

DANIELE CANALE

**Inibição do sistema NF- κ B durante a lactação
promove hipertensão na vida adulta**

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

Área de concentração: Nefrologia
Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedicatória

Aos meus pais, **Luiz e Marcia**, minha irmã **Isabele**, meu namorado **Virgilio** e à minha amiga **Luciana Faria de Carvalho**. Pessoas muito especiais que me apoiaram e me ajudaram nos momentos bons e ruins e que sempre me motivaram para que esse trabalho fosse concluído com sucesso. Muito obrigada! Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Roberto Zatz** pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelos ensinamentos valiosos que contribuíram muito para minha formação profissional.

Ao **Dr. José Eduardo Krieger** pela parceria que foi essencial para a execução dessa tese e pela atenção e importância dada para esse projeto.

Ao **Dr. Joel Heimann** pelos conselhos e pelas sugestões de grande importância para a finalização desse trabalho.

À **Dra. Vanda Jorgetti** pela ajuda nos momentos mais difíceis e pelo carinho durante todos esses anos.

À **Dra. Lúcia da Conceição Andrade** e às funcionárias **Mirela Aparecida Rodrigues Santinho** e **Márcia Ribalda** pela realização de algumas dosagens cruciais para o desenvolvimento desse trabalho.

À **Dra. Denise Malheiros** pelo apoio com as análises histológicas.

Ao **Dr. Gerhard Malnic** e seus alunos pelas idéias e sugestões que contribuíram muito para a realização da discussão desse trabalho.

Ao **Dr Rui Toledo** pela excelente organização do curso de pós graduação da nefrologia.

À **Dra Clarice Fujihara** pela ajuda e colaboração durante todos esses anos.

À amiga **Daniele Nunes Ferreira** pela ajuda com os experimentos, pela grande amizade construída durante os momentos na microscopia, por ter me escutado sempre nos momentos mais difíceis e pelos conselhos. Muito obrigada por tudo!

À pós-graduanda **Mariana Matera Veras** que me auxiliou com os experimentos de estereologia. Muito obrigada pela paciência e atenção.

À pós-graduanda **Mariliza Velho** pelo cuidado e o apoio com a realização dos experimentos moleculares, pela paciência e por todos os ensinamentos, que foram muito importante para a minha formação.

Aos amigos **Elizabete Pereira Barros Poppi** e **Flávio Teles**, pela ajuda com várias etapas desse trabalho e pela amizade construída nesse tempo de convivência.

Ao **Dr. Antônio Carlos Seguro** e grupo do LIM 12 – **Rildo Volpini, Ana Carolina de Bragança e Heloísa Shimizu** – e do LIM 29 – **Ana Paula Bastos** – pela amizade e companhia em todos os congressos. Muito obrigada por me receberem tão bem.

Às alunas de iniciação científica e estagiárias **Carla Perez, Daiane Vaqueiro, Letícia Borges de Souza, Karina Washimi e Luisa Furlan** pela amizade, companhia durante os almoços dentro e fora da faculdade e pela ajuda imensa com os experimentos em diversas fases da minha pós-graduação. Muito obrigada por tudo meninas!

Às pós-graduandas, **Cristiene Okabe** e **Simone Ribeiro** pela ajuda e a companhia durante todos esses anos.

À pós-graduanda **Flávia Machado** pela ajuda com as correções de praticamente todos os meus relatórios durante a minha pós-graduação e pela ajuda com alguns experimentos.

Ao **Wagner Vasques Dominguez** por arranjar sempre um tempinho para ajudar, mesmo estando cheio de trabalho para fazer. É sempre bom ter uma pessoa bem-humorada e otimista ao seu lado nas horas de desespero. Muito obrigada pela ajuda que contribuiu muito para compor esse trabalho.

À funcionária **Luciene Machado dos Reis** pela ajuda com as dosagens de cálcio e pela paciência de explicar a mesma coisa diversas vezes sempre com muita boa vontade.

À funcionária **Claudia Sena** pela realização cuidadosa de alguns dos meus experimentos e pela paciência nas exaustivas repetições sempre em busca de um resultado correto e honesto.

Às funcionárias **Bianca Fernandes** pela ajuda com os animais do biotério, inclusive nos finais de semana e **Camilla Fanelli** por me ajudar nos testes dos experimentos, que muitas vezes tinham que ser repetidos. Muito obrigada!

Às secretárias **Marineide Ribeiro** e **Denise Cristina Duarte** pela eficiência na realização de toda a parte burocrática e pela amizade. Muito obrigada meninas por me agüentarem horas e horas na secretaria!

Aos funcionários **Eliana Gonçalves** e **Hernandes** por toda a assistência com os assuntos relacionados com a pós-graduação e a parte financeira.

À funcionária **Janice Pião** por manter a limpeza e a conservação do laboratório.

Ao funcionário **Walter Campestre** pela ajuda com detalhes que são indispensáveis para o bom andamento do trabalho.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVO DO ESTUDO	8
2. MÉTODOS	9
2.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS	10
2.2. ESQUEMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	10
2.3. HISTOLOGIA.....	13
2.4. DOSAGENS BIOQUÍMICAS	14
2.5. CONTAGEM DO NÚMERO DE GLOMÉRULOS	14
2.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DO SRA E DOS TRANSPORTADORES MOLECULARES.....	16
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3. RESULTADOS	19
3.1. ESTUDOS DE LONGO PRAZO	19
3.2. CONTAGEM DE GLOMÉRULOS	22
3.3. EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E DOS TRANSPORTADORES TUBULARES	23
4. DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÕES	35
6. ANEXOS	36
6.1. TABELAS	37
6.2. FIGURAS	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
AI	Angiotensina I
AI	Angiotensina II
AGT	Angiotensinogênio
aAT1r	Antagonista do receptor AT1
AT1	Receptor da angiotensina II do tipo 1
AT1a	Receptor da angiotensina II do tipo 1 isoforma a
AT1b	Receptor da angiotensina II do tipo 1 isoforma b
AT2	Receptor da angiotensina II do tipo 2
APR	Atividade plasmática de renina
ALDO	Concentração de aldosterona plasmática
C	Controle
cDNA	DNA complementar
DRC	Doença renal crônica
DTM	Diâmetro transversal do miócito
dL	Decilitro
ECA	Enzima conversora de angiotensina

EP	Erro padrão
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
E_{Na}	Taxa de excreção urinária de sódio
E_K	Taxa de excreção urinária de potássio
EG	Esclerose glomerular
ENaC	Canal de sódio epitelial
FVE	Fibrose do ventrículo esquerdo
g	Grama
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
INT	Expansão intersticial
$I_{\kappa B}$	Proteína inibitória NF- κB
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
Kg	Quilograma
LO	Losartan
L	Litro
LPS	Lipopolissacárides bacterianos
MCP-1	Proteína quimioatratora de monócitos 1
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	RNA mensageiro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mEq	Miliequivalente
NF-κB	Fator nuclear– kappa B
Nx	Ablação renal de 5/6
NBC	Cotransportador sódio/bicarbonato
NHE3	Trocador sódio/hidrogênio isoforma 3
NKCC	Transportador sódio/potássio/2cloretos
NCC	Cotransportador sódio/cloreto
Na ⁺ /PO ₄ ⁻	Cotransportador sódio/fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Peso corpóreo
PRE	Peso do rim esquerdo
PVE	Peso do ventrículo esquerdo
pg	Picograma
PC	Pressão caudal
P _{Na}	Concentração plasmática de sódio
P _K	Concentração plasmática de potássio
PAS	Ácido periódico de Shiff
PDTC	Pirrolidina ditiocarbamato
qRT-PCR	PCR em tempo real

RANTES	“Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”
ROMK	Canal de potássio
Scr	Concentração de creatinina sérica
SHR	Rato Espontaneamente Hipertenso
SRA	Sistema renina-angiotensina
SGLT1	Cotransportador sódio/glicose isoforma 1
$U_{alb}V$	Concentração de albumina na urina de 24 horas
UV	Ultravioleta
U_{Na}	Concentração de sódio urinário
U_K	Concentração de potássio urinário

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Seqüência dos primers utilizados no estudo	37
Tabela 02. Estudo de longo prazo (3, 6 e 10 meses de idade)	38
Tabela 03. Peso do tecido renal e cardíaco aos 3 e 10 meses de idade	38
Tabela 04. Parâmetros bioquímicos aos 3 e 10 meses de idade	39
Tabela 05. Parâmetros histológicos aos 3 e 10 meses de idade	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Evolução do peso corpóreo	41
Figura 02.	Evolução da pressão caudal sistólica	41
Figura 03.	Evolução da excreção urinária de albumina	42
Figura 04.	Peso ao nascimento	42
Figura 05.	Peso do ventrículo esquerdo	43
Figura 06.	Concentração plasmática de sódio	44
Figura 07.	Concentração plasmática de potássio	44
Figura 08.	Taxa de excreção de sódio	45
Figura 09.	Taxa de excreção de potássio	45
Figura 10.	Concentração sérica de creatinina	46
Figura 11.	Atividade plasmática de renina	46
Figura 12.	Concentração plasmática de aldosterona	47
Figura 13.	Microfotografia (esclerose glomerular)	48
Figura 14.	Porcentagem de esclerose glomerular	48
Figura 15.	Microfotografia (expansão intersticial)	49
Figura 16.	Porcentagem de expansão intersticial	49
Figura 17.	Microfotografia (diâmetro transversal do miócito)	50
Figura 18.	Tamanho do diâmetro transversal do miócito	50
Figura 19.	Microfotografia (fibrose miocárdica)	51
Figura 20.	Porcentagem de fibrose miocárdica	51
Figura 21.	Microfotografia (infusão de nanquim)	52

Figura 22.	Número de néfrons (infusão de nanquim)	52
Figura 23.	Número de néfrons (método estereológico)	53
Figura 24.	Expressão gênica dos componentes do SRA	54
Figura 25.	Expressão gênica dos transportadores tubulares renais	54

RESUMO

Canale DC. *Inibição do sistema NF- κ B durante a lactação promove hipertensão na vida adulta*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 67p.

Em roedores, a administração de Losartan (LO) durante a nefrogênese (primeiras duas semanas de vida) leva à insuficiência renal progressiva e, mais tardiamente, à hipertensão, indicando que a Angiotensina II (AII) é indispensável a uma nefrogênese adequada. Os mediadores intracelulares desse efeito são desconhecidos. Nós investigamos se o sistema NF- κ B, que tem influência na embriogênese de outros tecidos, poderia ser um desses mediadores. Trinta e duas ratas Munich Wistar, cada uma amamentando 6 filhotes, foram divididas em dois grupos: C, sem tratamento, e PDTC, que receberam o inibidor do NF- κ B Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC), 280 mg/kg/dia na água de beber durante 21 dias. A prole (C e PDTC), constituída de ratos machos, foi acompanhada até 10 meses de vida sem qualquer tratamento. Diferentemente do observado anteriormente com o LO, o PDTC não promoveu redução do número de néfrons nem albuminúria, indicando que o sistema NF- κ B não participa crucialmente da nefrogênese. No entanto, os ratos que receberam o PDTC durante a lactação apresentaram hipertensão persistente, associada a hipertrofia de miócitos e a fibrose miocárdica. Para investigar a patogênese da hipertensão (que não se pode explicar por uma redução no número de néfrons), as expressões renais dos componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) e dos transportadores tubulares foram

determinadas por PCR em tempo real (qRT-PCR) aos 3 e 10 meses de vida. Aos 3 meses, a expressão de angiotensinogênio (AGT) e renina foram significativamente aumentadas no grupo PDTC vs C, indicando que uma ativação local do SRA pode explicar o desenvolvimento da hipertensão no grupo PDTC. No entanto, a expressão de todos os componentes do SRA examinados nos animais que receberam o PDTC durante a nefrogênese estava diminuída aos 10 meses, possivelmente devido a um mecanismo compensatório, sugerindo que a hipertensão foi mantida por outros mecanismos. No túbulo proximal, observou-se um aumento da expressão do transportador sódio/glicose isoforma 1 (SGLT1) (luminal) e sódio/bicarbonato (NBC) (basolateral), bem como um aumento numérico na expressão do trocador luminal sódio/hidrogênio isoforma 3 (NHE3), sugerindo que essas anormalidades podem estar envolvidas na patogênese da hipertensão nesses animais. Aos 10 meses, a expressão de todas as moléculas estava diminuída, sugerindo a participação de outros mecanismos na manutenção da hipertensão em longo prazo. A administração de PDTC pode representar um novo modelo de hipertensão essencial, possivelmente iniciada pela ativação local do SRA e por anormalidades no transporte de sódio no túbulo proximal e mantida em longo prazo por outros mecanismos.

Descritores: 1. NF- κ B; 2. hipertensão; 3. angiotensina II

SUMMARY

Canale D. *Inhibition of NF- κ B system during lactation promotes hypertension in adult life*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 67p.

Losartan treatment during late murine nephrogenesis (first 2 weeks of extrauterine life) causes progressive renal injury in adult life and, at more advanced stages, hypertension, indicating a physiologic action of angiotensin II on nephrogenesis. The possible intracellular pathways that might mediate this effect are unknown. We investigated the possibility that the NF- κ B system, known to participate in the embryogenesis of other tissues, could be one of these mediators. Soon after delivery, thirty-two Munich-Wistar dams, each nursing 6 male pups, were divided in 2 groups: C, untreated, and PDTC, receiving the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), 280 mg/kg/day in drinking water during 21 days. After weaning (at 25 days), the offspring (C and PDTC) were followed until 10 months of age with no further treatment. Unlike Losartan, neonatal PDTC treatment promoted no reduction in the number of nephrons and no abnormal albuminuria, indicating that the NF- κ B system does not participate decisively in nephrogenesis. Nevertheless, rats that received PDTC during lactation exhibited stable hypertension associated with myocardial hypertrophy and fibrosis. To investigate the pathogenesis of hypertension, which cannot be ascribed to number of nephrons reduction, the renal expressions of the renin-angiotensin system (RAS) components and of

several molecules involved in sodium transport were determined by qRT-PCR at 3 and 10 months of life. The renal expression of renin and angiotensinogen in PDTC-treated rats at 3 months of age was significantly higher in comparison with control, but lower than age-matched controls at 10 months of age, suggesting that, although hypertension may be initiated by a derangement in the RAS, it was maintained by other mechanisms in the long run. At 3 months of age, there was upregulation of the luminal sodium/glucose transporter and the basolateral sodium/bicarbonate transporter at the proximal tubule, as well as a numerically higher expression of the luminal sodium/hydrogen exchanger, suggesting that these abnormalities might also be related to the pathogenesis of hypertension in these rats. At 10 months of age, however, the expression of all these transporters was reduced, suggesting that none of them was responsible for the long-term maintenance of high blood pressure. Neonatal PDTC administration represents a new model of essential hypertension, possibly related to local renal activation of the RAS and to deranged sodium transport at the proximal tubule. In the long run, hypertension must be maintained by other mechanisms.

Descriptors: 1. NF- κ B; 2. hypertension; 3. angiotensin II.

1. INTRODUÇÃO

Doença renal crônica: um problema mundial e multifatorial

As nefropatias crônicas progressivas são caracterizadas pela perda gradual de néfrons, decorrente de lesões como a esclerose glomerular e a fibrose intersticial, culminando com a falência renal. As doenças renais crônicas (DRC) constituem um problema médico e de saúde pública mundial. No Brasil estima-se que existam atualmente mais de 10 milhões de indivíduos com DRC, sendo algumas centenas de milhares em fase avançada [1].

São inúmeros os mecanismos que participam da patogênese da DRC. Há várias evidências experimentais de que a hipertensão sistêmica e glomerular associada às DRC é um dos fatores patogênicos centrais para o início e progressão desses processos. Essa associação é muito evidente em ratos com nefrectomia de 5/6 (Nx), um dos modelos experimentais mais utilizados para o estudo das nefropatias progressivas. Nesse modelo encontramos uma proteinúria maciça, retenção progressiva de creatinina, além de hipertensão sistêmica e glomerular [2, 3].

Mecanismos inflamatórios são também essenciais à progressão da DRC. A infiltração de células mononucleares, como os monócitos/macrófagos e os linfócitos, nos glomérulos e no interstício renal, favorece a destruição do parênquima renal e sua substituição por componentes da matriz extracelular, com declínio progressivo da função renal [4-6]. Em consonância com esse

conceito, a administração crônica de antiinflamatórios a ratos Nx previne ou retarda fortemente a progressão da nefropatia [3, 4, 7].

O papel da All na patogênese da DRC

Até o início dos anos 1990, acreditava-se que o sistema renina-angiotensina (SRA) tinha como único efeito a conservação de sódio e a manutenção da pressão arterial sistêmica. Evidências obtidas a partir de então indicam que a angiotensina II (All) exerce também um papel importante nos processos inflamatórios crônicos como os que acompanham as DRC. A All promove um aumento da infiltração de células inflamatórias, como os leucócitos e macrófagos, levando à inflamação e ao acúmulo de matriz extracelular intersticial que causa a fibrose [8, 9]. Esses efeitos são mediados principalmente por sua ligação com o receptor do tipo I (AT_1), o qual medeia, além dos efeitos vasculares da All, também seu efeito pró-inflamatório. Já o outro receptor da All, o receptor do tipo 2 (AT_2), ainda não tem seu papel plenamente definido, uma vez que existem indícios conflitantes sobre o efeito desse receptor sobre os processos inflamatórios [10-12]. Esses efeitos múltiplos da All, hemodinâmicos e inflamatórios, ajudam a explicar por que esse peptídeo favorece fortemente a progressão das DRC [2, 13-15].

Mediadores intracelulares do efeito inflamatório da All: o sistema NF- κ B

Os efeitos inflamatórios da All são mediados por vários sistemas de sinalização intracelular, tais como erk, MAPK, jnk/stat, cfos. Dentre esses o NF- κ B é um dos mais importantes e onipresentes [16-18]. O NF- κ B é um fator nuclear de transcrição que regula a expressão de genes essenciais à resposta imune, à embriogênese, à apoptose celular, ao ciclo celular, à inflamação e à oncogênese. Por exemplo, esse fator está envolvido na transcrição do MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), que participa ativamente do desenvolvimento de inflamação renal, da RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), uma quimiocina responsável pelo recrutamento de células inflamatórias [17, 19] e da ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), que promove a adesão de leucócitos ao endotélio vascular [18, 20, 21].

O sistema NF- κ B, identificado primeiramente em linfócitos B (daí o seu nome) é ativado por fatores sabidamente associados à inflamação, como irradiação ultra-violeta (UV), citocinas, mitógenos, metais tóxicos, lipopolissacárides bacterianos (LPS), infecções virais e estresse oxidativo [17, 18, 20]. Além disso, é possível que o NF- κ B seja ativado em células epiteliais tubulares quando ocorre quebra da barreira glomerular e proteinúria intensa [16] e que o aparecimento desta possa além disso estar relacionado à ativação do NF- κ B nos podócitos, conforme descrito na nefrite de Heymann [22]. A exposição contínua a proteínas durante o processo de reabsorção faz com que

nas células tubulares ocorra produção de RANTES e outros mediadores inflamatórios [23], com a participação do sistema NF- κ B.

Existem cinco proteínas pertencentes à família do NF- κ B que podem formar complexos homo ou heterodiméricos estáveis, são elas: RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50) e NF- κ B2 (p52). O complexo mais importante é o heterodímero formado pela associação entre as subunidades p65 e p50. Esse dímero encontra-se na sua forma inativada no citoplasma devido a sua associação com proteínas inibitórias denominadas I- κ Bs. Para que ocorra a ativação do NF- κ B é necessário que haja um sinal para a degradação proteolítica da I- κ B, que libera o complexo p65/p50, permitindo sua translocação do citoplasma para o núcleo, onde ele se liga a regiões promotoras específicas e promove a transcrição de genes que codificam uma série de mediadores inflamatórios. Vale ressaltar que os homodímeros p50/p50 e p52/p52 funcionam como repressores da transcrição [17, 19, 20, 23, 24], oferecendo assim um freio à ativação perpétua do sistema.

Considerando o papel do NF- κ B como um mediador intracelular da inflamação, seria de se esperar que sua inibição exercesse um efeito renoprotetor na DRC. Estudos experimentais realizados anteriormente em nosso laboratório [25] demonstraram que o tratamento com Pirrolidina Ditiocarbamato (PDTC) atenua a lesão renal e a inflamação no modelo de ablação renal de 5/6. O PDTC é um agente antioxidante que impede a fosforilação da proteína inibitória I- κ B, inibindo assim a liberação do complexo

p65/p50, que não chega ao núcleo, deixando de promover a transcrição dos genes alvo [22].

Papel da All na nefrogênese

Além de seus efeitos pró-inflamatórios, a All pode influenciar profundamente a organogênese. A administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) ou de antagonistas do receptor AT1 (aAT₁r) durante a gravidez de mamíferos pode interferir na nefrogênese, levando à formação de rins com menor número de néfrons e nefropatia progressiva [26-28]. Em roedores, a nefrogênese se completa durante os primeiros 18 dias de vida extra-uterina [29], ou seja, durante a maior parte do período de lactação. No rim, os componentes do SRA são sintetizados localmente e são detectados do 12^o ao 17^o dia de gestação, aparecendo em maior quantidade no feto e no recém nascido do que nos adultos. É durante esse período que a administração de iECA e aAT₁r promove seu efeito adverso sobre a nefrogênese, levando ao desenvolvimento de DRC na vida adulta [26, 30, 31], quando esses animais passam a exibir atrofia papilar, redução da capacidade de concentração urinária, expansão e fibrose intersticiais e infiltração por células inflamatórias, com atrofia e dilatação tubular. Além disso, há redução da filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal. As arteríolas apresentam-se escassas e suas paredes espessadas. Observa-se também hipertensão sistêmica tardia, alterações túbulo-intersticiais e glomerulares e redução no número de néfrons [32].

Corroborando esses achados, estudos experimentais realizados anteriormente em nosso laboratório [33] mostram que os animais que receberam Losartan (LO), um aAT1r, na dose de 250 mg/kg/dia entre os dias 2 e 22 após o nascimento apresentaram aos 3 meses de vida um aumento da excreção urinária de albumina, expansão intersticial e infiltração de macrófagos, sugerindo uma lesão renal discreta. Aos 9 meses de vida esses animais apresentaram um aumento acentuado da pressão arterial, da excreção urinária de albumina, da intensidade da inflamação renal e das lesões glomerulares e intersticiais, chegando a desenvolver insuficiência renal. Além disso, os animais que receberam LO apresentaram uma redução no número de néfrons. Esses resultados corroboram os achados de que o bloqueio da All durante a lactação de roedores interfere no desenvolvimento renal, promovendo alterações histopatológicas renais irreversíveis. Utilizamos esse efeito deletério da All para padronizar um novo modelo experimental de DRC, que vem sendo utilizado desde então.

O sistema NF- κ B participa da nefrogênese?

Assim como a All, o sistema NF- κ B provavelmente tem um papel importante no desenvolvimento embrionário [24]. Como foi descrito por Bushdid e colaboradores [34] e Kanegae e colaboradores [35], a expressão do gene c-Rel do NF- κ B é importante no desenvolvimento das ramificações que originam os membros dos vertebrados na fase embrionária, sugerindo que o NF- κ B é

também importante para o desenvolvimento do broto uretérico no rim, talvez por mediar, parcial ou totalmente, os efeitos da All sobre a embriogênese. Além disso, sabe-se que o modelo experimental de camundongos *knockout* para o gene RelA do NF- κ B leva a um fenótipo embriogênico letal, associado com apoptose celular maciça no fígado, enquanto que camundongos *knockout* para o gene p50 não apresentam nenhum tipo de anormalidade no desenvolvimento. No entanto, pouco se conhece sobre a ação do NF- κ B sobre a nefrogênese [24].

Tendo em vista que o NF- κ B age como um fator de transcrição para o desenvolvimento do sistema imune, da regulação do ciclo celular e da apoptose e intermedeia várias ações da All, é razoável supor que a via do NF- κ B possa mediar também os efeitos da All sobre a nefrogênese.

1.1. Objetivo do estudo

O objetivo do presente estudo foi o de investigar um possível efeito da inibição do sistema NF- κ B sobre a nefrogênese. Para tanto, administramos a ratas lactantes o PDTC, que se transmitiu à prole através do leite materno. Nossa expectativa era a de que obteríamos um quadro semelhante ao verificado em ratos que receberam inibidores do SRA durante a lactação, ou seja, desenvolvimento de DRC na vida adulta. Não obtivemos o efeito teratogênico esperado, mas observamos o desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta, cuja patogênese procuramos elucidar.

2. MÉTODOS

Neste estudo utilizamos ratos Munich-Wistar obtidos do biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), com umidade relativa do ar de $60\pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo n° 669/06).

Utilizamos ratas fêmeas com suas respectivas proles compostas de 6 filhotes (machos e fêmeas). Durante os primeiros 20 dias de lactação, as mães receberam um inibidor do sistema NF- κ B, o PDTC, na dose de 280 mg/kg/dia, diluído na água do bebedouro. Essa dose foi baseada em testes prévios realizados neste laboratório, em que foi utilizado o PDTC na dosagem de 60 mg/kg/dia como forma de tratamento para doenças renais progressivas [25]. A dose de 280 mg/kg/dia foi a maior possível para que não houvesse morte precoce dos animais ou grande perda de peso por parte das matrizes. Após o desmame, os filhotes do sexo masculino foram acompanhados, sem qualquer outro tratamento, por um período de 10 meses em gaiolas onde receberam água e ração. Todos os animais receberam ração obtida comercialmente (Nuvilab, Curitiba, PR), acrescida de 15% de caseína e com livre acesso à água e alimentação.

2.1. Grupos experimentais

- **C:** 26 ratos cujas mães receberam água no bebedouro durante a amamentação, dos quais 13 foram estudados aos 3 meses e 13 aos 10 meses de idade.
- **PDTC:** 42 ratos cujas mães receberam PDTC na dose de 280 mg/Kg/dia diluído na água do bebedouro durante a amamentação, dos quais 13 foram estudados aos 3 meses e 29 aos 10 meses de idade.

2.2. Esquema do Protocolo Experimental



Protocolos experimentais

1) Aos 3 meses de idade avaliamos:

- o número de glomérulos por rim através de duas técnicas: 1) infusão de nanquim seguida de digestão ácida tecidual [36, 37] e 2) contagem através da adaptação de um método estereológico [38];
- a expressão gênica dos componentes do SRA e dos transportadores tubulares através da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR);
- a pressão sistólica caudal (PC), a albuminúria de 24 horas ($U_{alb}V$) e a concentração sérica de creatinina (Scr);

- a medida da concentração plasmática de sódio (P_{Na}) e potássio (P_K) por eletrodo específico;
- a medida das concentrações de excreção de sódio (U_{Na}) e de potássio (U_K) por eletrodo específico, e cálculo das respectivas taxas de excreção urinária (E_{Na} e E_K);
- a medida da atividade plasmática de renina (APR) e da concentração de aldosterona (ALDO) por kit comercial;
- as porcentagens de esclerose glomerular (EG) e de interstício cortical (INT);
- o peso do ventrículo esquerdo (PVE), o diâmetro transverso do miócito (DTM) e a taxa de fibrose miocárdica (FVE);

2) Aos 10 meses de idade avaliamos:

- a expressão gênica dos componentes do SRA e dos transportadores tubulares através da técnica de qRT-PCR;
- a PC, $U_{alb}V$ e Scr;
- a medida da P_{Na} e P_K ;
- a medida de U_{Na} e U_K e o cálculo de E_{Na} e E_K ;
- a dosagem da APR e ALDO no plasma;
- as porcentagens de EG e de INT;
- o PVE, o DTM e a FVE;

Após o desmame, o crescimento dos animais dos Grupos C e PDTC foi acompanhado ao longo do estudo. Aos 3, 6 e 10 meses de vida realizamos a medida de $U_{alb}V$ através da técnica de imuno-difusão radial [39] e determinamos a PC após breve aquecimento com o auxílio de um sistema semi-automático (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos).

Para os estudos histológicos (aos 3 e 10 meses de idade) os animais foram anestesiados com Ketamina (Cristália, 50 mg/kg) e Rompun (Bayer, 10 mg/kg) e submetidos a uma laparotomia mediana. A aorta abdominal foi ligada acima das artérias renais e um tubo de polietileno foi inserido na artéria aorta logo abaixo das artérias renais. Para a determinação da Scr, ALDO, P_{Na} , P_K foram coletadas amostras de sangue da aorta momentos antes da perfusão. O rim direito foi retirado, congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto o rim esquerdo foi perfundido a uma pressão igual à sistêmica, inicialmente com salina para uma breve lavagem e em seguida, para a fixação *in situ*, com a solução de Duboscq-Brazil. Após a perfusão renal, o rim esquerdo foi pesado e dividido em 2 ou 3 segmentos coronais de 4-5 mm de espessura, os quais foram pós-fixados em formaldeído a 10% em tampão fosfato. O coração também foi pesado e lavado com solução salina. Em seguida foi retirado o arco aórtico e o ventrículo esquerdo foi separado do ventrículo direito e preparado para análise histológica conforme descrito acima.

2.3. Histologia

As amostras renais e cardíacas preparadas conforme descrito acima foram catalogadas, etiquetadas, colocadas em recipientes de aço inoxidável perfurados e mantidas durante 14h em um processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemanha) para a desidratação, diafanização e impregnação em parafina. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 4 μm , que foram corados pela reação do ácido periódico de Schiff (PAS) para quantificação de EG e pelo tricrômio de Masson para quantificação INT.

O grau de EG de cada rato foi avaliado determinando-se a porcentagem de glomérulos que apresentavam lesões inequívocas. A INT foi quantificada por um método de contagem de pontos [40] em 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x.

Na avaliação histológica do tecido cardíaco, utilizamos a técnica de PAS para a mensuração da hipertrofia do miócito, avaliado pelo DTM e a técnica de Tricrômio de Masson para a mensuração da fibrose cardíaca avaliado pelo FVE. Para a análise da hipertrofia cardíaca, foi medido o diâmetro transversal de aproximadamente 40 fibras de todo o ventrículo esquerdo no aumento de 400X, sempre na região do núcleo. O tecido corado com Tricrômio de Masson foi quantificado por um método de contagem de pontos no aumento de 200X e os resultados obtidos foram expressos como porcentagem do total.

Todas as medidas morfométricas foram realizadas utilizando um microscópio acoplado a um monitor de vídeo.

2.4. Dosagens bioquímicas

A dosagem da Scr foi realizada utilizando um sistema colorimétrico comercial (Kit Labtest Diagnóstica S.A.).

A dosagem de P_{Na} e P_K foi realizada utilizando um aparelho dotado de eletrodos específicos (Easy Lyte Na/K Analyser, Medica Corporation, MA – Estados Unidos). O mesmo aparelho foi usado para a mensuração do U_{Na} e U_K , que foi realizada na diluição 1:10.

A ALDO foi dosada pelo método de radioimunoensaio, pelo kit comercial COAT-ACCOUNT Aldosterone (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles – CA).

A APR foi dosada pelo método de radioimunoensaio, utilizando um kit comercial (GammaCoat® Plasma Renin Activity, DiaSorin, Stillwater - MN).

2.5 Contagem do número de glomérulos

A quantificação do número de glomérulos por rim foi realizada através da adaptação da técnica de infusão de nanquim e digestão do tecido renal com ácido clorídrico (HCl) [37, 40, 41]. Após 3 meses de vida, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (Cristália, 50 mg/kg) e rompun (Bayer,

10 mg/kg) e submetidos a uma laparotomia mediana. O rim direito foi perfundido com solução fisiológica e em seguida com solução de nanquim (Acrilex, São Bernardo do Campo - SP), aproximadamente 10 mL diluído a 1:5 em soro fisiológico. Após a perfusão, o rim direito foi removido, a cápsula renal foi retirada e o córtex isolado da região medular. O tecido cortical renal foi fragmentado com o auxílio de uma navalha e levado a uma solução de HCl 50% a 37°C em banho-maria por 1 h. Para que a reação de digestão do tecido fosse interrompida, a solução de HCl foi substituída pela solução fisiológica gelada (10 ml) e mantida refrigerada até o dia seguinte. Após 24 h, o material foi submetido à agitação em vórtex, sob alta velocidade, até que o tecido renal ficasse finamente granuloso. O volume foi completado para 15 mL com solução fisiológica e em seguida foi retirado 1 mL para a contagem do número de glomérulos. A solução foi colocada em uma placa de Petri de vidro e a contagem realizada com o auxílio de uma lupa e uma grade. A contagem foi realizada por 2 observadores e em duplicata. O número de glomérulos obtido, através da média das contagens realizadas por dois observadores, em 1 mL da solução foi multiplicado pelo volume total para estimar o número de glomérulos por rim.

Além disso, foi realizada a contagem de glomérulo por um método estereológico adaptado [38]. Foram feitos cortes seriados de 4 μm do tecido renal, que havia sido perfundido como descrito anteriormente. O cálculo da densidade numérica de glomérulos foi realizada aplicando-se a fórmula

$NV = \sum Q / (h \cdot \sum p)$, onde $\sum Q$ é o número de glomérulos contados, $\sum p$ é o número de campos analisados e h é a espessura da região virtual analisada. Em seguida, foi mensurado o volume total do córtex renal para que pudéssemos obter o número total de glomérulos por rim.

2.6. Análise da expressão gênica dos componentes do SRA e dos transportadores moleculares

O qRT-PCR foi utilizado para a análise da expressão de genes candidatos selecionados que poderiam ter relação com o desenvolvimento da hipertensão. Os genes considerados potenciais candidatos foram os componentes do SRA: angiotensinogênio (AGT), Renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), AT1a, AT1b e alguns transportadores tubulares: transportador sódio/glicose isoforma 1 (SGLT1), trocador sódio/hidrogênio isoforma 3 (NHE3), transportador sódio/bicarbonato (NBC), transportador sódio/fosfato ($\text{Na}^+/\text{HPO}_4^{2-}$), cotransportador sódio/potássio/2cloretos (NKCC), cotransportador sódio/cloreto (NCC), canal de sódio epitelial (ENaC) e canal de potássio (ROMK). Utilizamos para esse experimento amostras de tecido renal congeladas na temperatura de -70°C de ratos com 3 e 10 meses de vida dos grupos C (n=12) e PDTC (n=12).

O desenho de pares de oligo iniciadores (*primers*) foi feito para os genes AGT, renina, ECA, AT1a, AT1b, SGLT1 (Slc5a1), NHE3 (Slc9a3), NBC (Slc4a4), $\text{Na}/\text{HPO}_4^{2-}$ (Slc34a1), NCC (Slc12a3), NKCC (Slc12a1), ENaC

(Scnn1b), ROMK (Kcnj1) como mostra a tabela 1. Os parâmetros utilizados para a construção desses primers foram: tamanho dos *primers*: 18 – 20 nucleotídeos, tamanho do produto de amplificação: 80 – 200 nucleotídeos, temperatura de anelamento do *primer*: 58 – 60°C, conteúdo de G/C: de 40 – 60%. A síntese dos *primers* foi realizada pela Invitrogen Technologies (Brasil).

A extração e preparação do RNA total compreenderam cinco fases: a homogeneização com Trizol® (Gibco/BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA), a separação das fases com clorofórmio, a precipitação com isopropano, lavagem do precipitado de RNA total e ressuspensão do material com água isenta de RNases. Sua concentração foi determinada a partir da medida de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (ND-1000 spectrophotometer – Nanodrop Technologies, Inc.). A integridade das amostras foi verificada através da reação de eletroforese em gel de agarose 0,8% com 0,05% de brometo de etídio a 100 volts por aproximadamente 20 minutos. Após o término da corrida, a visualização das bandas foi feita por meio de um sistema de luz ultravioleta (UV) acoplado a uma câmera digital (Eagle Eye, Stratagene). Foram utilizadas no presente estudo apenas as preparações íntegras e sem indício de degradação.

A síntese do cDNA foi feita a partir da transcrição reversa do RNA utilizando o kit *Superscript III* (Invitrogen Technologies Brasil). Para verificar a especificidade dos primers desenhados foi realizada uma reação de PCR convencional, comprovando complementaridade destes com os fragmentos de cDNA correspondentes aos genes alvo. Posteriormente prosseguimos com a

reação de qRT-PCR. A reação do Real-Time PCR foi realizada usando o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) e a quantificação relativa da expressão do gene foi realizada com o auxílio do aparelho ABI Prism® 7500 Fast System (Applied Biosystem, Foster City, CA). Os valores da expressão gênica relativa foram avaliados com o método 2^{-DDCt} [42] usando a ciclofilina como gene normalizador. Os resultados foram apresentados como porcentagem da variação da diferença do grupo PDTC com relação ao seu respectivo grupo C aos 3 e 10 meses.

2.7. Análise estatística

Os resultados deste estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores com comparações pareadas entre grupos quanto ao tratamento e quanto ao tempo de vida. Foi utilizado o pós-teste pelo método de Bonferroni [40] para as comparações. Os resultados referentes ao número de glomérulos e aos experimentos de qRT-PCR foram analisados através de teste de *t* de Student não pareado. Todos os resultados estão representados como média±erro padrão (EP).

3. RESULTADOS

3.1. Estudos de longo prazo

Os animais foram acompanhados até os 10 meses de vida e foram realizadas medidas de peso corpóreo (PE), PC e $U_{Alb}V$ aos 3, 6 e 10 meses de vida que estão representadas na Tabela 2 e nas Figuras 1, 2 e 3.

Os animais de ambos os grupos apresentaram evolução do PE (Figura 1) de acordo com o envelhecimento. O grupo que recebeu o tratamento apresentou diferença significativa em relação ao Grupo C aos 6 e 10 meses ($p < 0,05$). Os resultados da PC estão representados graficamente na Figura 2. Ao longo dos 10 meses de estudo, os animais do grupo PDTC apresentaram PC significativamente elevada (em cerca de 30 a 40 mmHg) aos 3, 6 e 10 meses em comparação com o Grupo C ($p < 0,05$).

Na Figura 3 estão representados graficamente os resultados das medidas da $U_{alb}V$. Observamos que, com o envelhecimento, há um aumento discreto na albuminúria ($p < 0,05$), não ocorrendo elevações significativas nos ratos tratados com o PDTC durante a lactação em relação ao controle.

Além dos resultados apresentados durante os 10 meses de estudo, os animais foram pesados no primeiro dia de vida, uma vez que o baixo peso ao nascimento pode determinar o desenvolvimento de hipertensão na vida adulta

[43, 44]. Os valores estão representados na Figura 4, sendo evidente que, ao nascer, os animais dos grupos C e PDTC não haviam diferido quanto ao PE.

Após a perfusão, o tecido renal e o ventrículo esquerdo foram pesados. Os resultados foram corrigidos pelo PE e estão representados na Figura 5 e na Tabela 3. Não foi observada diferença significativa entre os grupos C e PDTC aos 3 e 10 meses de vida ($p > 0,05$). Aos 10 meses de vida ambos os grupos apresentaram redução no peso do rim e do ventrículo esquerdo, quando corrigidos pelo PE ($p < 0,05$).

As concentrações de P_{Na} e P_K , Scr e ALDO, medidas a partir de sangue coletado da aorta no momento da perfusão, bem como a E_{Na} , a E_K e a APR, estão representados na Tabela 4. As concentrações de P_{Na} e P_K estão representadas graficamente nas Figuras 6 e 7. A concentração de P_{Na} (Figura 6) não foi diferente entre os grupos aos 3 meses ($p > 0,05$) e aos 10 meses ($p > 0,05$). A concentração de P_K (Figura 7) mostrou resultado semelhante, não havendo diferença entre os grupos C e PDTC aos 3 meses ($p > 0,05$) e aos 10 meses ($p > 0,05$). A E_{Na} e E_K estão representadas graficamente nas Figuras 8 e 9. A E_{Na} (Figura 8) e E_K (Figura 9) apresentaram padrão semelhante ao observado com a concentração de P_{Na} e P_K entre os grupos C e PDTC aos 3 meses ($p > 0,05$) e aos 10 meses ($p > 0,05$). A Scr está representada graficamente na Figura 10. Aos 3 e 10 meses de vida, a Scr foi semelhante nos dois grupos ($p > 0,05$). Conforme representado na Figura 11, a APR apresentou-se diminuída nos animais do Grupo PDTC em comparação com o Grupo C aos 3 meses de vida ($p < 0,05$). Aos 10 meses, não foi observada nenhuma diferença significativa

da APR entre os Grupos C e PDTC ($p>0,05$). A Figura 12 representa graficamente a concentração plasmática de ALDO. Aos 3 e 10 meses de vida não foi observada diferença significativa na ALDO entre os Grupos C e PDTC ($p>0,05$).

Análise histológica

Utilizando os tecidos renais corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricrômio de Masson, avaliamos a porcentagem de EG e de INT. Os resultados estão apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16 e na Tabela 5. Os animais do Grupo PDTC apresentaram porcentagem de EG (Figuras 13 e 14) semelhante à do Grupo C, tanto aos 3 meses quanto aos 10 meses de idade ($p>0,05$). Observou-se um discreto aumento numérico na porcentagem de EG com o envelhecimento dos animais, que, no entanto foi significativo apenas no Grupo C ($p<0,05$). Com cortes teciduais corados pela técnica do Tricrômio de Masson, quantificamos a expansão intersticial (Figuras 15 e 16), que também não se apresentou alterada nos 3 e 10 meses de vida. Novamente, os animais do grupo PDTC apresentaram porcentagem de INT semelhante à dos animais controle tanto aos 3 quanto aos 10 meses de idade ($p>0,05$).

Com o tecido cardíaco corado pela técnica de PAS foi possível mensurar o DTM dos animais dos grupos C e PDTC, representado nas Figuras 17 e 18 e na Tabela 5. Os animais que receberam o PDTC durante os 20 primeiros dias de vida apresentaram apenas um aumento numérico no DTM quando

comparados com o Grupo C ($p>0,05$) aos 3 meses. Já aos 10 meses de idade esses animais apresentaram um aumento importante e significativo no DTM ($p<0,05$), indicando que o miócito já estava hipertrofiado. Com os cortes teciduais de miocárdio corados pela técnica de Tricrômio de Masson foi possível quantificar a porcentagem de FVE dos animais dos grupos C e PDTC. As Figuras 19 e 20 e a Tabela 5 representam a porcentagem de FVE. Assim como a hipertrofia, os animais que receberam o PDTC neonatal não apresentaram aumento significativo no tecido cardíaco aos 3 meses de idade ($p>0,05$), enquanto aos 10 meses de vida os animais apresentaram um aumento significativo na porcentagem de FVE em comparação com o Grupo C ($p<0,05$). Nota-se que nos animais do Grupo PDTC esse aumento foi significativo para os dois parâmetros analisados quando comparados com o mesmo grupo aos 3 meses de vida ($p<0,05$).

3.2. Contagem de glomérulos

Para avaliar o número de glomérulos por rim utilizamos a técnica de infusão de nanquim e digestão do tecido com HCl 50% como mostra a figura 21. Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 22). Uma vez que o número de glomérulos é extremamente importante para a interpretação do presente estudo, e dada a limitação da técnica de infusão de nanquim, a análise foi repetida utilizando um método estereológico, mais preciso. Os dados estão representados na Figura 23, e confirmam a observação de que a administração

de PDTC durante a lactação não promoveu redução perceptível do número de néfrons na prole ($p>0,05$).

3.3. Expressão gênica dos componentes do sistema renina-angiotensina e dos transportadores tubulares

O qRT-PCR foi utilizado para a análise da expressão dos genes, AGT, renina, ECA, AT1a, AT1b, SGLT1, NHE3, NBC, Na/HPO₄²⁻, NKCC, NCC, ENaC e ROMK, que poderiam estar envolvidos na patogênese da hipertensão no Grupo PDTC aos 3 e 10 meses de vida. Os resultados estão representados nas Figuras 24 e 25.

Com relação à expressão dos componentes do SRA (Figura 24), observamos que houve um aumento significativo do AGT e da renina nos animais do Grupo PDTC aos 3 meses de idade quando comparados aos do Grupo C ($p>0,05$). No entanto, a expressão de todos os componentes do SRA aos 10 meses de idade estava diminuída no Grupo PDTC em comparação com os animais do Grupo C ($p<0,05$).

Com relação à expressão dos transportadores tubulares (Figura 25), notamos que aos 3 meses os animais do Grupo PDTC apresentaram um aumento significativo da expressão dos transportadores SGLT1 e NBC do túbulo proximal ($p<0,05$) e um aumento numérico da expressão dos transportadores NHE3 no túbulo proximal e NCC no túbulo distal. A expressão dos canais ENaC e ROMK no túbulo coletor e do transportador NKCC na alça

de Henle estava numericamente reduzida aos 3 meses de vida, enquanto que a do transportador Na/HPO_4^- do túbulo proximal estava significativamente diminuída com a mesma idade ($p < 0,05$). Aos 10 meses de vida observamos uma diminuição significativa da expressão de quase todos os transportadores analisados ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O bloqueio da via do NF- κ B durante o período de lactação, durante o qual se desenvolve a fase final da nefrogênese, não provocou o aparecimento, na vida adulta, de proteinúria, lesões glomerulares ou intersticiais, ou alterações da função renal. Esses achados indicam que, em desacordo com a nossa hipótese de trabalho, as principais alterações renais observadas na literatura e obtidas anteriormente nesse laboratório com a administração de LO durante a lactação [26, 32, 33, 45, 46] não podem ser reproduzidas por uma inibição do sistema NF- κ B. Portanto, a participação desse sistema no processo de nefrogênese parece desprezível, indicando que a atuação da All durante essa fase depende da ativação de outros sistemas.

Embora não tenha sido detectada lesão renal apreciável nos ratos tratados com o PDTC durante a lactação, esses animais desenvolveram hipertensão arterial sistêmica, que já era evidente aos 3 meses de idade e se manteve até o final do estudo. Procuramos verificar se essa hipertensão, apesar de moderada, estava associada à lesão de pelo menos um órgão-alvo, no caso, o coração, uma vez que, aparentemente, o tecido renal não foi afetado. Não foi possível demonstrar, nem mesmo aos 10 meses de idade, um aumento do ventrículo esquerdo, comum em casos de hipertensão prolongada. No entanto, quando o tecido cardíaco obtido aos 10 meses de idade foi observado à microscopia ótica, foi possível observar que, mesmo na ausência de um aumento detectável do volume do ventrículo esquerdo esses animais já

apresentavam alterações, ainda que discretas, no tecido cardíaco. O DTM estava aumentado, indicando que um processo de hipertrofia miocárdica já se havia instalado. Além disso, foi possível observar a presença de fibrose miocárdica focal, o que demonstra que já se havia instalado um processo, ainda que incipiente, de lesão do órgão.

É concebível que as alterações cardíacas observadas neste estudo tenham decorrido de algum efeito da inibição do sistema NF- κ B durante a fase de lactação, ou mesmo de uma ação direta do PDTC sobre o tecido cardíaco embrionário, embora as informações a esse respeito na literatura sejam escassas. De acordo com Hernández-Gutierrez e cols [47] o NF- κ B é fortemente expresso no coração de galinhas durante a fase embrionária e sua inibição farmacológica promove graves alterações no desenvolvimento cardíaco devido a um aumento na taxa de apoptose. No presente estudo, entretanto, os animais tratados com o PDTC durante a lactação não apresentaram qualquer alteração miocárdica aos 3 meses de idade, quando a hipertensão arterial não se havia ainda desenvolvido, sugerindo ser mais provável que as anomalias observadas aos 10 meses de idade tenham decorrido da elevação crônica da pressão arterial, e não de alguma lesão ocorrida durante a organogênese.

Procuramos investigar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão associada ao tratamento com o PDTC. De acordo com a concepção mais aceita atualmente, a de Guyton [48-50], a patogênese da hipertensão arterial envolve sempre algum tipo de disfunção

renal: embora as demais funções tubulares, tais como acidificação, excreção de potássio, reabsorção de cálcio etc estejam preservadas, há sempre uma limitação à excreção de sódio, de modo a deslocar para a direita a linha da natriurese pressórica. Dessa forma, torna-se necessária uma elevação permanente da pressão arterial para que o balanço de sódio se mantenha. Na ausência desse comprometimento renal, a hipertensão simplesmente não se estabelece, mesmo na presença de um aumento da resistência vascular extrarrenal, conforme demonstrado recentemente pelos elegantes estudos de Coffman e colaboradores [51].

Uma das formas através das quais os rins poderiam ter sua capacidade de excretar sódio limitada é a redução do número de néfrons ao nascer. Brenner e colaboradores [52] e Keller e colaboradores [53] demonstraram que grande parte dos hipertensos adultos havia apresentado baixo peso corpóreo ao nascer, sugerindo que o número de néfrons desses pacientes também estava reduzido, uma vez que existe uma relação direta entre esses dois parâmetros. No presente estudo, o número de néfrons aos 3 meses de idade nos ratos tratados com PDTC durante a lactação, utilizando a técnica de infusão de tinta nanquim, foi muito semelhante ao observado nos ratos controle. Esse resultado persistiu mesmo depois de reavaliarmos o número de néfrons através de uma técnica estereológica, mais precisa e portanto mais apta a detectar pequenas diferenças entre os grupos. Assim, é altamente improvável que a hipertensão arterial observada no Grupo PDTC seja devida a uma redução do número de néfrons. Esse resultado difere frontalmente daquele observado no

modelo de nefropatia por administração de LO neonatal [31, 33, 54], no qual o número de néfrons é reduzido em mais de 30% em comparação com o controle. Naquele modelo, no entanto, a hipertensão arterial não se estabelece de imediato, possivelmente em decorrência de uma lesão tubular concomitante, que faz os animais comportarem-se como “perdedores de sal” [33].

Sabe-se que a redução do número de néfrons não é o único mecanismo possível para o desenvolvimento de hipertensão, uma vez que uma tendência à reabsorção exagerada de sódio nos túbulos renais pode provocar efeito semelhante, mais uma vez em consonância com a teoria de Guyton [55]. São exemplos disso o hiperaldosteronismo primário, a síndrome de Cushing e a estenose da artéria renal. Investigamos assim a hipótese de que a administração do PDTC durante a lactação tenha provocado, em vez de uma lesão à estrutura renal, uma limitação funcional à capacidade renal de excretar sódio, através da expressão exagerada, na idade adulta, de moléculas transportadoras de sódio em um ou mais segmentos do néfron. Anomalias desse tipo têm sido descritas com freqüência em ratos hipertensos [44, 56, 57], em especial no Rato Espontaneamente Hipertenso (SHR), um dos modelos mais amplamente utilizados de hipertensão experimental, no qual foi descrito um aumento da expressão dos canais ENaC, do cotransportador NHE3 e do cotransportador NKCC, situados na membrana luminal do túbulo coletor, do túbulo proximal e da porção espessa da alça de Henle, respectivamente [58-60]. Padrão semelhante também foi descrito em ratos hipertensos Dahl sensíveis a sal, que apresentam, assim como os ratos SHR, um aumento na

expressão dos cotransportadores SGLT1 [61] e NHE3, situados no túbulo proximal, e NKCC, localizado na porção espessa da alça de Henle. Além disso, verifica-se nesse modelo um aumento na expressão do canal ROMK situado no túbulo coletor [62]. Em outro modelo experimental de hipertensão, o rato Milan, a expressão dos cotransportadores NHE3 e NKCC não se altera. Nesses animais foi descrita uma diminuição na expressão do canal ENaC do túbulo coletor e um aumento na do transportador NCC situado no túbulo distal, considerado o responsável pela manutenção da hipertensão nesse modelo [63].

No presente estudo, procuramos examinar a expressão renal de alguns desses transportadores. Além disso, também analisamos a expressão dos componentes do SRA, uma vez que a ativação inadequada desse sistema é uma possibilidade óbvia para explicar o aparecimento da hipertensão [64]. Observamos, aos 3 meses de idade, um aumento significativo da expressão da renina e do AGT, sugerindo assim uma ativação do SRA, o que poderia causar uma elevação crônica da pressão arterial. No entanto, aos 10 meses de idade a expressão dessas moléculas, juntamente com a de todos os demais componentes do SRA estudados, mostrou-se acentuadamente diminuída em relação ao controle normal de mesma idade. Esses achados indicam que, ainda que uma ativação do SRA possa ter contribuído para elevar a pressão arterial em animais jovens, a manutenção da hipertensão em fases posteriores depende da ação de outros fatores. É importante considerar que a expressão de componentes do SRA no tecido renal esteve sempre em desacordo com a atividade de renina na circulação sistêmica. Aos 3 meses de idade, apesar da

expressão renal aumentada da renina e do AGT, a atividade plasmática de renina estava significativamente diminuída nos ratos PDTC em comparação com o controle, indicando uma resposta compensatória à hipertensão ou a uma possível expansão do volume extracelular [65]. Já aos 10 meses a expressão renal de renina e dos demais componentes do SRA estava diminuída, indicando uma resposta adaptativa, enquanto a atividade plasmática de renina havia retornado ao normal, sugerindo que, nessa fase, tal resposta adaptativa não mais se estendia à renina que chega à circulação.

Com relação à expressão dos transportadores tubulares, notamos que aos 3 meses de idade os animais do grupo PDTC apresentaram um aumento significativo da expressão de alguns transportadores de sódio no túbulo proximal. O aumento mais intenso foi o do cotransportador SGLT1 situado na membrana luminal desse segmento. Essa molécula é responsável pela reabsorção, em condições normais, da totalidade da glicose filtrada nos glomérulos. Em princípio, um aumento da expressão desse cotransportador no túbulo proximal não deveria resultar em uma retenção de sódio, uma vez que a quantidade de sódio reabsorvida juntamente com a glicose deve depender apenas da carga filtrada desta última (a qual, em condições normais, é totalmente reabsorvida). No entanto, se houver uma elevação da glicemia, ainda que dentro dos limites considerados normais, é possível que a reabsorção proximal de sódio aumente [66], levando a uma retenção de sódio e a uma elevação da pressão arterial. Não conseguimos detectar uma diferença com relação à glicemia entre o Grupo controle e o PDTC, embora tenha

ocorrido uma pequena elevação numérica neste último (dados não apresentados). É possível no entanto que exista uma diferença real entre os dois grupos, não detectável por ser da mesma ordem de magnitude do erro do método de dosagem. É possível também que ocorram variações da glicemia ao longo do dia, arrastando consigo a reabsorção de sódio.

Ainda aos 3 meses de idade, os animais que receberam PDTC neonatal apresentaram um aumento significativo na expressão do cotransportador NBC situado na membrana basolateral do túbulo proximal, mais uma evidência de que esses animais apresentam uma tendência a uma reabsorção exagerada de sódio. Não foi observado um aumento significativo na expressão do contratransportador NHE3 na membrana luminal desse mesmo segmento. Isso não significa que a taxa de transporte de sódio (e de bicarbonato) pela via NHE3/NBC não possa estar aumentada, uma vez que a expressão do contratransportador não reflete necessariamente sua capacidade de transporte [67-69]. O fluxo de sódio em direção ao interior da célula pode estar aumentado devido à translocação do NHE3 de organelas intracelulares para a membrana, mantendo constante a expressão global da proteína. Além disso, a conformação da molécula pode ser alterada, seja por protonação, seja por fosforilação. Em qualquer dos casos, ocorreria um aumento da capacidade de transporte de sódio no túbulo proximal, sem alteração do equilíbrio ácido-base, uma vez que, mesmo em condições normais, a reabsorção de bicarbonato no néfron já beira os 100% (85% no túbulo proximal). Quanto ao transportador sódio/fosfato, também presente na membrana luminal das células do túbulo

proximal, sua expressão se mostrou significativamente diminuída aos 3 meses de idade nos animais que receberam o PDTC durante a fase de lactação, indicando que essa molécula não deve ter participado da patogênese da hipertensão nessa fase.

A análise das principais moléculas transportadoras expressas nas porções do néfron que se seguem ao túbulo proximal não chegou a apontar nenhuma delas como um possível causador da hipertensão arterial no presente estudo. Aos 3 meses de idade, a expressão do cotransportador NCC situado no túbulo distal não estava significativamente aumentada. Do mesmo modo, não conseguimos detectar um aumento significativo na expressão dos canais iônicos ENaC e ROMK no túbulo coletor e do transportador NKCC na porção espessa da alça de Henle aos 3 meses de vida, indicando que essas moléculas não são responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão nesses animais nessa fase e indicando um efeito compensatório à ativação de outros transportadores. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o desenvolvimento de hipertensão nos ratos que receberam PDTC durante a lactação pode estar relacionado a uma disfunção nos mecanismos de transporte de sódio no túbulo proximal, associada a um desarranjo da expressão local de componentes do SRA.

Aos 10 meses de vida observamos uma diminuição significativa de todos os transportadores analisados. Esses achados são contrários ao que se esperaria caso pelo menos um desses transportadores contribuísse em longo prazo para a patogênese dessa hipertensão, em analogia com outros modelos

experimentais e situações clínicas. É provável que a redução da expressão desses transportadores constitua uma resposta compensatória à própria hipertensão, alimentada agora por fatores ainda desconhecidos. É possível que esses animais, hipertensos desde muito jovens, desenvolvam disfunção vascular, inclusive na circulação renal, o que poderia contribuir para perpetuar a hipertensão mesmo em face de uma diminuição da expressão da maior parte dos transportadores de sódio presentes no néfron. No entanto, diante da falta de evidências nesse sentido, essa possibilidade tem no momento natureza meramente especulativa.

É importante ressaltar que os dados obtidos neste estudo representam somente a expressão gênica dos componentes do SRA e dos transportadores tubulares renais estudados e não a síntese final dos respectivos produtos gênicos. No entanto, é pouco provável que haja uma incoerência nesse sentido. Ainda que houvesse, seria necessário postular que a síntese de algumas dessas proteínas estaria aumentada em desproporção ao aumento dos respectivos RNAm, o que parece muito pouco provável.

Quaisquer que sejam os mecanismos envolvidos na patogênese e manutenção da hipertensão arterial nos ratos tratados com PDTC durante a lactação, é indiscutível que estamos diante de um novo modelo de hipertensão arterial, em vários aspectos semelhante ao modelo SHR e à própria hipertensão essencial humana: não se trata de uma hipertensão rapidamente progressiva, nem se requer a administração contínua de drogas, como na inibição crônica do óxido nítrico, ou um procedimento cirúrgico, como na ablação renal de 5/6.

Ocorre lesão de órgãos-alvo, como o rim e o coração, mas de forma lenta. Na verdade, o fato de não havermos conseguido até agora caracterizar um mecanismo de hipertensão nesse modelo sugere que se trata de um processo complexo e multifatorial, à semelhança do que ocorre na hipertensão essencial humana. Por sua simplicidade e reprodutibilidade, é provável que esse novo modelo venha a se revelar uma ferramenta muito útil para o estudo dos mecanismos de hipertensão arterial e de novas possibilidades terapêuticas destinadas a promover o controle e, talvez, a cura dessa importante causa de morbidade e mortalidade em nosso meio e em todo o mundo.

5. CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado podemos concluir que:

1. A administração de PDTC durante a lactação, ao contrário do observado com o LO, não provoca redução no número de néfrons nem lesão renal detectável, indicando que o sistema NF- κ B não participa de forma crucial na nefrogênese;
2. O tratamento com o PDTC durante a lactação em ratos resulta em hipertensão persistente associada a hipertrofia cardíaca e fibrose miocárdica;
3. A hipertensão nos ratos tratados com PDTC não pode ser explicada por uma redução no número de néfrons, e pode estar relacionada a uma ativação do sistema renina-angiotensina e a uma reabsorção exagerada de sódio no túbulo proximal;
4. A administração de PDTC durante a lactação constitui um novo modelo de hipertensão essencial.

6. ANEXOS

6.1. Tabelas

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados no estudo.

	PRIMER I 5'→ 3'	PRIMER II 3'→ 5'
AGT	TCT ACC CTT TTG GGT GCT G	CAA GGA GGA TGC TGT TGA GA
Renina	ACG TGA GCA TCA GCA AGG	GAG ATA TAG GAT GTG CCA GT
ECA	CTT TGA CGG AAG CAT CAC C	CAG GAA CGT GGA ACT TGG A
AT1a	CAC AAC CCT CCC AGA AAG TG	AGG GCC ATT TTG TTT TTC TG
AT1b	GGC TTG AAA GAA GCC CAG A	CGA GGT GAA TTG CTC TCT GA
SGLT1 (<i>Slc5a1</i>)	CCT GCT GGC TAT TTT CTG C	GAT GAT CTT GGG GCA GTT G
NHE3 (<i>Slc9a3</i>)	CTG GCA CAC AAC TTC ACC A	ATC CTC GTC AGG GGA GAA C
NBC (<i>Slc4a4</i>)	CAA TGG ACA TCA CGG AAC A	GAG GCA CGA CTT TCA CTG G
Na⁺/HPO₄²⁻ (<i>Slc34a1</i>)	CTT CAA CAT CTC GGG CAT C	AGG TAG AGG ACG GCA AAC C
NCC (<i>Slc12a3</i>)	GCA GGT GAG GCT GAA TGA G	TGG TTA CCT CGG ATG AGG A
NKCC (<i>Slc12a1</i>)	GCA GAA CTG GAA GCA GTC AA	CAG GAG GGA GGT TCT TGG T
ENaC (<i>Scnn1b</i>)	CGT GTG GCT GCT CTC TAA	CAG GAG GCC ACT AGC TTG A
ROMK (<i>kcnj1</i>)	CTT CGG AAC GGA GTG TGT T	GCA TCC ACA TTG CCA AAC T

Angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina (ECA), receptor do tipo 1a da angiotensina II (AT1a), receptor do tipo 1b da angiotensina II (AT1b), cotransportador sódio/glicose isoforma 1 (SGLT1), trocador sódio/hidrogênio isoforma 3 (NHE3), cotransportador sódio/bicarbonato (NBC), cotransportador sódio/fosfato (Na⁺/HPO₄²⁻), cotransportador sódio/cloreto (NCC), transportador sódio/potássio/2cloreto (NKCC), Canal de sódio epitelial (ENaC), canal de potássio (ROMK).

Tabela 2. Estudo de longo prazo (3, 6 e 10 meses de idade).

	<i>PE</i>		<i>PC</i>		<i>U_{alb}V</i>	
	g		mmHg		mg/24hs	
	<i>C</i>	<i>PDTC</i>	<i>C</i>	<i>PDTC</i>	<i>C</i>	<i>PDTC</i>
3m	249±11	234±5	132±2	156±2 ^a	3,4±0,6	8,0±1,8
6m	359±7 ^b	324±3 ^{ab}	128±3	167±2 ^{ab}	6,4±2,3	6,8±1,3
10m	410±8 ^{bc}	370±4 ^{abc}	129±3	172±2 ^{ab}	21,0±4,2 ^{bc}	18,0±2,2 ^{bc}

Peso corpóreo (PE), pressão caudal (PC), excreção de albumina na urina de 24 horas (*U_{alb}V*) nos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação). Os resultados estão expressos como Média±EP, ^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m; ^cp<0,05 vs. respectivo 6m.

Tabela 3. Peso do tecido renal e cardíaco aos 3 e 10 meses de idade.

	<i>PRE/PE</i>		<i>PVE/PE</i>	
	<i>C</i>	<i>PDTC</i>	<i>C</i>	<i>PDTC</i>
3m	0,54±0,01	0,57±0,01	0,31±0,01	0,29±0,01
10m	0,45±0,01 ^b	0,45±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b

Peso do rim esquerdo corrigido pelo peso corpóreo (*PRE/PE*), peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corpóreo (*PVE/PE*) nos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação). Os resultados estão expressos como Média±EP, ^bp<0,05 vs. respectivo 3m.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos aos 3 e 10 meses de idade.

	3 meses		10 meses	
	C	PDTC	C	PDTC
P_{Na} (mEq/L)	142±2	147±2	141±2	142±2
P_K (mEq/L)	5,0±0,2	5,2±0,3	4,9±0,2	4,9±0,1
E_{Na} (mEq/L)	38,2±4,2	44,6±4,9	39,8±4,1	42,8±3,0
E_K (mEq/L)	85,5±10,2	112,6±14,9	102,3±9,0	111,4±6,3
Scr (mg/dl)	0,51±0,02	0,60±0,05	0,51±0,04	0,52±0,02
APR (AI/mL/h)	5,5±0,5	3,1±0,5 ^a	4,7±0,3	3,9±0,4
ALDO (pg/mL)	360±35	378±52	352±33	392±34

Concentração plasmática sódio (P_{Na}), concentração plasmática de potássio (P_K), taxa de excreção de sódio (E_{Na}), taxa de excreção de potássio (E_K), concentração sérica de creatinina (Scr), atividade plasmática de renina (APR) e concentração plasmática de aldosterona (ALDO). Os resultados estão expressos como Média±EP, ^ap< 0,05 vs. C.

Tabela 5. Parâmetros histológicos aos 3 e 10 meses de idade.

	3 meses		10 meses	
	C	PDTC	C	PDTC
%EG	0,2±0,1	0,2±0,1	2,3±1,02 ^b	1,1±0,3
%INT	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1
DTM (μm)	9,5±0,1	11,0±0,3	10,7±0,2	16,3±0,5 ^{ab}
%FVE	0,3±0,1	0,5±0,1	0,4±0,1	1,2±0,1 ^{ab}

Porcentagem de esclerose glomerular (%EG), porcentagem da expansão intersticial (%INT), medida do diâmetro transversal do miócito (DTM), porcentagem de fibrose no ventrículo esquerdo (%FVE). Os resultados estão expressos como Média±EP, ^ap< 0,05 vs. C, ^bp<0,05 vs. respectivo 3m.

6.2. Figuras

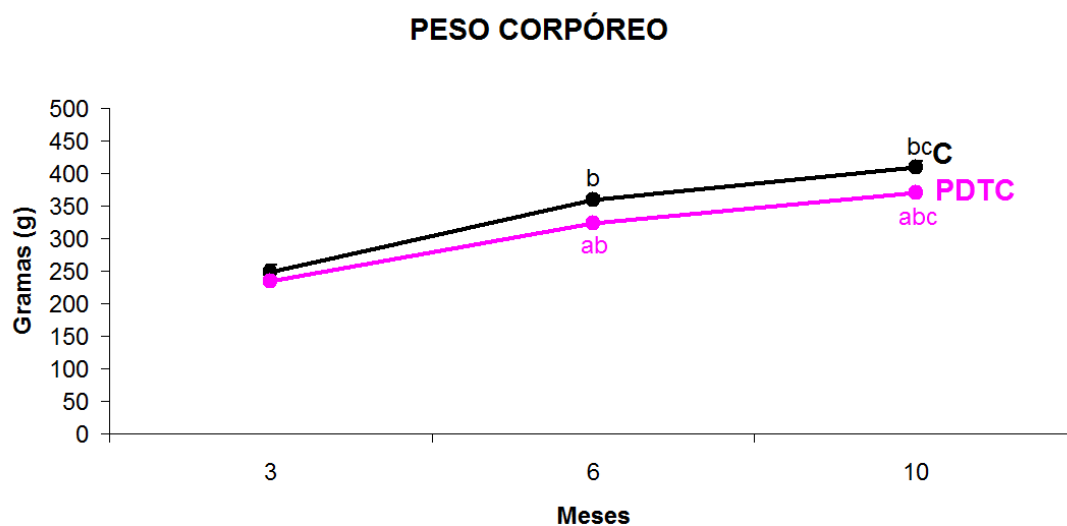


Figura 1. Evolução do peso corpóreo nos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação) ao longo do estudo. ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 6m.

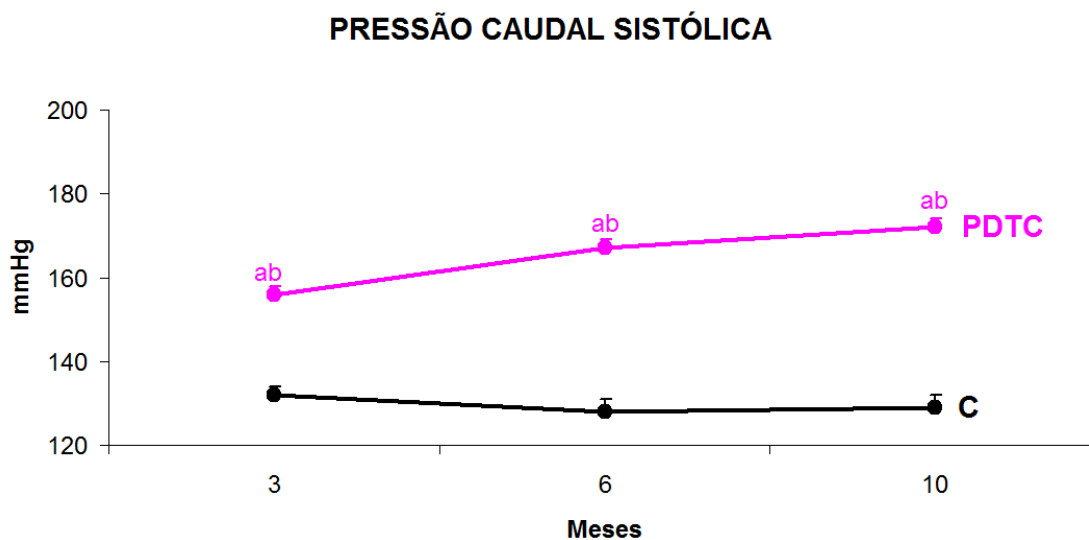


Figura 2. Pressão sistólica caudal (mmHg) dos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação), ao longo do estudo. ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m.

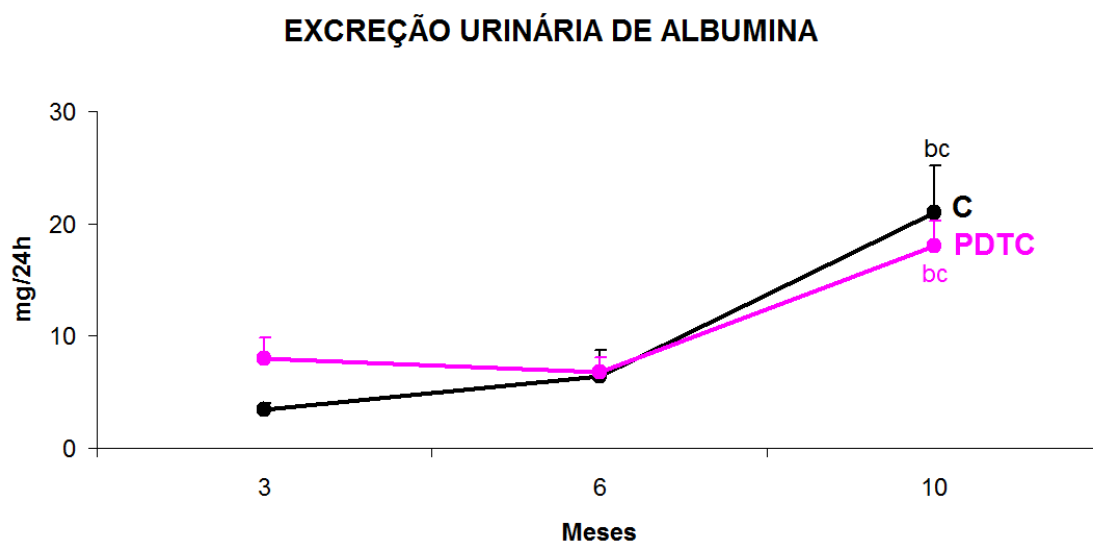


Figura 3. Excreção urinária de albumina (mg/24h) dos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação) ao longo do estudo. ^bp<0,05 vs. respectivo 3m; ^cp<0,05 vs. respectivo 6m.

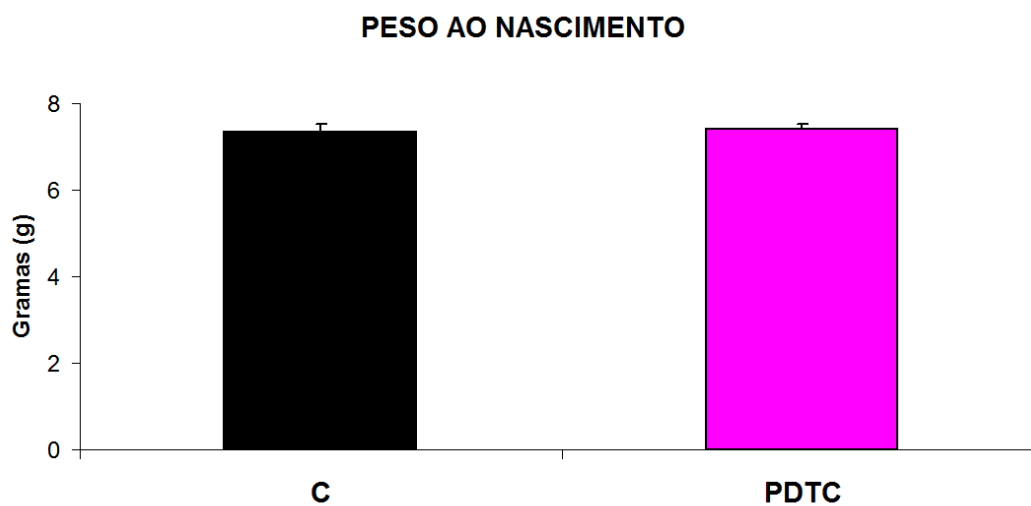


Figura 4. Gráfico referente ao peso ao nascimento dos animais dos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação).

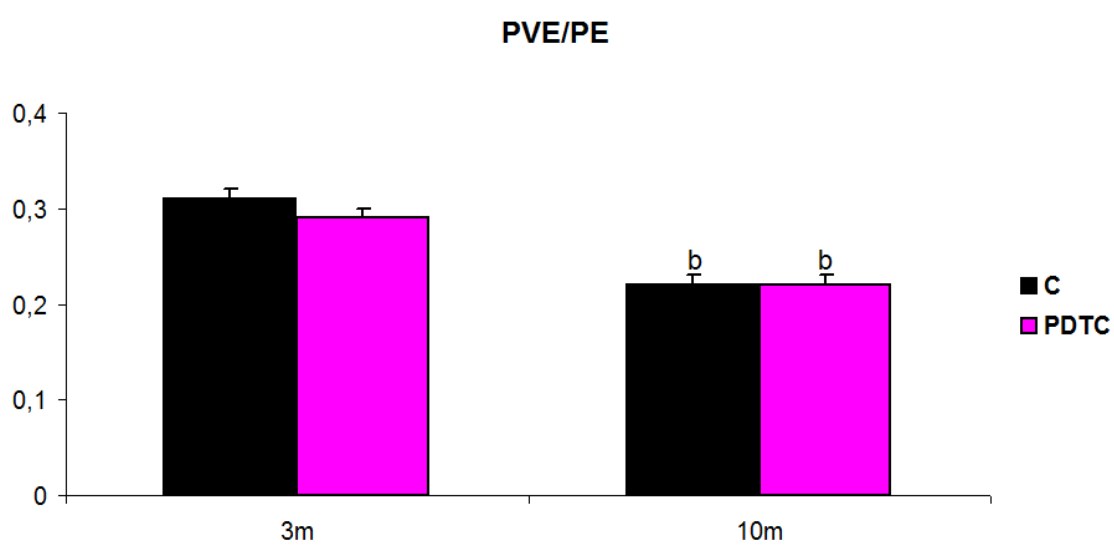


Figura 5. Gráfico referente ao peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corpóreo dos animais dos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação). ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m.

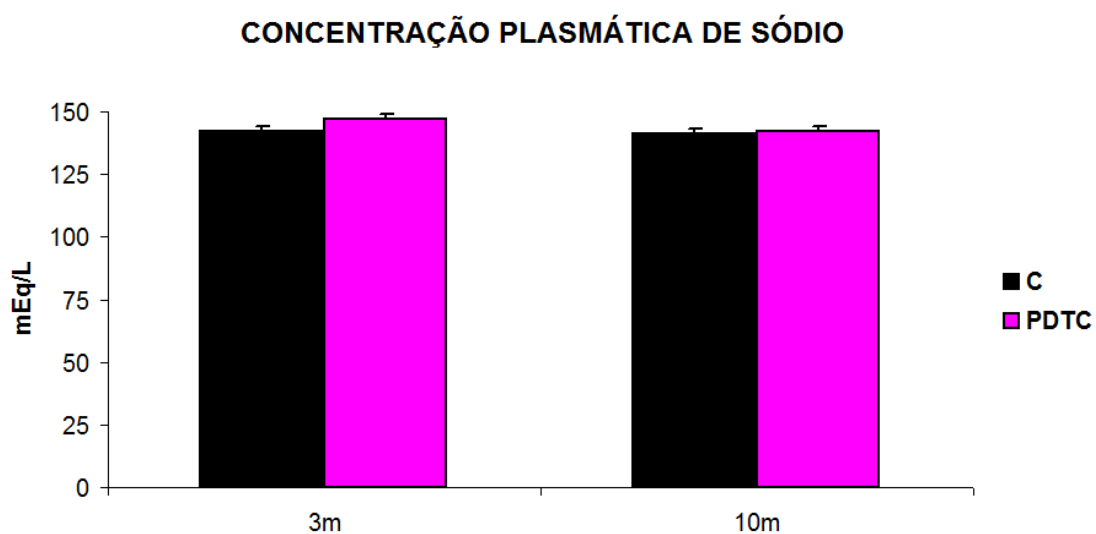


Figura 6. Gráfico referente a concentração plasmática de sódio (mEq/L) dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação).

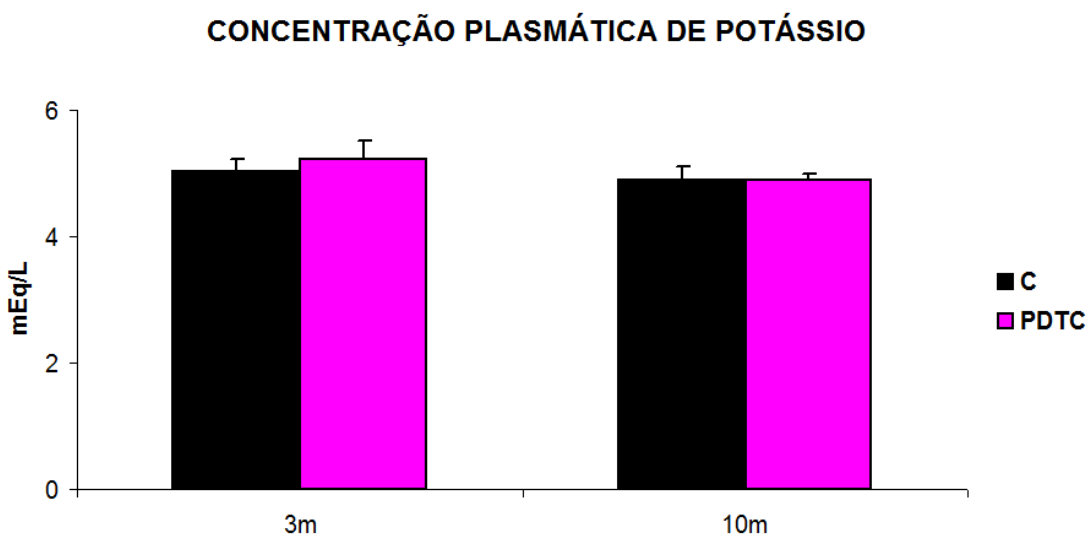


Figura 7. Gráfico referente a concentração plasmática de potássio (mEq/L) dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação).

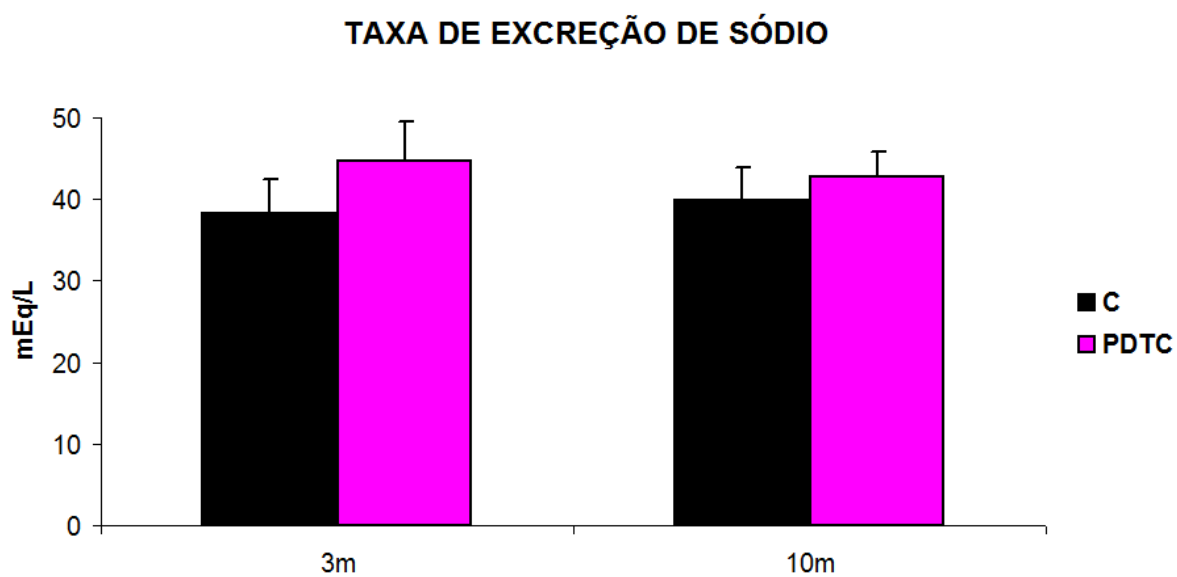


Figura 8. Gráfico referente à excreção de sódio (mEq/L) dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação).

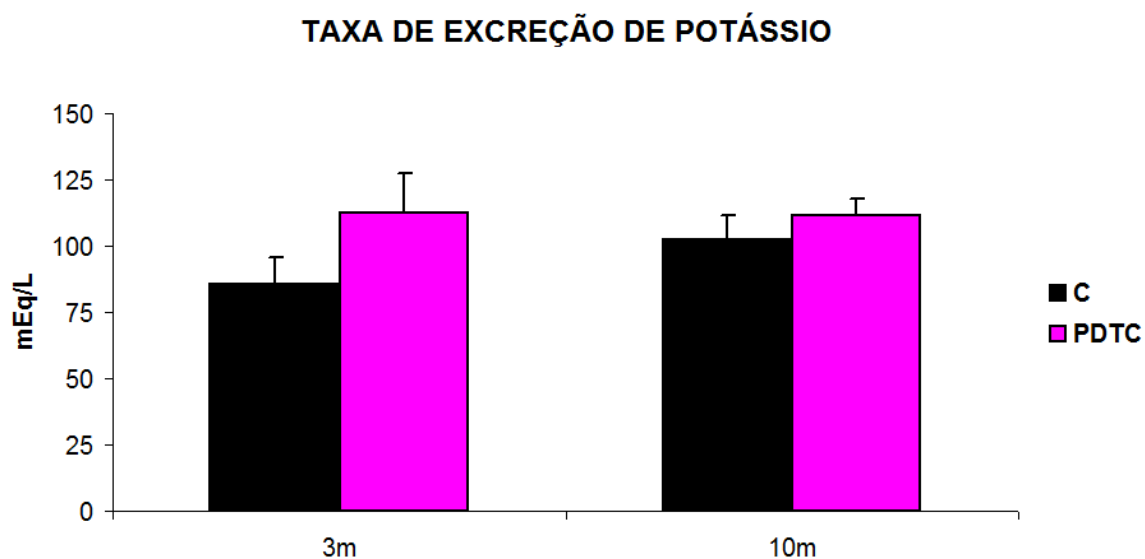


Figura 9. Gráfico referente à excreção de potássio (mEq/L) dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação).

CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CREATININA

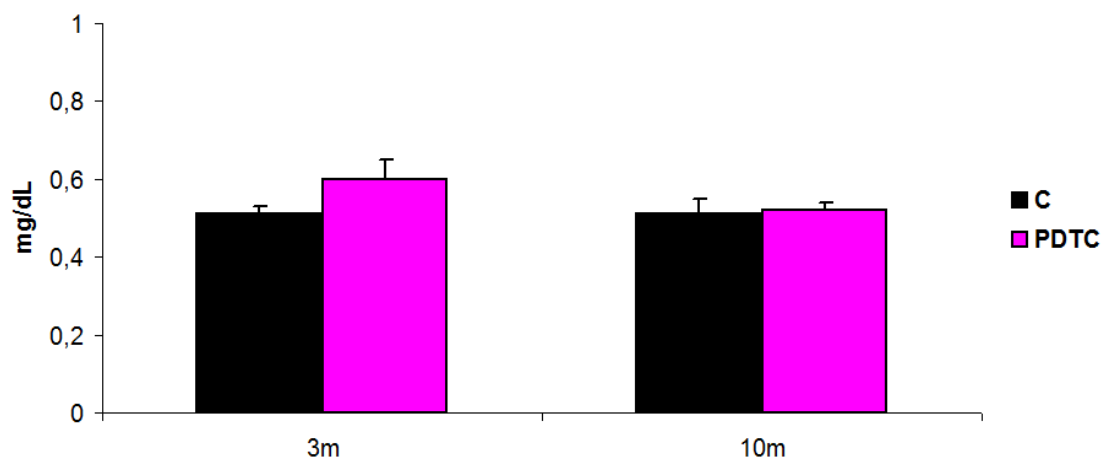


Figura 10. Gráfico referente à concentração sérica de creatinina (mg/dL) dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação).

ATIVIDADE PLASMÁTICA DE RENINA

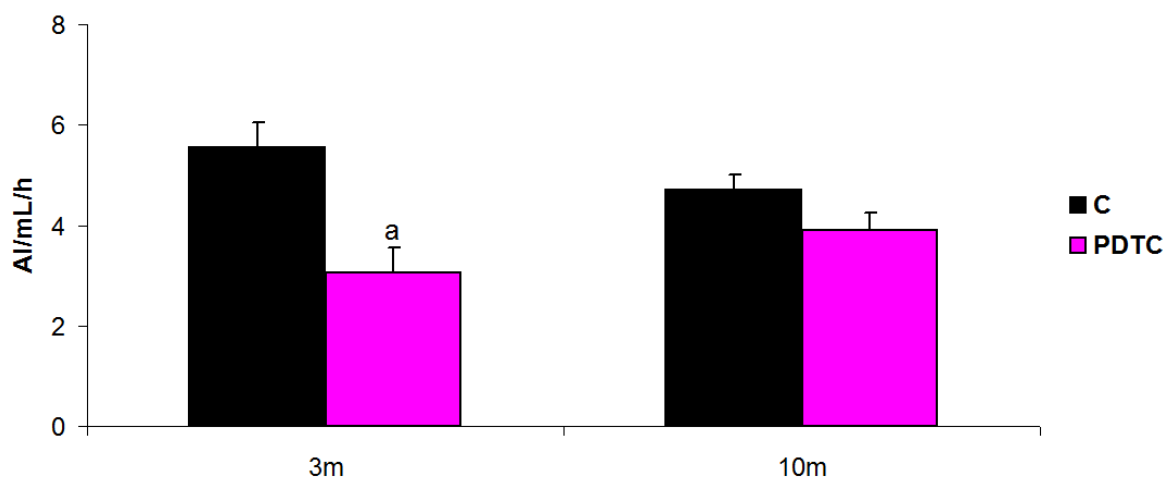


Figura 11. Atividade plasmática de renina (AI/mL/h) dos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação) ao longo do estudo. ^ap<0,05 vs. C.

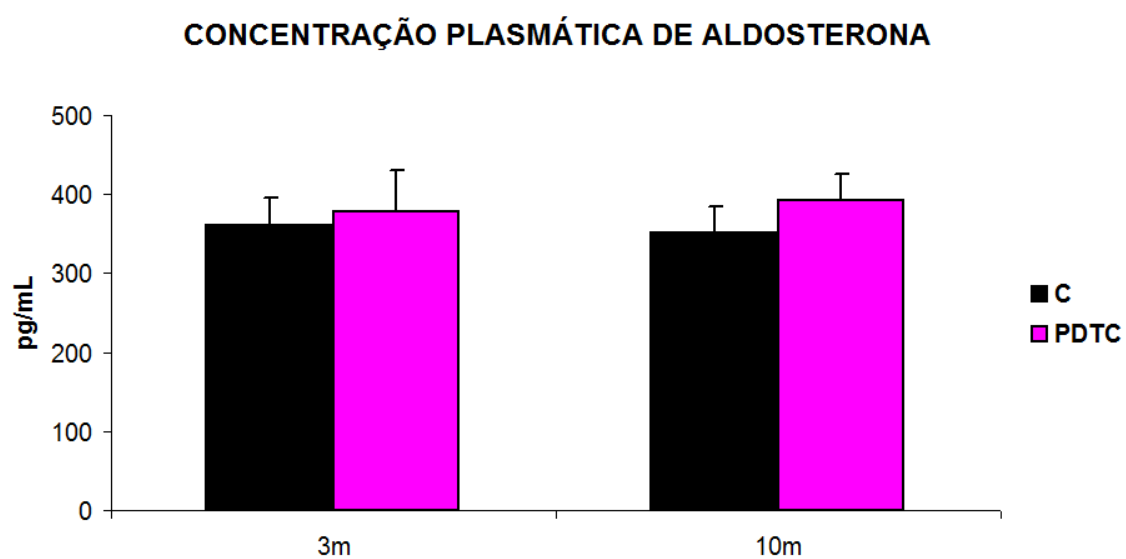


Figura 12. Concentração plasmática de aldosterona (pg/mL) dos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação) ao longo do estudo.

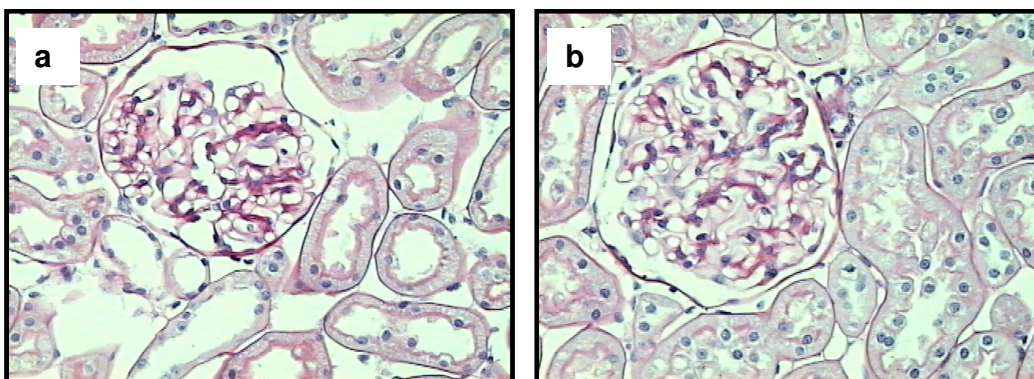


Figura 13. Microfotografias representativas de tecido renal coradas com a técnica de PAS para a detecção de esclerose glomerular em animais com 10 meses de vida. a) Grupo C (controle) (200X); b) Grupo PDTC (receberam PDTC durante a lactação) (200X).

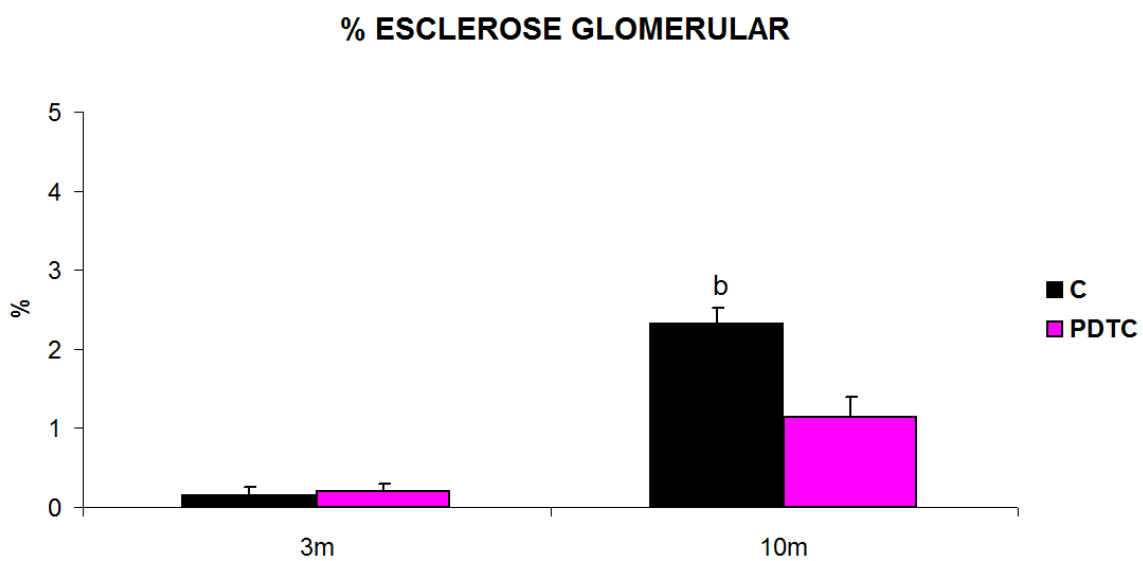


Figura 14. Gráfico referente à percentagem de esclerose glomerular dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação). ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m.

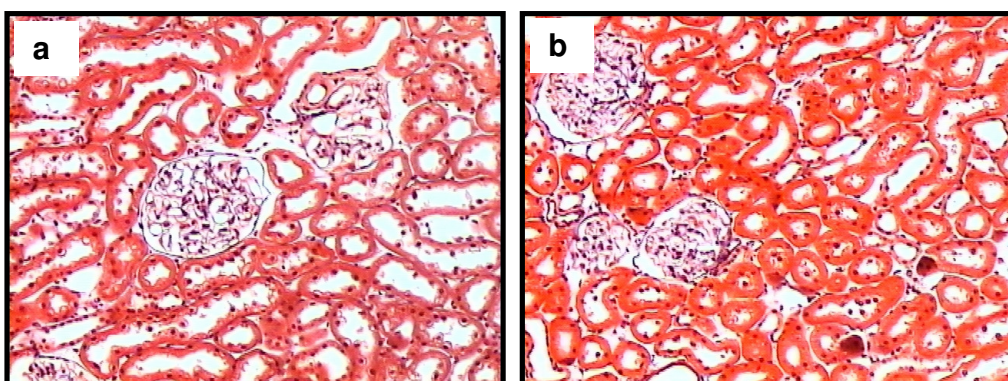


Figura 15. Microfotografias representativas de tecido renal coradas com a técnica de Masson para a detecção de expansão intersticial em animais com 10 meses de vida. a) Grupo C (controle) (100X); b) Grupo PDTC (receberam PDTC durante a lactação) (100X).

% EXPANSÃO INTERSTICIAL

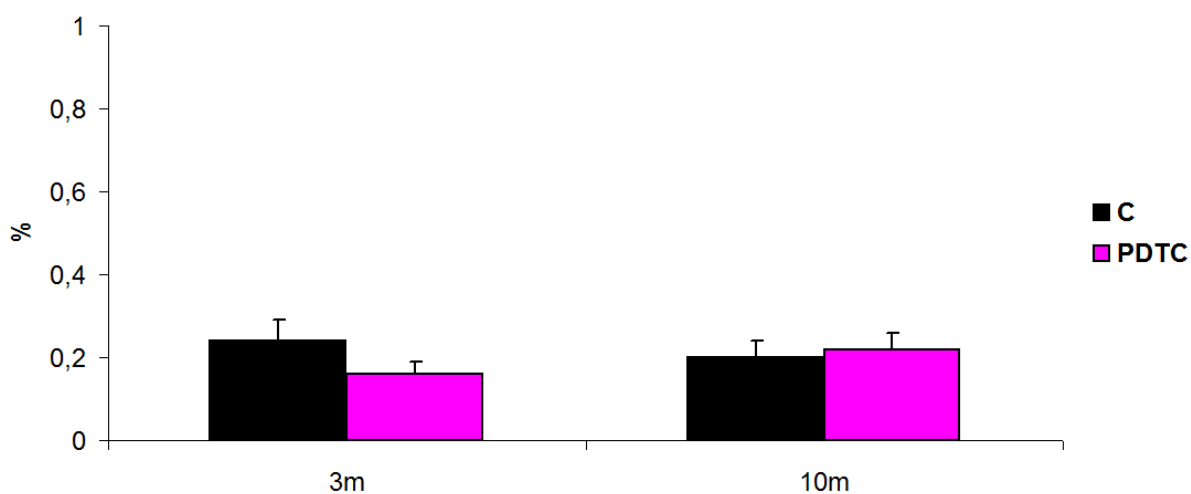


Figura 16. Gráfico referente à porcentagem de expansão intersticial dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação).

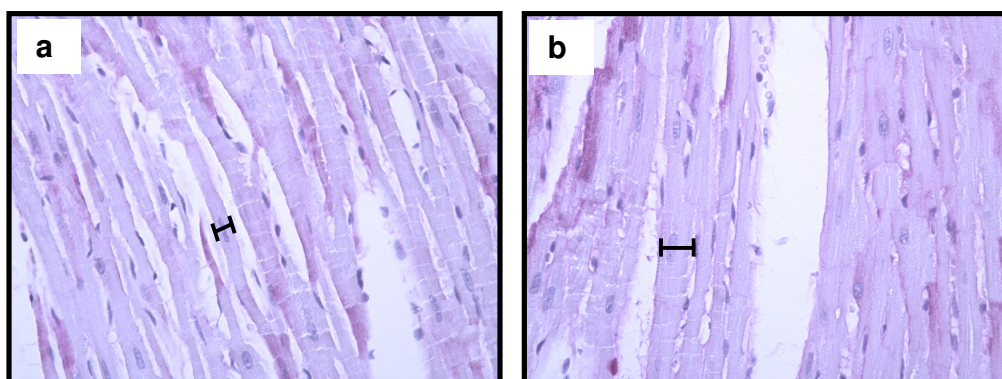


Figura 17. Microfotografias representativas de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) coradas com a técnica de PAS para a mensuração do diâmetro transverso do miócito em animais com 10 meses de vida. a) Grupo C (controle) (400X); b) Grupo PDTC (receberam PDTC durante a lactação) (400X).

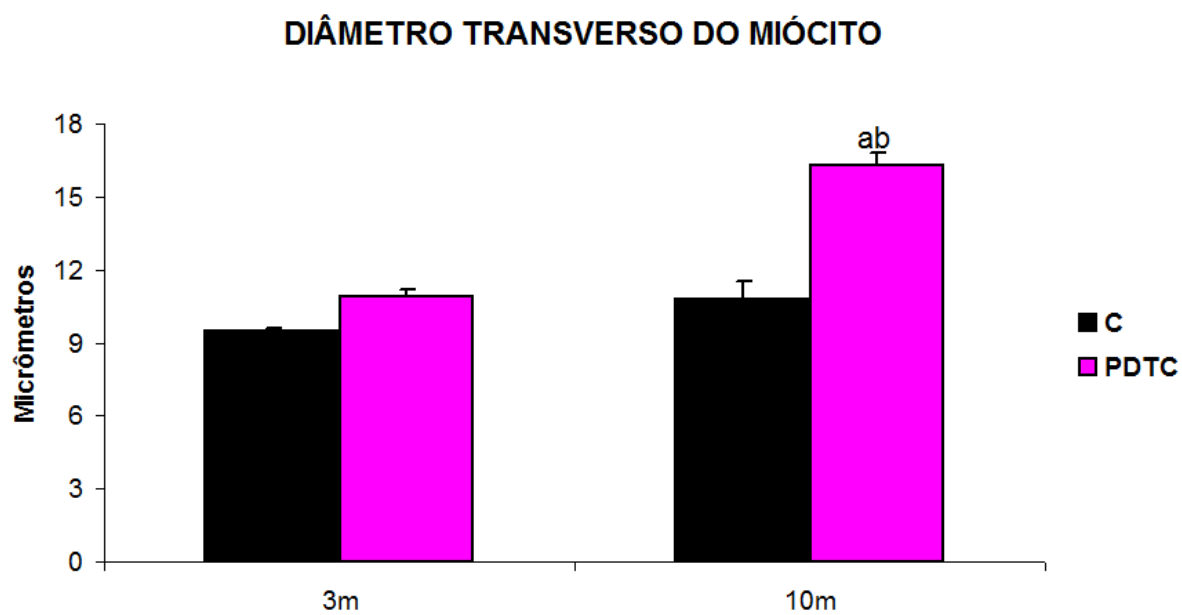


Figura 18. Gráfico referente ao diâmetro transverso do miócito dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação). ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m.

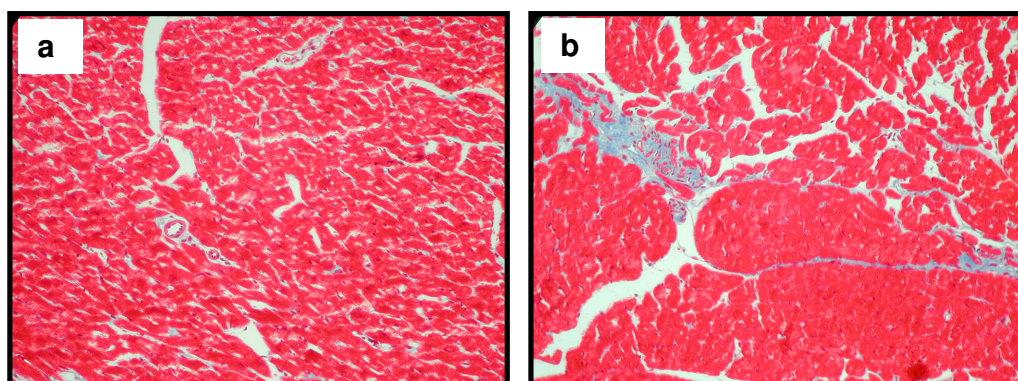


Figura 19. Microfotografias representativas de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) coradas com a técnica de Masson para a detecção de fibrose cardíaca em animais com 10 meses de vida. a) Grupo C (controle) (200X); b) Grupo PDTC (receberam PDTC durante a lactação) (200X).

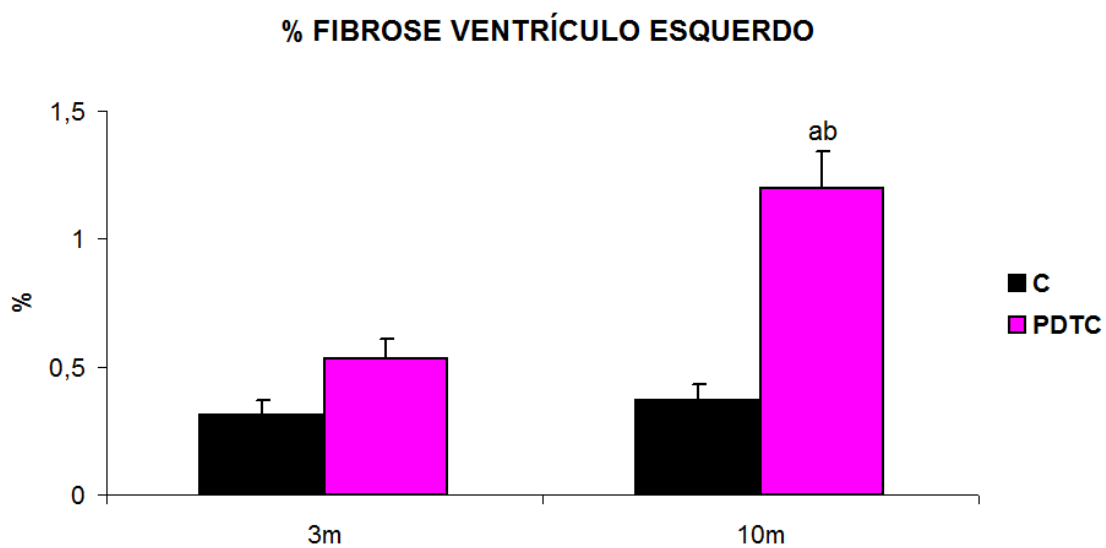


Figura 20. Gráfico referente à porcentagem de fibrose no ventrículo esquerdo dos animais Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação). ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m.

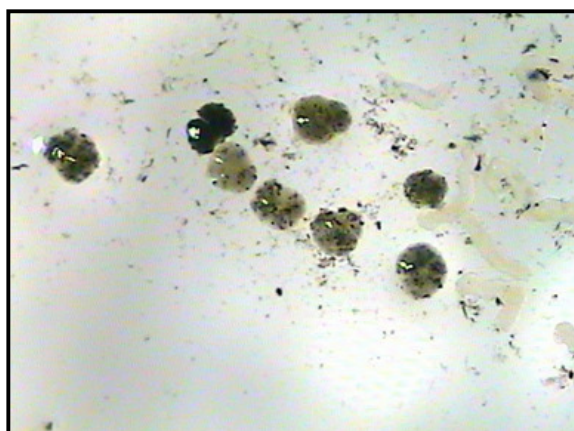


Figura 21. Microfotografia de glomérulos corados com nanquim (40X).

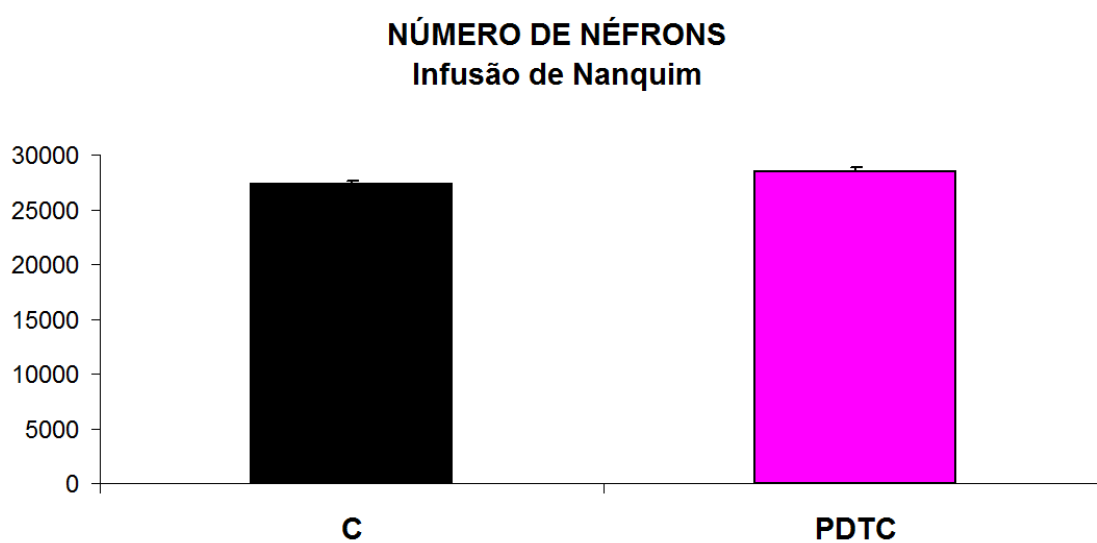


Figura 22. Contagem do número de glomérulos por rim nos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação) aos 3 meses de vida pela técnica de infusão de nanquim.

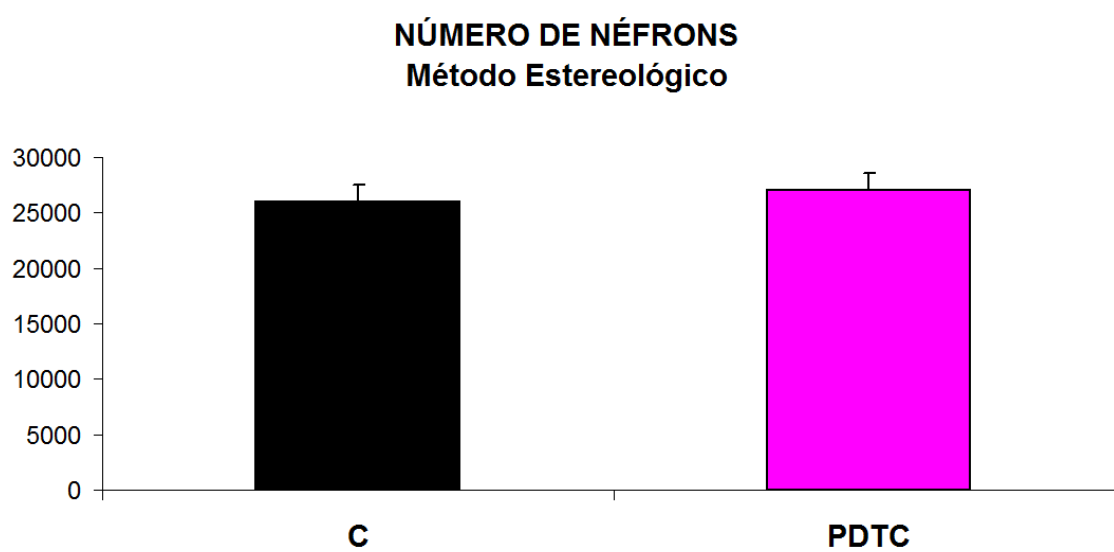


Figura 23. Contagem do número de glomérulos por rim nos Grupos C (controle) e PDTC (receberam PDTC durante a lactação) aos 3 meses de vida pelo método estereológico.

EXPRESSÃO GÊNICA – COMPONENTES SRA

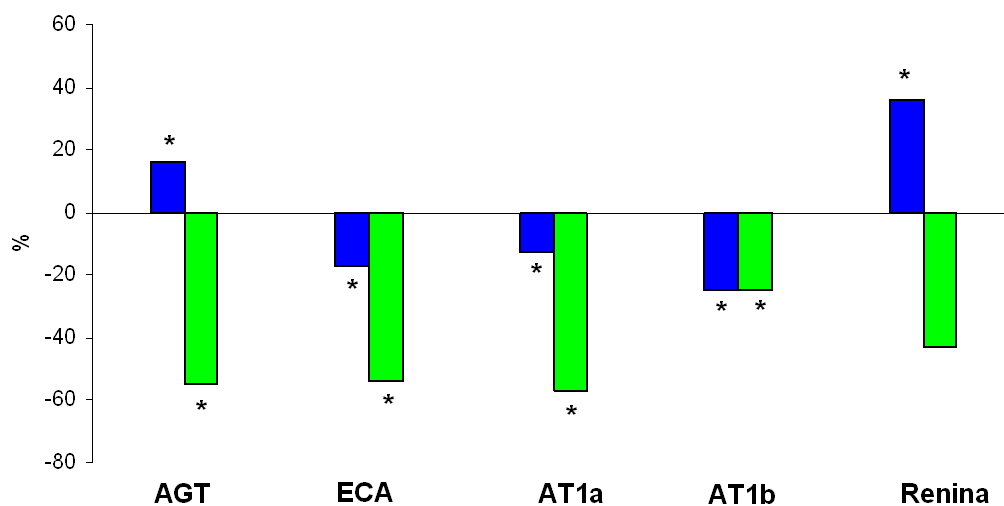


Figura 24. Expressão gênica renal dos componentes do sistema renina-angiotensina realizada pela técnica de PCR em tempo real no Grupo PDTC (receberam PDTC durante a lactação) aos 3 meses de vida (azul) e aos 10 meses de vida (verde) comparados com o respectivo controle. * $p < 0,05$ vs. C.

EXPRESSÃO GÊNICA – TRANSPORTADORES TUBULARES

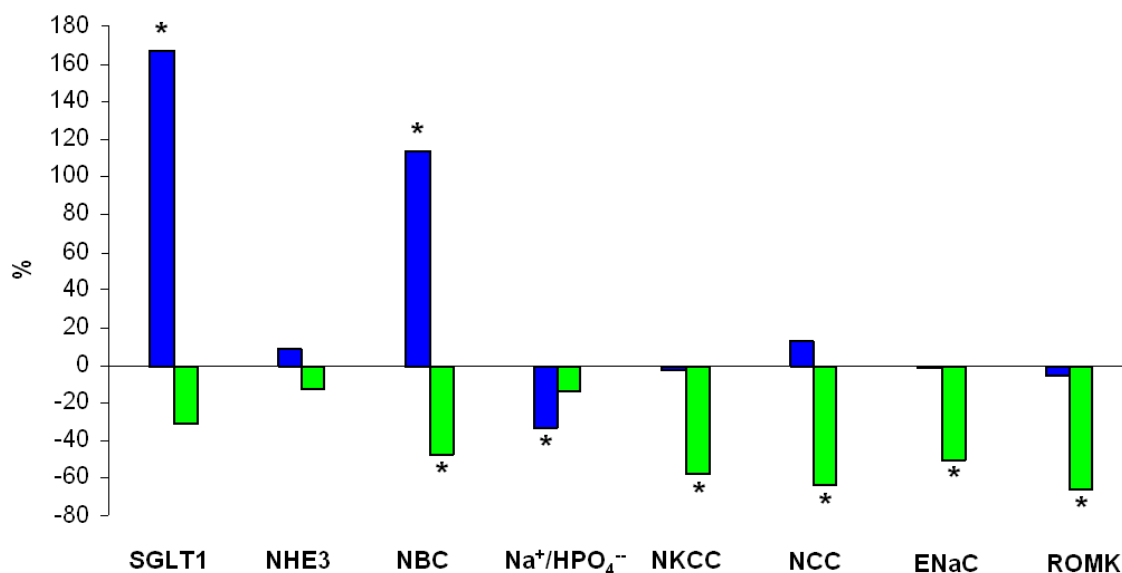


Figura 25. Expressão gênica renal dos transportadores tubulares realizada pela técnica de PCR em tempo real no Grupo PDTC (receberam PDTC durante a lactação) aos 3 meses de vida (azul) e aos 10 meses de vida (verde) comparados com o respectivo controle. * $p < 0,05$ vs. C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zatz R, Romao JE, Jr. End-stage renal failure and national resources: the Brazilian experience. *Renal failure*. 2006;28(8):627-9.
- [2] Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1986 Jun;77(6):1993-2000.
- [3] Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int*. 1998 Nov;54(5):1510-9.
- [4] Fujihara CK, Malheiros DM, Donato JL, Poli A, De Nucci G, Zatz R. Nitroflurbiprofen, a new nonsteroidal anti-inflammatory, ameliorates structural injury in the remnant kidney. *The American journal of physiology*. 1998 Mar;274(3 Pt 2):F573-9.
- [5] Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int*. 1996 Mar;49(3):666-78.

- [6] Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Yang WC, Mu W, et al. Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 1998 Aug;13(8):1967-74.
- [7] Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, et al. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *American journal of physiology*. 2004 May;286(5):F945-54.
- [8] Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, et al. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 2):193-201.
- [9] Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Dec;104(12):1693-701.
- [10] Esteban V, Ruperez M, Vita JR, Lopez ES, Mezzano S, Plaza JJ, et al. Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney international*. 2003 Oct(86):S33-8.

- [11] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circulation research*. 2000 Jun 23;86(12):1266-72.
- [12] Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, et al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Jan;21(1):16-20.
- [13] Lafayette RA, Mayer G, Park SK, Meyer TW. Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *The Journal of clinical investigation*. 1992 Sep;90(3):766-71.
- [14] Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *The New England journal of medicine*. 1993 Nov 11;329(20):1456-62.
- [15] Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *The New England journal of medicine*. 1996 Apr 11;334(15):939-45.

- [16] Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzarbeitia F, Egido J. Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension*. 2001 Apr;37(4):1171-8.
- [17] Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Oct;19(10):2505-12.
- [18] Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol*. 1998 Jul 1;161(1):430-9.
- [19] Stylianou E, Nie M, Ueda A, Zhao L. c-Rel and p65 trans-activate the monocyte chemoattractant protein-1 gene in interleukin-1 stimulated mesangial cells. *Kidney Int*. 1999 Sep;56(3):873-82.
- [20] Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *The American journal of pathology*. 2001 Aug;159(2):387-97.

[21] Yozai K, Shikata K, Sasaki M, Tone A, Ohga S, Usui H, et al. Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Nov;16(11):3326-38.

[22] Mudge SJ, Paizis K, Auwardt RB, Thomas RJ, Power DA. Activation of nuclear factor-kappa B by podocytes in the autologous phase of passive Heymann nephritis. *Kidney Int*. 2001 Mar;59(3):923-31.

[23] Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M, et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int*. 1998 Jun;53(6):1608-15.

[24] Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry*. 1999 Jan;45(1):7-17.

[25] Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Malheiros DM, Vieira JM, Jr., Zatz R. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *American journal of physiology*. 2007 Jan;292(1):F92-9.

[26] Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P. The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta physiologica Scandinavica*. 2004 Aug;181(4):529-35.

- [27] Hilgers KF, Norwood VF, Gomez RA. Angiotensin's role in renal development. *Seminars in nephrology*. 1997 Sep;17(5):492-501.
- [28] Matsusaka T, Miyazaki Y, Ichikawa I. The renin angiotensin system and kidney development. *Annual review of physiology*. 2002;64:551-61.
- [29] Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *The American journal of physiology*. 1995 Jul;269(1 Pt 2):F110-5.
- [30] Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, Bobik A, Nilsson H, Wickman A, et al. Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int*. 1994 Feb;45(2):485-92.
- [31] Guron G, Adams MA, Sundelin B, Friberg P. Neonatal angiotensin-converting enzyme inhibition in the rat induces persistent abnormalities in renal function and histology. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 1):91-7.
- [32] Woods LL, Rasch R. Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *The American journal of physiology*. 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1593-9.

[33] Machado FG, Poppi EP, Fanelli C, Malheiros DM, Zatz R, Fujihara CK. AT1 blockade during lactation as a model of chronic nephropathy: mechanisms of renal injury. *American journal of physiology*. 2008 Jun;294(6):F1345-53.

[34] Bushdid PB, Brantley DM, Yull FE, Blaeuer GL, Hoffman LH, Niswander L, et al. Inhibition of NF-kappaB activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):615-8.

[35] Kanegae Y, Tavares AT, Izpisua Belmonte JC, Verma IM. Role of Rel/NF-kappaB transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):611-4.

[36] Damadian RV, Shwayri E, Bricker NS. On the Existence of Non-Urine Forming Nephrons in the Diseased Kidney of the Dog. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1965 Jan;65:26-39.

[37] 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. *The Journal of physiology*. 2005 May 15;565(Pt 1):137-47.

[38] Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of microscopy*. 1984 May;134(Pt 2):127-36.

- [39] Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965 Sep;2(3):235-54.
- [40] Jepsen FL, Mortensen PB. Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function. A quantitative study. *Virchows Archiv*. 1979 Aug 23;383(3):265-70.
- [41] Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 1994 Apr;8(2):175-80.
- [42] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- [43] Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney international*. 2005 Aug(97):S68-77.
- [44] Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension*. 2006 Mar;47(3):502-8.

- [45] Gomez RA. Role of angiotensin in renal vascular development. *Kidney international*. 1998 Sep;67:S12-6.
- [46] Guron G, Friberg P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *Journal of hypertension*. 2000 Feb;18(2):123-37.
- [47] Hernandez-Gutierrez S, Garcia-Pelaez I, Zentella-Dehesa A, Ramos-Kuri M, Hernandez-Franco P, Hernandez-Sanchez F, et al. NF-kappaB signaling blockade by Bay 11-7085 during early cardiac morphogenesis induces alterations of the outflow tract in chicken heart. *Apoptosis*. 2006 Jul;11(7):1101-9.
- [48] Guyton AC. Physiologic regulation of arterial pressure. *The American journal of cardiology*. 1961 Sep;8:401-7.
- [49] Guyton AC. Renal function curve--a key to understanding the pathogenesis of hypertension. *Hypertension*. 1987 Jul;10(1):1-6.
- [50] Guyton AC. Kidneys and fluids in pressure regulation. Small volume but large pressure changes. *Hypertension*. 1992 Jan;19(1 Suppl):12-8.
- [51] Crowley SD, Coffman TM. In hypertension, the kidney rules. *Current hypertension reports*. 2007 Apr;9(2):148-53.

- [52] Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *American journal of hypertension*. 1988 Oct;1(4 Pt 1):335-47.
- [53] Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *The New England journal of medicine*. 2003 Jan 9;348(2):101-8.
- [54] Guron G, Nilsson A, Leyssac PP, Sundelin B, Friberg P. Proximal tubular function in adult rats treated neonatally with enalapril. *Acta physiologica Scandinavica*. 1998 Sep;164(1):99-106.
- [55] Ortiz LA, Quan A, Zarzar F, Weinberg A, Baum M. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension*. 2003 Feb;41(2):328-34.
- [56] Ingelfinger JR. Pathogenesis of perinatal programming. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004 Jul;13(4):459-64.
- [57] Manning J, Beutler K, Knepper MA, Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *American journal of physiology*. 2002 Jul;283(1):F202-6.

[58] Kelly MP, Quinn PA, Davies JE, Ng LL. Activity and expression of Na(+)-H+ exchanger isoforms 1 and 3 in kidney proximal tubules of hypertensive rats. *Circulation research*. 1997 Jun;80(6):853-60.

[59] Kim SW, Wang W, Kwon TH, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Increased expression of ENaC subunits and increased apical targeting of AQP2 in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *American journal of physiology*. 2005 Nov;289(5):F957-68.

[60] Sonalker PA, Tofovic SP, Jackson EK. Increased expression of the sodium transporter BSC-1 in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2004 Dec;311(3):1052-61.

[61] Ikari A, Tachihara Y, Kawano K, Suketa Y. Differential regulation of Na(+),K(+)-ATPase and the Na(+)-coupled glucose transporter in hypertensive rat kidney. *Biochimica et biophysica acta*. 2001 Feb 9;1510(1-2):118-24.

[62] Hoagland KM, Flasch AK, Dahly-Vernon AJ, dos Santos EA, Knepper MA, Roman RJ. Elevated BSC-1 and ROMK expression in Dahl salt-sensitive rat kidneys. *Hypertension*. 2004 Apr;43(4):860-5.

[63] Capasso G, Rizzo M, Garavaglia ML, Trepiccione F, Zacchia M, Mugione A, et al. Upregulation of apical sodium-chloride cotransporter and basolateral

chloride channels is responsible for the maintenance of salt-sensitive hypertension. *American journal of physiology*. 2008 Aug;295(2):F556-67.

[64] Andersen K. Renin-angiotensin-aldosterone system in the elderly: rational use of aliskiren in managing hypertension. *Clinical interventions in aging*. 2009;4(1):137-51.

[65] Rosenfeld JB, Zabudowski J. The renin-angiotensin system, the kidney, and hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1989;13 Suppl 3:S22-6.

[66] Bakris GL, Fonseca VA, Sharma K, Wright EM. Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int*. 2009 Jun;75(12):1272-7.

[67] Alexander RT, Malevanets A, Durkan AM, Kocinsky HS, Aronson PS, Orłowski J, et al. Membrane curvature alters the activation kinetics of the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Mar 9;282(10):7376-84.

[68] Donowitz M, Li X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiological reviews*. 2007 Jul;87(3):825-72.

[69] Yang LE, Sandberg MB, Can AD, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA. Effects of dietary salt on renal Na⁺ transporter subcellular distribution, abundance, and phosphorylation status. *American journal of physiology*. 2008 Oct;295(4):F1003-16.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)