogo AB. Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Exp Nephrol* 1999; 7:147-159.
- Forsdahl A. [Points which enlighten the high mortality rate in the county of Finnmark. Can the high mortality rate today be a consequence of bad conditions of life in childhood and adolescence?]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1973; 93:661-667.
- Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:29-37.
- Frantz ED, Aguila MB, Pinheiro-Mulder Ada R, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech Ageing Dev* 2011; 132:110-116.
- Frantz ED, Crespo-Mascarenhas C, Barreto-Vianna AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *PLoS One* 2013; 8:e67192.
- Gant NF, Worley RJ, Everett RB, MacDonald PC. Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int* 1980; 18:253-258.
- Garcia-Villalba P, Denkers ND, Wittwer CT, Hoff C, Nelson RD, Mauch TJ. Real-time PCR quantification of AT1 and AT2 angiotensin receptor mRNA expression in the developing rat kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2003; 94:e154-159.
- Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, Siems WE, Walther T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* 2005; 26:1270-1277.

Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, Nijland MJ. Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *J Physiol* 2005; 565:137-147.

Giner V, Coca A, de la Sierra A. Increased insulin resistance in salt sensitive essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2001; 15:481-485.

Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzalez D, Coca A, De La Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 2000; 35:512-517.

Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2004a; 15:183-187.

Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004b; 305:1733-1736.

Godfrey KM. The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta* 2002; 23 Suppl A:S20-27.

Goodfellow J, Bellamy MF, Gorman ST, Brownlee M, Ramsey MW, Lewis MJ, Davies DP, Henderson AH. Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovasc Res* 1998; 40:600-606.

Grigore D, Ojeda NB, Robertson EB, Dawson AS, Huffman CA, Bourassa EA, Speth RC, Brosnihan KB, Alexander BT. Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293:R804-811.

Gu JW, Young E, Pan ZJ, Tucker KB, Shparago M, Huang M, Bailey AP. Long-term high salt diet causes hypertension and alters renal cytokine gene expression profiles in Sprague-Dawley rats. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2009; 41:505-515.

Guyton AC. Roles of the kidneys and fluid volumes in arterial pressure regulation and hypertension. *Chin J Physiol* 1989; 32:49-57.

Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV, Jr., Scheel KW, Manning RD, Jr., Norman RA, Jr. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med* 1972; 52:584-594.

Ha TS. Roles of adaptor proteins in podocyte biology. *World J Nephrol* 2013; 2:1-10.

Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102:252-261.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991; 303:1019-1022.

Hayslett JP. Functional adaptation to reduction in renal mass. *Physiol Rev* 1979; 59:137-164.

Henriksen EJ. Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293:R974-980.

Hernandez Ocampo J, Torres Rosales A, Rodriguez Castellanos F. [Comparison of four methods for measuring glomerular filtration rate by inulin clearance in healthy individuals and patients with renal failure]. *Nefrologia* 2010; 30:324-330.

Hodari AA, Smeby R, Bumpus FM. A renin-like substance in the human placenta. *Obstet Gynecol* 1967; 29:313-317.

Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 2006; 15 Spec No 2:R196-201.

Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1315-1325.

Hsueh WA, Luetscher JA, Carlson EJ, Grislis G, Frazee E, McHargue A. Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54:1010-1016.

Hughson MD, Douglas-Denton R, Bertram JF, Hoy WE. Hypertension, glomerular number, and birth weight in African Americans and white subjects in the southeastern United States. *Kidney Int* 2006; 69:671-678.

Jansson T, Lambert GW. Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3-4 months of age. *J Hypertens* 1999; 17:1239-1248.

Jensen DM, Damm P, Sorensen B, Molsted-Pedersen L, Westergaard JG, Ovesen P, Beck-Nielsen H. Pregnancy outcome and prepregnancy body mass index in 2459 glucose-tolerant Danish women. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:239-244.

Johns EJ. Autonomic regulation of kidney function. *Handb Clin Neurol* 2013; 117:203-214.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*, Nona ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999: 427 p.

Kalinyak JE, Hoffman AR, Perlman AJ. Ontogeny of angiotensinogen mRNA and angiotensin II receptors in rat brain and liver. *J Endocrinol Invest* 1991; 14:647-653.

Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephricin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1:575-582.

Kett MM, Bertram JF. Nephron endowment and blood pressure: what do we really know? *Curr Hypertens Rep* 2004; 6:133-139.

Kett MM, Denton KM. Renal programming: cause for concern? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300:R791-803.

Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, Taylor PD. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R127-133.

Khan IY, Taylor PD, Dekou V, Seed PT, Lakasing L, Graham D, Dominiczak AF, Hanson MA, Poston L. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 2003; 41:168-175.

Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Becker LE, Muller A, Weckbach M, Nyengaard JR, Schirmacher P, Gross-Weissmann ML. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301:F344-354.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005; 111:1806-1813.

Krause EG, Sakai RR. Richter and sodium appetite: from adrenalectomy to molecular biology. *Appetite* 2007; 49:353-367.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; 74:679-691.

Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998; 54:687-697.

Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* 2005; 280:30113-30119.

Langley-Evans S. Fetal growth markers may show nutritionally mediated effect. *BMJ* 2001; 323:52.

Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2006; 65:97-105.

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010; 19:87-98.

Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* 1999; 64:965-974.

- Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 1994; 86:217-222; discussion 121.
- Li C, Ansari R, Yu Z, Shah D. Definitive molecular evidence of renin-angiotensin system in human uterine decidual cells. *Hypertension* 2000; 36:159-164.
- Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N, Ahmed A. Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest* 1998; 101:442-454.
- Li Z, Ferguson AV. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Am J Physiol* 1993; 265:R302-309.
- Lillicrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005; 135:1382-1386.
- Lin L, Phillips WE, Manning RD. Intrarenal Angiotensin ii is associated with inflammation, renal damage and dysfunction in dahl salt-sensitive hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2009; 3:306-314.
- Manning J, Vehaskari VM. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* 2001; 16:417-422.
- Marin EC, Balbi AP, Francescato HD, Alves da Silva CG, Costa RS, Coimbra TM. Renal structure and function evaluation of rats from dams that received increased sodium intake during pregnancy and lactation submitted or not to 5/6 nephrectomy. *Ren Fail* 2008; 30:547-555.
- Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulange A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 2001; 15:2727-2729.
- Matousovic K, Podracka L. [To salt or not to salt in kidney diseases? Not more than quantum satis!]. *Vnitr Lek* 2012; 58:531-535.
- Mendelsohn C. Using mouse models to understand normal and abnormal urogenital tract development. *Organogenesis* 2009; 5:306-314.
- Menke AL, Schedl A. WT1 and glomerular function. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14:233-240.
- Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine* 2002; 18:239-245.
- Mitsuishi M, Miyashita K, Muraki A, Itoh H. Angiotensin II reduces mitochondrial content in skeletal muscle and affects glyceemic control. *Diabetes* 2009; 58:710-717.

Morgan T, Craven C, Ward K. Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension* 1998; 32:683-687.

Moritz KM, Dodic M, Wintour EM. Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays* 2003; 25:212-220.

Moritz KM, Singh RR, Probyn ME, Denton KM. Developmental programming of a reduced nephron endowment: more than just a baby's birth weight. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296:F1-9.

Moritz KM, Wintour EM, Black MJ, Bertram JF, Caruana G. Factors influencing mammalian kidney development: implications for health in adult life. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2008; 196:1-78.

Murotsuki J, Challis JR, Han VK, Fraher LJ, Gagnon R. Chronic fetal placental embolization and hypoxemia cause hypertension and myocardial hypertrophy in fetal sheep. *Am J Physiol* 1997; 272:R201-207.

Musial K, Zwolinska D. [Structure and function of the glomerular filtration barrier]. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 18:317-320.

Nascimento FA, Ceciliano TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring. *PLoS One* 2012; 7:e41740.

Nathanielsz PW. Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases. *ILAR J* 2006; 47:73-82.

Negrato CA, Jovanovic L, Tambascia MA, Geloneze B, Dias A, Calderon Ide M, Rudge MV. Association between insulin resistance, glucose intolerance, and hypertension in pregnancy. *Metab Syndr Relat Disord* 2009; 7:53-59.

Nguyen G, Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8:127-132.

Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109:1417-1427.

Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* 1998; 101:2174-2181.

Ogihara T, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Fujita T. High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 2002; 40:83-89.

Ojeda NB, Grigore D, Alexander BT. Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008; 15:101-106.

Ornellas F, Mello VS, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers. *Life Sci* 2013; 93:454-463.

Osborn JL. Relation between sodium intake, renal function, and the regulation of arterial pressure. *Hypertension* 1991; 17:191-96.

Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect* 2000; 108 Suppl 3:545-553.

Palmer RE, Kotsianti A, Cadman B, Boyd T, Gerald W, Haber DA. WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr Biol* 2001; 11:1805-1809.

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

Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83:253-307.

Peixoto-Silva N, Frantz ED, Mandarim-de-Lacerda CA, Pinheiro-Mulder A. Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2011; 106:1364-1373.

Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, Lane RH. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285:R962-970.

Pico C, Palou M, Priego T, Sanchez J, Palou A. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. *Front Physiol* 2012; 3:436.

Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:381-392.

Poch E, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de La Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension* 2001; 38:1204-1209.

Poisner AM. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19:232-252.

Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998; 351:173-177.

Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116:288-296.

Riviere G, Michaud A, Breton C, VanCamp G, Laborie C, Enache M, Lesage J, Deloof S, Corvol P, Vieau D. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 2005; 46:1169-1174.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologia Estrutural e Funcional*, Sexta ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000: p.

Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER, 3rd, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 2001; 344:3-10.

Scientific Advisor Committee on Nutrition. 2003. Salt and Health. In. London: The Stationery Office. (http://www.sacn.gov.uk/pdfs/sacn_salt_final.pdf)

Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ Res* 1995; 76:1-15.

Sahajpal V, Ashton N. Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104:607-614.

Saiki A, Ohira M, Endo K, Koide N, Oyama T, Murano T, Watanabe H, Miyashita Y, Shirai K. Circulating angiotensin II is associated with body fat accumulation and insulin resistance in obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2009; 58:708-713.

Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowlerson A, Poston L, Taylor PD. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 2008; 51:383-392.

Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 2008; 93:519-527.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, et. al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8258-8263.

Saxen L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* 1987; 1:385-392.

Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* 2007; 8:791-802.

Schreuder MF, Nauta J. Prenatal programming of nephron number and blood pressure. *Kidney Int* 2007; 72:265-268.

Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108:1621-1629.

Scott JE, Renwick M. Antenatal diagnosis of congenital abnormalities in the urinary tract. Results from the Northern Region Fetal Abnormality Survey. *Br J Urol* 1988; 62:295-300.

Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid "programming" and PTSD risk. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1071:351-378.

Shamseddeen H, Getty JZ, Hamdallah IN, Ali MR. Epidemiology and economic impact of obesity and type 2 diabetes. *Surg Clin North Am* 2011; 91:1163-1172, vii.

Shaw KJ, Do YS, Kjos S, Anderson PW, Shinagawa T, Dubeau L, Hsueh WA. Human decidua is a major source of renin. *J Clin Invest* 1989; 83:2085-2092.

Shibata E, Powers RW, Rajakumar A, von Versen-Hoyneck F, Gallaher MJ, Lykins DL, Roberts JM, Hubel CA. Angiotensin II decreases system A amino acid transporter activity in human placental villous fragments through AT1 receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E1009-1016.

Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 2001; 50:2279-2286.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1:31-39.

Stewen P, Mervaala E, Karppanen H, Nyman T, Saijonmaa O, Tikkanen I, Fyhrquist F. Sodium load increases renal angiotensin type 1 receptors and decreases bradykinin type 2 receptors. *Hypertens Res* 2003; 26:583-589.

Sullivan EL, Smith MS, Grove KL. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 2011; 93:1-8.

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:R764-770.

Symonds EM, Stanley MA, Skinner SL. Production of renin by in vitro cultures of human chorion and uterine muscle. *Nature* 1968; 217:1152-1153.

Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 1996; 274:995-998.

ter Maaten JC, Voordouw JJ, Bakker SJ, Donker AJ, Gans RO. Salt sensitivity correlates positively with insulin sensitivity in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:189-195.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275:33238-33243.

Tryggvason K, Pikkarainen T, Patrakka J. Nck links nephrin to actin in kidney podocytes. *Cell* 2006; 125:221-224.

Usukura M, Zhu A, Yoneda T, Karashima S, Yagi K, Yamagishi M, Takeda Y. Effects of a high-salt diet on adipocyte glucocorticoid receptor and 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase 1 in salt-sensitive hypertensive rats. *Steroids* 2009; 74:978-982.

Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 2001; 59:238-245.

Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D, Manning J. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287:F262-267.

Vehaskari VM, Woods LL. Prenatal programming of hypertension: lessons from experimental models. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2545-2556.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:12490-12495.

Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E83-87.

Vickers MH, Breier BH, McCarthy D, Gluckman PD. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285:R271-273.

Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005; 146:4211-4216.

Vidinho AF, Jr., da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, de Toledo Bergamaschi CM, Carpinelli AR, Quintao EC, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res* 2004; 56:842-848.

Villar-Martini VC, Carvalho JJ, Neves MF, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. *J Hypertens Suppl* 2009; 27:S47-51.

Wang Y, Denton KM, Golledge J. Control of salt and volume retention cannot be ruled out as a mechanism underlying the blood pressure-lowering effect of renal denervation. *Hypertens Res* 2013; 36:1006-1007.

World Health Organization. 2007. WHO forum on reducing salt intake in populations: a report of a WHO forum and technical meeting. 5-7 October 2006, In. Paris, France, WHO, Geneva . Disponível em:
http://www.who.int/dietphysicalactivity/Salt_Report_VC_april07.pdf

Woods LL. Maternal nutrition and predisposition to later kidney disease. *Curr Drug Targets* 2007; 8:906-913.

Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001; 49:460-467.

Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int* 2004; 65:1339-1348.

Wright JW, Stublely L, Pederson ES, Kramar EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning. *J Neurosci* 1999; 19:3952-3961.

Wyrwoll CS, Mark PJ, Waddell BJ. Developmental programming of renal glucocorticoid sensitivity and the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2007; 50:579-584.

Yayama K, Okamoto H. Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:312-318.

Zhao LF, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Fujimoto S, Hashimoto K, Murao K, Terada Y. Liver X receptor alpha is involved in the transcriptional regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Diabetes* 2012; 61:1062-1071.

APÊNDICE – Artigo científico publicado

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Maternal Obesity during the Preconception and Early Life Periods Alters Pancreatic Development in Early and Adult Life in Male Mouse Offspring

Isabele Bringhenti, Jessica Andrade Moraes-Teixeira, Michelle Rabello Cunha, Fernanda Ornellas, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda*, Marcia Barbosa Aguila

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Centre, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Maternal obesity induced by a high fat (HF) diet may program susceptibility in offspring, altering pancreatic development and causing later development of chronic degenerative diseases, such as obesity and diabetes. Female mice were fed standard chow (SC) or an HF diet for 8 weeks prior to mating and during the gestational and lactational periods. The male offspring were assessed at birth, at 10 days, and at 3 months of age. The body mass (BM) gain was 50% greater before pregnancy and 80% greater during pregnancy in HF dams than SC dams. Dams fed an HF diet showed higher oral glucose tolerance test (OGTT), blood pressure, serum corticosterone, and insulin levels than dams fed SC. At 10 days of age and at 3 mo old the HF offspring showed greater BM and higher blood glucose levels than the SC offspring. The mean diameter of the islets had increased by 37% in the SC offspring and by 155% in the HF offspring at 10 days of age. The islet mass ratio (IM/PM) was 88% greater in the HF offspring at 10 days of age, and 107% greater at 3 mo of age, compared to the values obtained at birth. The HF offspring had a beta cell mass (BCM)/PM ratio 54% lower than SC offspring at birth. However, HF offspring displayed a 146% increase in the BCM/PM ratio at 10 days of age, and 112% increase at 3 months of age than values at birth. At 3 mo of age, the HF offspring showed a greater OGTT and higher levels of than SC offspring. In conclusion, a maternal HF diet consumed during the preconceptional period and throughout the gestational and lactational periods in mice results in dramatic alterations in the pancreata of the offspring.

Citation: Bringhenti I, Moraes-Teixeira JA, Cunha MR, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, et al. (2013) Maternal Obesity during the Preconception and Early Life Periods Alters Pancreatic Development in Early and Adult Life in Male Mouse Offspring. *PLoS ONE* 8(1): e55711. doi:10.1371/journal.pone.0055711

Editor: Shree Ram Singh, National Cancer Institute, United States of America

Received: July 23, 2012; **Accepted:** December 29, 2012; **Published:** January 31, 2013

Copyright: © 2013 Bringhenti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Brazilian Government (CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant 302154/2001-6 to CAML) and the State of Rio de Janeiro (FAPERJ, Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, grant E-26/110.549/2010 to MBA and CAML). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Marcia B. Aguila is currently an Academic Editor of PLOS ONE. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: mandarim@uerj.br

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS
(CEUA – IBRAG - UERJ)

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/050/2010** sobre "**Dieta materna hiperlipídica rica em sódio e alterações no desenvolvimento renal na prole de camundongos**", sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (UERJ)**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ em **06/12/2010**. Este certificado expira em **06/12/2014**.

Rio de Janeiro, 06 de Dezembro de 2010.

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

*Prof^ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof^ª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8*

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

*Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8*

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

ANEXO B – Submissão do segundo artigo científico

The screenshot displays the PLOS ONE Editorial Manager interface. At the top, there is a navigation bar with the PLOS ONE logo and various utility links like 'HOME', 'LOGOUT', 'HELP', 'REGISTER', 'UPDATE MY INFORMATION', 'CURRENT CHECKOUT', 'MAIN MENU', 'CONTACT US', 'SUBMIT A MANUSCRIPT', and 'INSTRUCTIONS FOR AUTHORS'. Below this, the user's name 'Carlos A. Hendarim-de-Lacerda, MD, PhD' is visible. The main content area shows a table of 'Revisions Being Processed' for the author. The table has five columns: 'Action', 'Manuscript Number', 'Title', 'Date Submission Began', and 'Current Status'. One submission is listed with manuscript number 'PONE-D-13-1817602' and the title 'Kölny changes in mice offspring from maternal high-salt diet', which began on 'Nov 4 2013 10:12AM' and is currently 'Under Review'. A 'View Author Main Menu' button is located at the bottom of the page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Current Status
View Submission View CC-Summary Author Response Send Message	PONE-D-13-1817602	Kölny changes in mice offspring from maternal high-salt diet	Nov 4 2013 10:12AM	Under Review