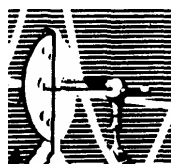


RICARDO LUIZ LUZARDO FILHO

CONSEQUÊNCIAS DA PROGRAMAÇÃO METABÓLICA
SOBRE OS TRANSPORTADORES RENAIIS DE Na⁺ EM
RATOS: MECANISMOS MOLECULARES E
REGULATÓRIOS ENVOLVIDOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFISICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

UFRJ

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

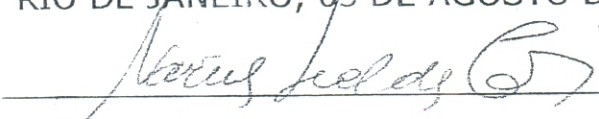
"Consequências da programação metabólica sobre os transportadores renais de Na^+ : Mecanismos celulares e regulatórios envolvidos."

RICARDO LUIZ LUZARDO FILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 03 DE AGOSTO DE 2009.



PROF^a. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BIOFÍSICA)



PROF. ADALBERTO RAMON VIEYRA (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



PROF^a. VÂNIA MARIA CORRÊA DA COSTA (DOUTOR – UFRJ) – REVISORA



PROF^a. ANA DURCE OLIVEIRA DA PAIXÃO (DOUTOR – UFPE)



PROF^a. DENISE PIRES DE CARVALHO (DOUTOR – UFRJ)



PROF^a. PATRÍCIA FRANCA GARDINO (DOUTOR – UFRJ)

CONSEQUÊNCIAS DA PROGRAMAÇÃO METABÓLICA
SOBRE OS TRANSPORTADORES RENAIIS DE Na⁺ EM
RATOS: MECANISMOS MOLECULARES E
REGULATÓRIOS ENVOLVIDOS

Ricardo Luiz Luzardo Filho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Adalberto Vieyra

Rio de Janeiro
Jul/2009

Esta tese foi desenvolvida entre Setembro de 2007 e Julho de 2009 sob a orientação do Prof. Adalberto Vieyra no Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. O trabalho foi financiado com auxílios concedidos pelas seguintes agências de fomento: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Programa Cientistas do Nosso Estado, FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Desenvolvimento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

FICHA CATALOGRÁFICA

Luzardo Filho, Ricardo Luiz

Consequências da programação metabólica sobre os transportadores renais de Na^+ em ratos: mecanismos moleculares e regulatórios envolvidos. Rio de Janeiro, 2009. 192 páginas

Dissertação (Mestrado em Biofísica) –Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientador: Adalberto Vieyra

1. Programação metabólica; 2. Hipertensão arterial; 3. Rim; 4. Na^+ -ATPase; 5. (Na^+ + K^+)ATPase –Teses

I. Vieyra, Adalberto (Orientador).

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

III. Consequências da programação metabólica sobre os transportadores renais de Na^+ : mecanismos moleculares e regulatórios envolvidos.

Agradecimentos

À minha mãe Cristina e seu marido Jorge Luís, minha avó Esmeralda e minha irmã Melissa, que sempre me incentivam e apoiaram.

À minha namorada Carolina pelo apoio incondicional e pela paciência.

Ao meu orientador Adalberto Vieyra, por me aceitar como orientando, pelo incentivo e paciência durante os momentos difíceis.

Aos Professores do laboratório Marcelo Einicker Lamas e Jennifer Lowe (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ).

À Professora Lucienne Lara (Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ).

Às Professoras Maria da Graça Tavares do Carmo e Susana Ortiz Costa (Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ).

Ao Professor Alcino Câmara (Instituto de Economia/UFRJ) pelo acesso a trabalho de sua autoria ainda não publicado (e por isso não citado).

A todos os amigos do laboratório.

“Consequências da programação metabólica sobre os transportadores renais de Na⁺ em ratos: mecanismos moleculares e regulatórios envolvidos”.

Autor: Ricardo Luiz Luzardo Filho

Orientador: Adalberto Vieyra

Resumo

Na última década diversos trabalhos correlacionaram desnutrição pré-natal e perinatal com o aparecimento de doenças na vida adulta, formulando a hipótese da programação metabólica. Este conceito estabelece que fatores não genéticos poderiam agir nas fases iniciais de desenvolvimento para permanentemente influenciar diferentes sistemas fisiológicos na vida adulta, incluindo os sistemas cardiovascular e renal. Entretanto não existem informações sobre alterações moleculares e regulatórias dos transportadores renais de Na⁺ que participariam na etiopatogenia de doenças cardiovasculares e renais, decorrentes da programação. Nesta dissertação, ratas mães wistar receberam durante o período de lactação uma ração hipoproteica contendo 8% de proteína. Após a lactação, as proles das mães controle e desnutridas, denominadas controle e programados, respectivamente, consumiram uma ração normoproteica contendo 20% de proteína até o sacrifício (60 dias de vida). A investigação da atividade das ATPases transportadoras de Na⁺ em túbulos proximais renais (em nmol Pi×mg⁻¹×min⁻¹) revelou um acentuado aumento na atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica (de 200±41,0 para 418±31,4; P<0,05) nos animais programados. Estes animais apresentaram um aumento na afinidade aparente para K⁺ (K_{0,5}⁺<2 mM) em relação ao controle (K_{0,5}⁺≈5 mM) sem mudanças na afinidade aparente para Na⁺ (Na_{0,5}⁺≈35 mM para ambos os grupos). A imunodeteccção da subunidade α1 da (Na⁺+K⁺)ATPase na membrana basolateral mostrou um aumento ≈40% nos animais programados (P<0,05). A Na⁺-ATPase também apresentou um acentuado aumento (de 80,3±2,1 para 168,0±16,8; P<0,05) e, a diferença do controle, mostrou-se insensível a angiotensina II (0-10⁻¹⁴-10⁻¹²-10⁻⁶ M). A imunodeteccção dos receptores de angiotensina II mostrou aumento na expressão dos receptores AT₁ (≈40%) e diminuição na expressão dos receptores AT₂ (≈40%) nas membranas das células renais dos ratos programados (P<0,05). Além disso, os ratos programados apresentaram uma diminuição na expressão da proteína Gα associada a receptores AT₁ (n=2). A expressão de diferentes isoformas de proteína cinase C (PKC) mostrou uma significativa diminuição de PKCα (24%), PKCε (13%) e PKCλ (16%), sem diferença na isoforma ζ. A atividade (pmol P-esterificado por mg de histona em 1 min) das PKCs sensíveis a calfofostina foi menor nos ratos programados (0,3±0,1 vs 2,0±0,3). A expressão da PKA diminuiu significativamente (16%) nos ratos programados e também a sua atividade (de 2,0±2,5 para 1,0±1,5; n=2). Os aumentos observados na expressão e atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica e na atividade Na⁺-ATPásica nos ratos programados, culminaria com uma maior reabsorção proximal Na⁺, levando a uma expansão do líquido extracelular com conseqüente aumento da pressão arterial. Não houve diferença significativa dos ratos programados em relação aos controles na pressão arterial (mmHg) sistólica (133,0±3,7 vs 129,0±6,0), diastólica (106±4,0 vs 98,0±6,0) e média (115,0±4,0 vs 107,0±6,0; programado e controle, nos três casos). Contudo, apesar de não apresentarem alteração na pressão arterial, se observa, aos 60 dias de vida, um aumento estatisticamente significativo da frequência cardíaca dos ratos programados (de 378±10 para 422±9 batimentos por min). Estes resultados permitem concluir que,

apesar dos ratos programados não apresentarem hipertensão arterial aos 60 dias de vida, as alterações nos transportadores renais de Na^+ e o aumento da frequência cardíaca constituiriam – pelo menos em parte – alterações precoces que culminariam na gênese de quadros hipertensivos na vida adulta.

Palavras chave: programação metabólica, hipertensão arterial, rim, Na^+ -ATPase, $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$.

"The consequences of metabolic programming on the renal Na⁺ transporters in rats: molecular and regulatory mechanisms involved."

Author: Ricardo Luiz Luzardo Filho

Supervisor: Adalberto Vieyra

Abstract

In the last decade many studies correlated prenatal and perinatal undernutrition with the emergence of diseases in adulthood, giving raise to the metabolic programming hypothesis. This concept states that non-genetic factors could act in the early stages of development to permanently affect different physiological systems in adulthood, including cardiovascular and renal systems. However there is no information concerning molecular and regulatory changes in renal Na⁺ transporters that could be involved in the physiopathogenesis of cardiovascular and renal diseases as a result of programming. In this work, dams received a hypoproteic a diet containing 8% protein during the lactation period. After lactation, the offsprings of control and malnourished dams, called control and programmed, respectively, consumed a diet containing 20% protein until sacrifice (60 days of life). The investigation of the activity of Na⁺-transporting ATPases in renal proximal tubules (in nmol Pi×mg⁻¹×min⁻¹) showed a marked increase in (Na⁺+K⁺)ATPase activity (200±41.0 to 418±31.4; P<0.05) in programmed animals. These animals showed an increase in the apparent affinity for K⁺ (K⁺_{0.5}<2 mM) compared to control (K⁺_{0.5}≈5 mM) without changes in the apparent affinity for Na⁺ (Na⁺_{0.5}≈35 mM in both groups). The immunodetection of the α1 subunit of (Na⁺+K⁺)ATPase in basolateral membranes increased by 40% in programmed animals (P<0.05). The Na⁺-ATPase activity also showed a marked increase (from 80.3±2.1 to 168.0±16.8; P<0.05) and, different from the control, it was insensitive to angiotensin II (0-10⁻¹⁴-10⁻¹²-10⁻⁶ M). The immunodetection of angiotensin II receptors showed an increased expression of AT₁ (≈40%) and reduction (≈40%) in the expression of AT₂ receptors in membranes of kidney cells from programmed rats (P<0.05). Furthermore, the programmed rats showed a decrease in the expression of the protein Gqα protein associated with AT₁ receptor (n=2). The expression of different isoforms of protein kinase C (PKC) showed a significant decrease of PKCα (24%), PKCε (13%) and PKCλ (16%) without difference in isoform ζ. The activity (pmol P-esterified per mg of histone in 1 min for all studied kinases) of the calphostin-sensitive PKCs was lower in programmed rats (0.3±0.1 vs 2.0±0.3). The expression of PKA decreased significantly (16%) as well as its activity (from 2.0 ± 2.5 to 1.0 ± 1.5; n=2). The augmented expression and activity of (Na⁺+K⁺)ATPase and in the activity of Na⁺-ATPase in programmed rats could culminate with an increase in proximal Na⁺ reabsorption thus leading to an expansion of extracellular fluid and increased blood pressure. There was no significant difference in systolic (133.0±3.7 vs 129.0±6.0), diastolic (106.0±4.0 vs 98±6.0) and mean (115.0±4.0 vs 107.0±6.0) blood pressure

(mmHg; programmed *vs* control in all cases). However, despite the unchanged blood pressure is observed at 60 days, a statistically significant increase in the heart rate of programmed rats was found (from 378 ± 10.3 to 422 ± 9.0 beats per min). These results support the view that alterations in renal Na^+ transporters and the increased heart rate would be - at least in part - early changes that might culminate in the genesis of hypertension in adulthood.

Keywords: metabolic programming, hypertension, kidney, $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$, Na^+ -ATPase

Abreviaturas

aa: Aminoácido

ADP: adenosina difosfato

Ang I: angiotensina I

Ang II: angiotensina II

Ang III: angiotensina III

Ang-(1-7): angiotensina-(1-7)

ATP: adenosina trifosfato

[γ -³²P]ATP: adenosina trifosfato marcado com ³²P na fosforila γ -terminal

Bis-Tris Propano: 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino]propano

cGMP: monofosfato cíclico de guanosina

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

DAG: diacilglicerol

DNA: ácido desoxiribonucleico (abreviação usual na língua inglesa)

DTT: ditioneitol

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECA2: enzima conversora do tipo 2 de angiotensina

EDTA: ácido etileno diamino tetra acético

HEPES: N-[2-hidroxi etil] piperazina-N'-[2-ácido etano sulfônico]

IP₃: inositol trifosfato

kDa: quilodalton

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro (abreviação usual na língua inglesa)

OMS: Organização Mundial da Saúde

ON: óxido nítrico

ONS: óxido nítrico sintetase

ONU: Organização das Nações Unidas

Pi: fosfato inorgânico

PIP₂: fosfatidil inositol-bis-fosfato

PKA: proteína cinase A

PKC: proteína cinase C

PKG: proteína cinase G

PLC: fosfolipase C

PTN: proteína

SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona

TRIS: tris[hidroxi metil]amino metano

WHO: Organização Mundial de Saúde (abreviação usual na língua inglesa)

11 β -HD2: 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações iniciais	1
1.2. <i>Status</i> nutricional como forma de programação metabólica.....	7
1.3. Importância dos rins na homeostasia dos compartimentos líquidos em mamíferos...16	
1.3.1. Mecanismos celulares de reabsorção no túbulo proximal.....	20
1.3.2. Mecanismos de reabsorção renal de sódio.....	24
1.3.3. (Na ⁺ +K ⁺)ATPase	25
1.3.4. Na ⁺ -ATPase.....	32
1.3.5 Regulação da (Na ⁺ +K ⁺)ATPase e da Na ⁺ -ATPase por Ang II em túbulos proximais e vias de sinalização celular acopladas.....	36
1.4. A hipertensão arterial de origem renal como consequência da programação metabólica: diferentes processos e mecanismos.....	42
1.4.1. Redução no número de néfrons.....	43
1.4.2. Apoptose.....	45
1.4.3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)	47
1.4.4. Glicocorticóides.....	50
1.4.5. Manipulação renal de Na ⁺	51
2. OBJETIVOS.....	53
3. METODOLOGIA.....	55
3.1. Reagentes.....	55
3.2. Modelo animal.....	55
3.3. Medida não invasiva da pressão arterial	59

3.4. Obtenção do homogenato total e da fração de membranas basolateral de túbulos proximais.....	59
3.5. Preparação do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	61
3.6. Atividade $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$	62
3.7. Atividade $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ insensível a ouabaína.....	62
3.8. Atividade da proteína cinase C e A.....	63
3.9. SDS-PAGE e imunodeteção.....	64
3.10. Imunoprecipitação.....	64
3.11. Análise estatística.....	66
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÕES.....	114
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
5. ANEXOS.....	141

Índice de Figuras

Figura 1. Fome, pobreza e desnutrição.....	3
Figura 2. Proporção de pessoas desnutridas em 2006.....	4
Figura 3. Proporção de pessoas vivendo com menos de um dólar por dia 2006-2007....	5
Figura 4. Pobreza, pobreza extrema, evolução da renda no Brasil no período de 1995 – 2007.....	8
Figura 5. Proporção de pobres nas diferentes regiões brasileiras.....	10
Figura 6. Janelas de desenvolvimento susceptíveis a programação metabólica.....	12
Figura 7. Segmentos do néfron.....	18
Figura 8. Porcentagem de reabsorção de Na^+ filtrado.....	21
Figura 9. Epitélio de túbulo proximal: diferenças funcionais entre as membranas apical e basolateral.....	23
Figura 10. Topologia de membrana proposta para as subunidades α e β da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase.....	26
Figura 11. Modelo proposto para o transporte dos cátions pela $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase.....	29
Figura 12. Ciclo catalítico da Na^+ -ATPase.....	35
Figura 13. Mecanismo pelo qual a programação metabólica pode levar à hipertensão arterial na vida adulta.....	44
Figura 14. Mecanismo pelo qual a programação metabólica pode levar a redução no número de néfrons com conseqüente hipertensão arterial na vida adulta.....	46
Figura 15. Modelo experimental.....	58
Figura 16. Aparelho para medida não invasiva da pressão arterial Letica LE 5000.....	60
Figura 17. Consumo alimentar das mães controle e desnutridas.....	68
Figura 18. Consumo alimentar dos ratos controle e programados.....	71
Figura 19. Massa corporal dos ratos controle e programados.....	72
Figura 20. Razão do consumo alimentar pela massa corporal dos ratos controle e programados.....	75
Figura 21. Massa renal dos ratos controle e programados.....	78
Figura 22. Índice renal dos ratos controle e programados.....	79

Figura 23. Medida da atividade $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPásica}$ na fração de membrana basolateral de túbulos proximais dos ratos controle e programados.....	81
Figura 24. Ativação da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPásica}$ por concentrações crescentes de Na^+ e afinidade aparente por Na^+	82
Figura 25. Ativação da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPásica}$ por concentrações crescentes de K^+ e afinidade aparente para K^+	83
Figura 26. Medida da atividade $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPásica}$ no homogenato total e na fração de membrana basolateral de túbulos proximais dos ratos controle e programados.....	87
Figura 27. Imunodeteção da subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ na fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados.....	89
Figura 28. Medida da atividade $\text{Na}^+ - \text{ATPásica}$ no homogenato total e na fração de membrana basolateral de túbulos proximais dos ratos controle e programados.....	90
Figura 29. Modulação da atividade $\text{Na}^+ - \text{ATPásica}$ da fração de membranas basolateral de túbulos proximais por Ang II nos ratos controle e programados.....	93
Figura 30. Imunoprecipitação seguida de Western blotting dos receptores AT_1 presente na fração de membrana basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados.....	95
Figura 31. Imunoprecipitação seguida de Western blotting dos receptores AT_2 presentes na fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados.....	96
Figura 32. Imunodeteção da proteína $\text{Gq}\alpha$ em fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados.....	99
Figura 33. Imunodeteção da proteína $\text{Gq}\alpha$ em fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados.....	100
Figura 34. Imunodeteção de heterodímeros AT_1/AT_2 e AT_2/AT_1 em fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados.....	102
Figura 35. Diferentes isoformas da proteína cinase C em túbulos proximais renais.....	105
Figura 36. Atividade da PKC sensível à calfofistina C.....	106
Figura 37. Atividade da PKA sensível à PKAi.....	109
Figura 38. Imunodeteção da PKA em túbulos proximais renais.....	111

Figura 39. Efeito da programação metabólica na pressão arterial de ratos controle e programados.....112

Figura 40. Efeito da programação metabólica na frequência cardíaca dos ratos controle e programados.....113

Índice de tabelas

Tabela 1. Evolução da população pobre do Brasil 2006-2007.....	9
Tabela 2. Caracterização parcial das atividades da Na^+ -ATPase e da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ em córtex de rim de rato.....	33
Tabela 3. Componentes das dietas.....	57
Tabela 4. Parâmetros da trajetória de crescimento (ganho de massa corporal) em ratos controle e programados.....	73
Tabela 5. Parâmetros cinéticos da ativação da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ por Na^+ e K^+ nos grupos controle e programado.....	85

1. Introdução

1.1. Considerações iniciais

Com a entrada da humanidade no século XXI, diante de avanços tecnológicos, de descobertas científicas e de todos os progressos do homem, alguns problemas persistem e atingem segmentos cada vez maiores da população: a pobreza, a fome e a desnutrição. Embora igualmente graves e ainda que compartilhem causas e vítimas, fome, desnutrição e pobreza constituem categorias conceituais e se configuram em condições sociais e econômicas diferentes. Dessa forma, podemos definir as três categorias como:

- Pobreza: Corresponde à condição de não satisfação de necessidades humanas elementares como comida, abrigo, vestuário, educação, assistência à saúde (Monteiro, 2003);
- Desnutrição: Decorre de um aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou, ainda, com alguma frequência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos (Monteiro, 2003);
- Fome: Ocorre quando a alimentação diária, habitual, não propicia ao indivíduo energia suficiente para a manutenção do seu organismo e para o desempenho de suas atividades cotidianas (Monteiro, 2003).

A diferenciação entre fome, desnutrição e pobreza pode ser observada na Figura 1. Um indivíduo pode ser pobre sem ser afetado pelo problema da fome, bastando que sua condição de pobreza se expresse por carências básicas sem ser a alimentação uma delas. A situação inversa, ocorrência de fome na ausência de pobreza normalmente não ocorre. Entretanto, pode ser observada excepcionalmente por tempo limitado em casos de

catástrofes ou guerras. A fome e a desnutrição são tampouco conceitos equivalentes, visto que pode ocorrer desnutrição mesmo quando o consumo calórico é normal ou excessivo (Monteiro, 2003). Apesar da fome, a pobreza e a desnutrição constituírem categorias conceituais diferentes e poderem se manifestar de forma isolada, normalmente estão inter-relacionadas configurando um único e grande problema, onde as principais consequências se manifestam através da desnutrição ou suas sequelas próximas ou tardias. Inclusive, por mais que a pobreza e a fome possam ser extintas, as pessoas submetidas à desnutrição são acometidas com alta frequência por sequelas tanto físicas como mentais, de implantação silenciosa, que podem se manifestar de forma aguda ou crônica, que se traduzem em elevados custos sociais e econômicos (Barker, 1993, 1994, 1997, 2002).

De acordo com o “United Nations World Food Programme's Interactive Hunger Map” o flagelo da pobreza, fome e, conseqüentemente da desnutrição, atinge mais de 800 milhões de pessoas no mundo (Figura 2) (<http://www.wfp.org>). Nesse contexto, como expressão das desigualdades sociais, especialmente nos países em desenvolvimento, a desnutrição leva à morte milhares de pessoas, que se tornam vítimas de um processo de exclusão que as priva do direito de se alimentar. Direito esse, que pode ser definido como pessoas vivendo com menos de um dólar (US\$ 1) por dia (Figura 3) (<http://www.undp.org/mdg>). Esta situação é denominada como sendo de extrema pobreza (Neri & Carvalhaes, 2008).

Por serem mais vulneráveis às deficiências nutricionais, as crianças constituem um grupo indicador preferencial para o estudo da presença de desnutrição em uma população, onde as principais causas constituem o desmame precoce, a insuficiência de alimentos qualitativamente adequados, as carências vitamínicas específicas e a

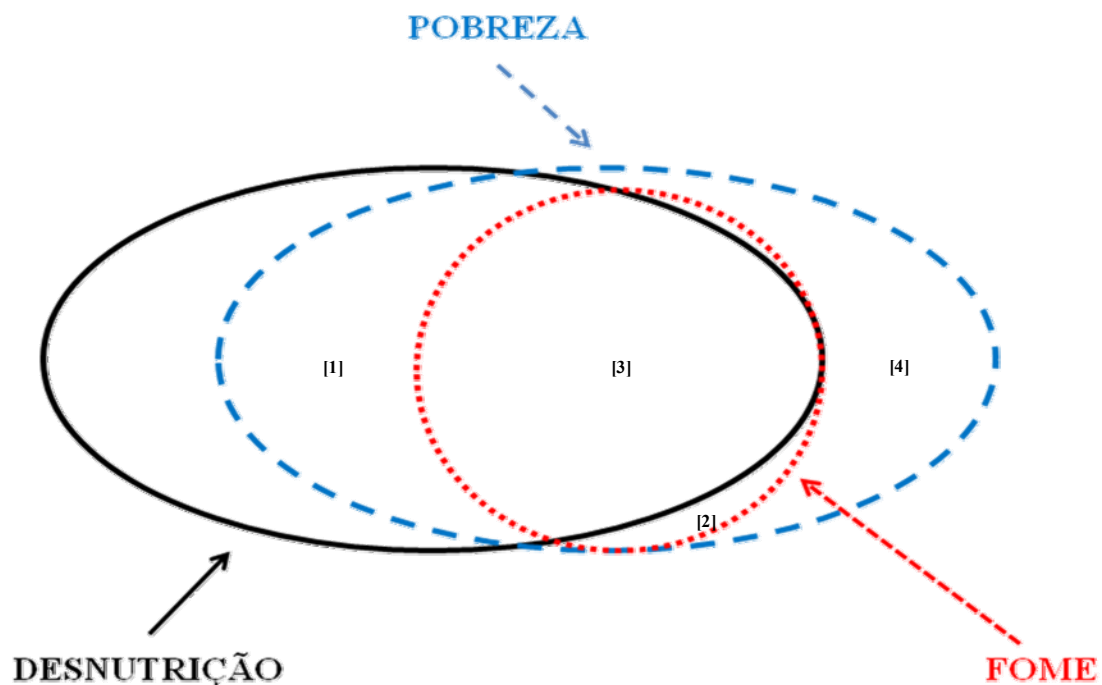


Figura 1. Fome, pobreza e desnutrição. As elipses delimitam, em espaços hipotéticos, situações de pobreza, fome e desnutrição onde são representadas situações em que existe superposição (pobreza e desnutrição [1], pobreza e fome [2] e pobreza, fome e desnutrição [3]) e outras em que esta superposição não existe (exemplo pobreza sem fome e sem desnutrição [4]). Pode ser visto que não ocorre fome na ausência de pobreza, exceto em circunstâncias catastróficas (ver texto). Adaptado de Monteiro *et al.*, 2003.

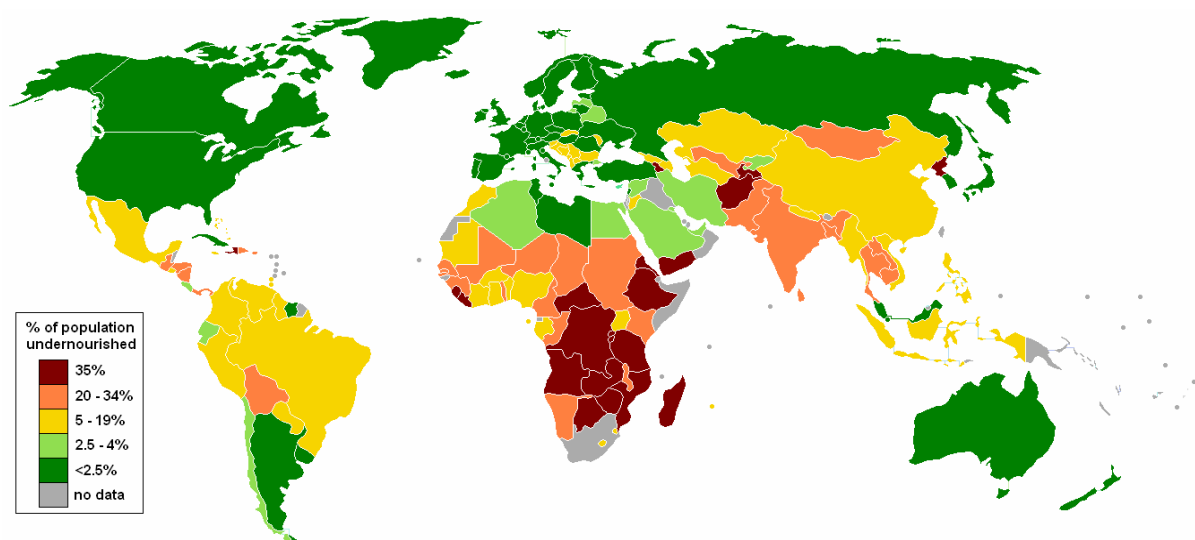


Figura 2. Proporção de pessoas desnutridas em 2006. As diferentes cores indicam a proporção de pessoas subnutridas em relação à população total em 2006. Destacam-se a baixa proporção de desnutrição em países com alto ou considerável desenvolvimento econômico e a acentuada taxa de desnutrição nos países da África subsahariana. Retirado da página <http://www.undp.org>.

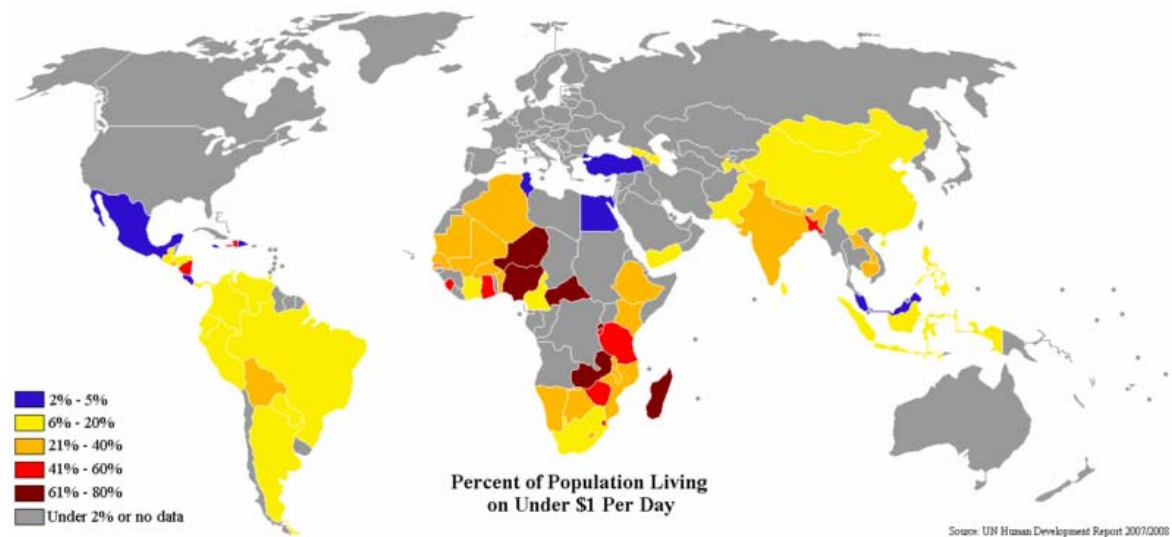


Figura 3. Proporção de pessoas vivendo com menos de um dólar por dia 2006-2007. As diferentes cores indicam a proporção de pessoas que vivem com menos de um dólar por dia em diferentes regiões do mundo em 2006-2007. Retirado da página <http://www.undp.org>.

incidência de doenças (principalmente infecciosas). Atualmente, estima-se que na população mundial mais de 170 milhões de crianças menores de cinco anos sejam desnutridas (www.desnutricao.org.br, 2006), quadro que pode ser caracterizado por dados da “The State of The World’s Children 2007” que demonstra a prevalência de crianças com baixo peso para a sua idade em países em desenvolvimento (<http://www.unicef.org>).

A desnutrição é a segunda causa de morte mais freqüente em crianças menores de 5 anos nos países em desenvolvimento (WHO, 1995). Essas cifras têm se mantido constantes nas últimas décadas e correspondem a um percentual 4 a 6 vezes mais alto que a taxa de 5%, reconhecida como aceitável pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007). O “Estado da Insegurança Alimentar no Mundo 2004”, relatório da Organização das Nações Unidas (ONU), concluiu que morrem de fome, anualmente, pelo menos 5 milhões de crianças no mundo, o que dá uma média de um óbito a cada 5 segundos (Blair, 2004).

O problema da fome e pobreza que enseja as discussões acerca da desnutrição e conseqüentemente da mortalidade infantil, foi especialmente desenhado para enquadrar-se num dos mais importantes documentos já produzidos pelas Nações Unidas: as Metas do Milênio (Declaração do Milênio das Nações Unidas, 2000). A ONU escolheu como primeira meta do milênio a questão ligada à fome, com o lema “Erradicar a pobreza e a fome extrema”, sendo que, em especial, o objetivo desta meta é reduzir pela metade o número de pessoas que sofrem de fome no mundo até 2015 (Tubino, 2007). Contudo, apesar do esforço em algumas partes do planeta, a meta de reduzir a fome em 50% até 2015 não está sendo alcançada (Blair, 2004).

No Brasil embora longe de poder ser comparado com a África, esta realidade não é totalmente diferente, apesar da estratégia impulsionada pelo Governo Federal para

assegurar o direito humano à alimentação (Fome Zero) ter melhorado os índices de fome e o número de pessoas vivendo com menos de US\$ 1 por dia (Figura 4), estima-se que 33 milhões de brasileiros ainda vivam na pobreza (Tabela 1), e 14 milhões sejam desnutridos (<http://www.wfp.org>), sendo as regiões Nordeste e Norte as mais suscetíveis a esse problema quando comparadas as demais regiões brasileiras (Figura 5) (Neri & Carvalhães, 2008). Como mencionado acima, particularmente vulnerável à desnutrição é a infância e, por isso, vários estudos foram realizados nas últimas décadas tendo como principal foco a desnutrição em etapas críticas do desenvolvimento, procurando estabelecer uma correlação entre as condições nutricionais e seus efeitos a longo prazo sobre a saúde. Dessa forma, de particular interesse é a hipótese da programação ou impressão metabólica que associa alterações nutricionais em determinadas janelas de desenvolvimento, com a gênese de doenças de alta prevalência na idade adulta (Barker, 1993; Lucas, 1994).

1.2. *Status* nutricional como forma de programação metabólica

Na década de 90 os temas nutrição e saúde obtiveram uma nova dimensão, através da noção de que eventos ocorridos durante o período fetal e de crescimento pós-natal podem ser considerados críticos para determinar alterações metabólicas permanentes durante a vida adulta. Uma das primeiras descrições deste fenômeno foi realizada por Barker, que demonstrou que a desnutrição durante a gestação não somente aumentaria o risco de morte precoce, mas também a pré-disposição ao desenvolvimento de patologias crônicas como hipertensão, cardiopatias, obesidade e diabetes tipo 2 (Barker, 1993, 1994, 1997, 2002). Estes estudos disponibilizam evidências de que mecanismos biológicos podem existir para “memorizar” os efeitos metabólicos de alterações ocorridas

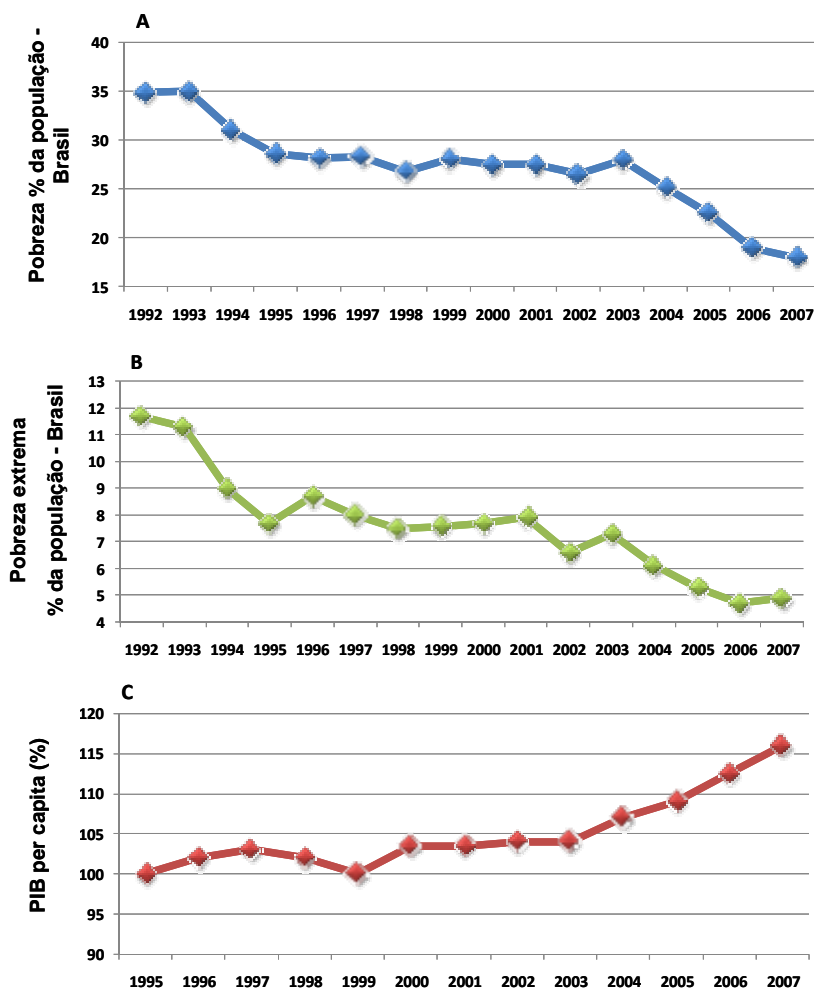


Figura 4. Pobreza, pobreza extrema, evolução da renda no Brasil no período de 1995 – 2007. A figura mostra uma tendência declinante e continua tanto da pobreza (Figura 4A) quanto da pobreza extrema (Figura 4B) nos últimos 15 anos, tendências que se associam a um aumento continuado da renda brasileira (Figura 4C), que ocorreu com considerável redução da desigualdade na sua distribuição. A: porcentagem da população brasileira vivendo abaixo da considerada linha da pobreza (abaixo de R\$ 135,00). B: porcentagem da população brasileira vivendo abaixo da linha da pobreza extrema (abaixo de US\$ 1 por dia). C: Evolução do PIB per capita (Foi estabelecido como 100% a relação entre PIB e população do ano de 1995). Adaptado de Miséria e a Nova Classe Média na Década da Igualdade, novo suplemento com dados regionais da PNAD, CPS/IBRE/FGV, www.fgv.br/cps/desigualdade (Neri & Carvalhães, 2008).

Ano	População Total	Taxa de Pobreza	População Pobre
Brasil 2007	186.029.533	18,11	33.686.228
Brasil 2006	183.305.600	19,32	35.405.477

Tabela 1. Evolução da população pobre do Brasil 2006-2007. Adaptado de Miséria e a Nova Classe Média na Década da Igualdade, novo suplemento com dados regionais da PNAD, CPS/IBRE/FGV, www.fgv.br/cps/desigualdade. Taxa da pobreza: porcentagem da população considerada pobre (Figura 4A). (Neri & Carvalhães, 2008).

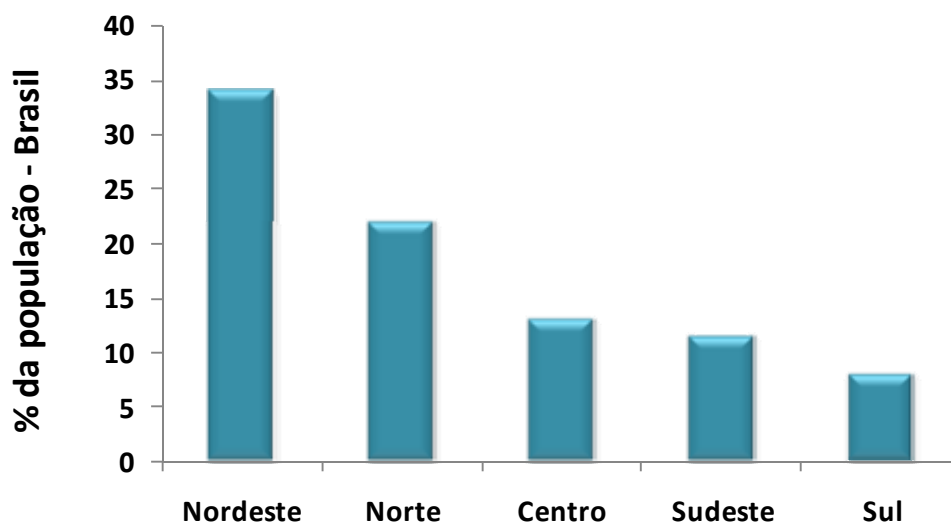


Figura 5. Proporção de pobres nas diferentes regiões brasileiras em 2007. Adaptado de Miséria e a Nova Classe Média na Década da Igualdade, novo suplemento com dados regionais da PNAD, CPS/IBRE/FGV, www.fgv.br/cps/desigualdade. (Neri & Carvalhães, 2008).

no início do desenvolvimento (Waterland & Garza, 1999).

Nesse contexto, durante períodos críticos de desenvolvimento no início da vida, o organismo é capaz de responder à adversidade do ambiente através de adaptações bioquímicas, celulares e moleculares. Estas adaptações causadas por um estímulo nutricional, (por exemplo, desnutrição protéica, objeto de estudo nesta dissertação) podem alterar permanentemente a fisiologia e o metabolismo do organismo e continuar sendo expressas mesmo na ausência do estímulo ou estresse que as causou. Dessa forma, o conceito de que eventos de natureza não genética atuam no início da vida para organizar e influenciar de modo permanente os sistemas fisiológicos é conhecido como “programação” (Lucas, 1998) ou “impressão metabólica” (Waterland & Garza, 1999). Este conceito descreve um processo adaptativo que ocorre em resposta a um insulto nutricional durante um período vulnerável, propondo que o padrão nutricional neste período possa “marcar” o indivíduo, conduzindo a uma programação metabólica que estabelece condições para o surgimento de doenças crônicas na vida adulta. Este período vulnerável descrito acima se refere às fases de desenvolvimento pré e pós-natal, que podem ser denominadas janelas de desenvolvimento (Figura 6).

Diversos trabalhos vêm documentando que insultos nestas janelas de desenvolvimento levam à programação metabólica, e conseqüentemente a doenças na vida adulta. Por exemplo, há cerca de uma década atrás McEvoy e colaboradores demonstraram que o estado nutricional e os níveis hormonais nos períodos de pré-concepção e de pré-implantação afetam o desenvolvimento de oócitos e blastócitos com conseqüências na distribuição de células entre trofoblasto e embrioblasto (McEvoy *et al.*, 2001). Além disso, a desnutrição durante o período de pré-concepção pode diminuir o tempo de gestação, levar a hipertensão e a uma hiperfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na vida adulta (Kumarasamy *et al.*, 2005). Outra notável evidência de

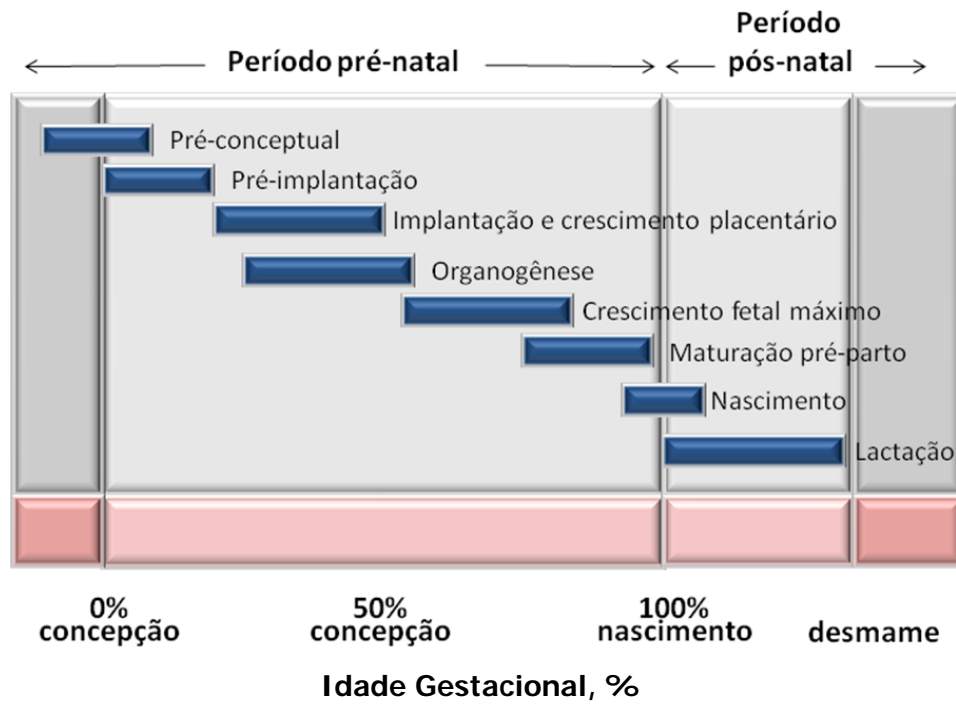


Figura 6. Janelas de desenvolvimento susceptíveis a programação metabólica em ratos. Período pré-natal: na escala de 0 a 100% mostrada na abscissa inferior. Período pós-natal: do nascimento ao desmame. Adaptado de Fowden *et al.*, 2006.

que os períodos pré e pós-natal são importantes para o desenvolvimento da programação metabólica, pode ser observada durante a fase de crescimento fetal máximo que se estende aproximadamente desde a metade da gestação até o pré-parto (Figura 6). Insultos que alteram o suprimento, a captação e a utilização de nutrientes influenciam o crescimento tecidual e podem diminuir o ciclo de proliferação e diferenciação celular, com consequências adversas para o desenvolvimento biológico de ratos (Harding & Johnson, 1995; Fowden *et al.*, 1998, 2006).

Além da influência somática e funcional exercida pelo déficit de nutrientes, podem ocorrer efeitos adaptativos sobre a expressão gênica nas janelas de desenvolvimento (Figura 6), sem mudanças na sequência de nucleotídeos no DNA, conhecidas como modificações epigenéticas. Estas modificações são disparadas por mudanças no meio e podem ocorrer tanto em linhagens celulares somáticas quanto germinativas (Monk, 1995; Thorvaldsen & Bartolomei, 2000). Assim, alterações nutricionais no início da vida podem modificar padrões celulares específicos de metilação do DNA, processo pelo qual o alelo do gene é silenciado, causando alterações na expressão gênica em diversos tipos celulares (Miller & Kersten, 2003). Esses padrões de metilação podem ser mantidos através do ciclo de replicação do DNA pela enzima DNA metiltransferase, permitindo que alterações na expressão gênica possam ser passadas às gerações seguintes (Beach *et al.*, 1982; Langley-Evans *et al.*, 1998).

Por isso, o período e o tempo de exposição a estímulos ou insultos (Figura 6), com destaque para os nutricionais, são particularmente importantes uma vez que, em mamíferos, a maior parte do desenvolvimento com intensa divisão celular e organogênese, ocorre na vida intra-uterina. Contudo, em alguns órgãos este desenvolvimento continua após o nascimento (Nyirenda *et al.*, 2001), demonstrando que não só o período pré-natal, mas também a fase de desenvolvimento pós-natal (lactação)

é determinante na ocorrência de doenças na vida adulta geradas pela programação metabólica. Nesse contexto, podemos citar como exemplo relevante os rins de ratos, onde a nefrogênese inicia-se no 12º dia do desenvolvimento embrionário e só termina entre o 10º e 15º dia após o nascimento (Balbi *et al.*, 2004). No entanto, a maturação completa, entendida como crescimento do órgão associado à hiperplasia e hipertrofia é ainda mais tardia, completando-se em torno das 8 semanas de vida (Eisen, 1976; Solomon, 1977). Nestes últimos momentos, a arquitetura renal de néfrons superficiais e profundos adquire sua conformação definitiva para garantir tanto uma adequada filtração glomerular quanto uma adequada capacidade de concentrar o interstício medular e, em decorrência disto, a urina excretada.

Como mencionado anteriormente, a programação metabólica aumenta o risco de morte precoce e também a pré-disposição ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta. Coletivamente, diversos estudos epidemiológicos em seres humanos e em animais experimentais vêm documentando exemplos da influência da programação metabólica sobre a homeostasia de diversos tecidos e sistemas. Nesses estudos foi demonstrado que a desnutrição protéica moderada ou severa durante a gestação e/ou a lactação levam posteriormente ao excesso de peso (Passos *et al.*, 2000), disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, resistência à ação da leptina na idade adulta (Passos *et al.*, 2002; Passos *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2004), aumento da incidência de doenças coronarianas e aumento da pressão arterial (Tonkiss *et al.*, 1998; Langley-Evans *et al.*, 2001). Alterações compensatórias precoces no remodelamento cardíaco (Fernandez-Twinn *et al.*, 2006), diminuição da massa miocárdica e decréscimo no número de miócitos (Corstius *et al.*, 2005) podem também ser considerados como prelúdio de doenças cardiovasculares no adulto.

Importantes alterações hormonais e metabólicas estão geralmente associadas às alterações renais e cardiovasculares, aumentando a sua gravidade (Fowden *et al.*, 2006). Ratas gestantes alimentadas com uma dieta com restrição protéica geram filhotes com alterações nas ilhotas pancreáticas. Isso inclui uma menor vascularização, capacidade proliferativa de células β alterada e uma alteração no tamanho das ilhotas pancreáticas, fatores que levam a uma diminuição na sensibilidade ao estímulo de secreção de insulina induzida por glicose e conseqüentemente a uma sensibilidade diminuída à insulina no músculo (Berney *et al.*, 1997; Latorraca *et al.*, 1998). Além disso, apresentam uma redução na vascularização do córtex cerebral que permanece durante a vida adulta mesmo com administração de uma dieta normal (Bennis-Taleb *et al.*, 1999), revelando a persistência de uma marca da desnutrição intra-uterina capaz de alterar, por exemplo, o conteúdo tissular de neurotransmissores. Estas modificações poderiam influenciar diversos sistemas hormonais relacionados tanto com a cardioregulação quanto com o metabolismo (Fowden *et al.*, 2006).

Em síntese, a programação metabólica afeta diversos sistemas fisiológicos envolvendo mudanças na estrutura e função de genes, células, tecidos e órgãos levando a um aumento da susceptibilidade do desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta. Entretanto, apesar da considerável literatura existente, não estão claros os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese destas patologias, especialmente sobre aquelas que envolvem o tecido renal. Isto demonstra a necessidade de estudos experimentais que visem à obtenção de informações acerca de mecanismos celulares e moleculares associados ao estabelecimento de diferentes patologias renais observadas na vida adulta, decorrentes de programação metabólica.

1.3. Importância dos rins na homeostasia dos compartimentos líquidos em mamíferos

Os rins são órgãos envolvidos, entre outras funções, na homeostase dos compartimentos líquidos do organismo, mantendo o volume e a composição destes dentro de limites fisiológicos compatíveis com a vida. Os principais mecanismos através dos quais os rins exercem as suas funções são a filtração glomerular e a reabsorção e secreção tubulares, altamente seletivas, de diversas substâncias. Assim, produtos de degradação do metabolismo ou substâncias em excesso podem ser excretados, enquanto substâncias úteis ao organismo são reabsorvidas, sendo assim devolvidas ao sangue. Estes processos ocorrem por meio de transportadores específicos, distribuídos de forma heterogênea nos diferentes segmentos dos néfrons, que transportam uma grande variedade de substratos e são controlados finamente por hormônios, autacóides e outros fatores, como a influência mútua entre as próprias substâncias que são transportadas. Resumidamente podemos dizer que a manutenção da constância do meio interno do organismo é feita pelos rins através da regulação do volume de água dos compartimentos líquidos (meio interno), do controle do balanço eletrolítico, da regulação do equilíbrio ácido-base, da conservação de nutrientes, da modulação do metabolismo ósseo de cálcio e fósforo e da regulação da pressão arterial (Mello-Aires, 1999; Feraille & Doucet, 2001).

O meio interno do organismo humano é constituído de dois compartimentos líquidos: o meio intracelular, delimitado pela membrana plasmática das células e o meio extracelular que compreende interstício, meio intravascular e meio transcelular. Estes compartimentos apresentam diferenças em seus volumes e suas composições, devidos aos mecanismos de transporte iônico presentes nas membranas celulares, que levam então à distribuição assimétrica de determinados íons. Esta assimetria, contudo, não

altera o equilíbrio osmótico e ainda garante as peculiaridades necessárias para que as células realizem as suas funções. Neste sentido, o principal cátion presente no meio extracelular é o Na^+ , enquanto o K^+ aparece como o principal cátion do meio intracelular. Isso se deve, principalmente, à baixa permeabilidade das membranas celulares ao íon Na^+ e à atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ (Seldin & Giesbisch, 1992). A abundância de Na^+ no meio extracelular, e as características de permeabilidade das membranas que limitam este compartimento conferem a este íon uma importância central na determinação do seu volume. Como a regulação da pressão arterial está intimamente associada à do volume extracelular, os rins, que constituem a principal rota pela qual o Na^+ é eliminado do organismo, são os órgãos essenciais para a manutenção a longo prazo da pressão arterial (Mullins *et al.*, 2006).

A unidade morfofuncional dos rins é o néfron e todo rim humano é formado por aproximadamente 1,2 milhões de néfrons. Cada néfron tem entre 20 e 40 mm de comprimento podendo ser distinguidos em dois tipos: néfrons corticais, que possuem alças de Henle curtas que se estendem até a transição entre medula externa e medula interna, e néfrons justamedulares (15% do total de néfrons), com alças longas que se estendem até a ponta da papila renal. Estes últimos têm um papel essencial na produção de urina concentrada e, como mencionado acima, a maturação funcional renal considera-se completa quando isto ocorre (Eisen, 1976; Solomon, 1977). Os néfrons são constituídos pelo corpúsculo renal seguido de um sistema tubular – no qual ocorre o processamento do fluido filtrado – dividido classicamente em quatro principais segmentos: túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (Figura 7), com diferentes subsegmentos que são omitidos por simplicidade. Esta subdivisão dos túbulos é baseada na diferença da estrutura celular, nas características de permeabilidade e na presença de diferentes transportadores na membrana apical e basolateral de suas células.

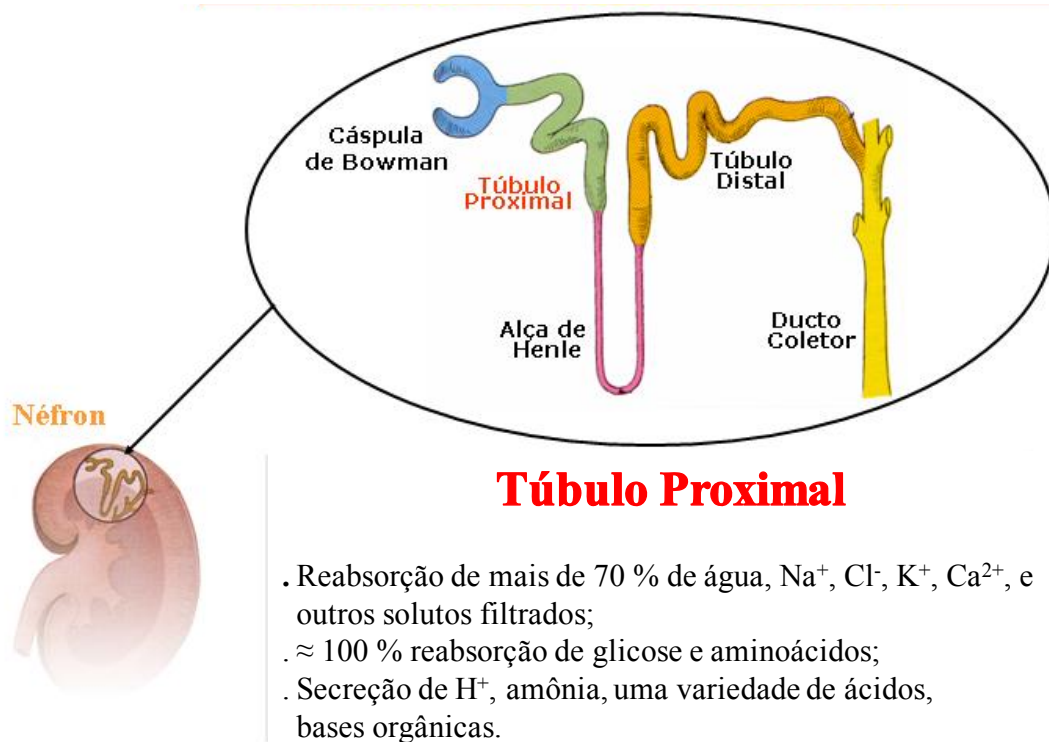


Figura 7. Segmentos do néfron. Esquema do néfron, mostrando a cápsula de Bowman (azul), túbulo proximal (verde), alça de Henle (vermelho), túbulo distal (laranja) e ducto coletor (amarelo). A figura mostra também a magnitude dos processos de transporte no túbulo proximal. Adaptado de Cabral (2006).

Com isso, cada segmento possui uma característica estrutural e funções específicas de transporte de solutos e água (Férraille & Doucet, 2001).

Os rins exibem um fluxo sanguíneo elevado, de tal modo que ambos recebem usualmente 20 a 25% do débito cardíaco, cerca de 1.000 a 1.200 ml de sangue por minuto, embora correspondam a apenas a 0,5% da massa corporal total. Esta taxa de fluxo sanguíneo, cerca de 400 ml/100 g de tecido por minuto, é muito maior do que a observada em outros leitos vasculares tidos como muito bem perfundidos, tais como coração, fígado ou cérebro. Dos 600 ml de plasma que chegam ao rim por minuto somente 120 ml são filtrados nos glomérulos, sendo que 99% desse volume é reabsorvido nos diferentes segmentos do néfron. Assim, dos aproximadamente 180 litros de plasma filtrados por dia, menos de 2 são eliminados na forma de urina (Mello-Aires, 1999; Ferraille & Doucet, 2001).

O primeiro passo na formação da urina é a ultrafiltração do plasma nos glomérulos. O ultrafiltrado glomerular apresenta constituição semelhante ao plasma exceto pela ausência de elementos celulares do sangue e proteínas de alto peso molecular que não conseguem transpor a barreira de filtração dos capilares glomerulares. Como em qualquer outra rede capilar, a taxa de filtração através do capilar glomerular é determinada pelo desequilíbrio entre os gradientes de pressão hidráulica e pressão oncótica – denominadas forças de Starling – como as que são estabelecidas entre os compartimentos vasculares e intratubulares.

Uma grande massa de solutos (incluindo o NaCl) e de água são reabsorvidos enquanto o ultrafiltrado percorre os túbulos renais. Cerca de 1,6 kg de Na⁺ são ultrafiltrados por dia, dos quais, em condições usuais de ingestão de NaCl, somente cerca de 1% é excretado na urina. Nesse processo de reabsorção de Na⁺ são consumidos

em torno de 2 kg de ATP (Schnermann & Sayegh, 1998; Féraillé & Doucet, 2001) o que revela a importância deste processo global de transporte do ponto de vista da economia metabólica corporal. Nesse contexto, os diferentes segmentos do néfron reabsorvem percentuais diferentes Na^+ onde podemos destacar como principal sítio de reabsorção deste íon o túbulo proximal (Figura 8). Por isso, e por ser o segmento objeto de estudo na presente dissertação, será descrito com maiores detalhes no ponto seguinte.

1.3.1. Mecanismos celulares de reabsorção no túbulo proximal

O túbulo proximal é formado por um segmento convoluto próximo ao glomérulo e outro reto na região mais profunda do córtex e mais externa da medula. Este segmento do néfron é responsável pela maior parte da reabsorção do ultrafiltrado. Em condições euvolêmicas o túbulo proximal reabsorve entre 70% e 80% do Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HPO_4^- e da água do filtrado glomerular e virtualmente a totalidade do HCO_3^- , da glicose e dos aminoácidos filtrados (Féraillé & Doucet, 2001). A reabsorção destes solutos pode ocorrer tanto pela via paracelular, como pela via transcelular e, neste último caso, através de mecanismos passivos ou ativos (primários ou secundários).

Esse segmento tubular é revestido por um epitélio cúbico simples e sua membrana apical e basolateral apresentam grandes diferenças em suas morfologias. A membrana luminal ou apical separa o citoplasma da luz tubular e existe uma borda em escova, característica que permite a membrana ter uma maior superfície para a reabsorção de solutos. Na membrana basolateral são encontrados canais e transportadores ativos primários, como por exemplo, a Na^+ -ATPase, a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ e a Ca^{2+} -ATPase (Vieyra, *et al.*, 1986; Vieyra, 1996; Féraillé & Doucet, 2001).

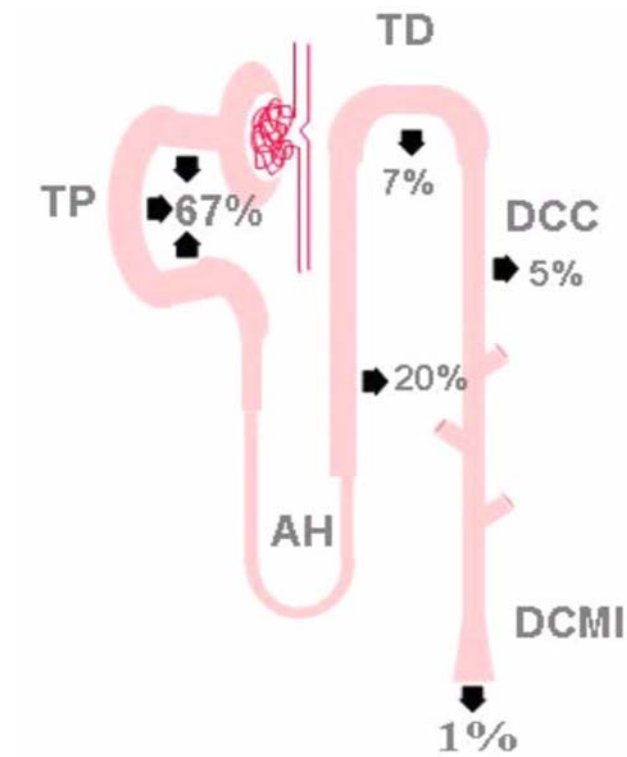


Figura 8. Porcentagem de reabsorção de Na^+ filtrado. A figura mostra as porcentagens de reabsorção de Na^+ nos diferentes segmentos do néfron. TP: túbulo proximal; AH: alça de henle; TD: túbulo distal; DCC: ducto coletor cortical e DCMI: ducto coletor medular interno. As porcentagens correspondem a uma situação de euvolemia.

Os mecanismos de reabsorção transcelular de solutos no túbulo proximal dependem do gradiente eletroquímico gerado pela $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ presente na membrana basolateral das células deste segmento. Essa enzima utiliza a energia química contida na ligação fosfoanidrido γ -terminal do ATP, para transportar o íon Na^+ contra o seu gradiente de potencial eletroquímico. Esse processo mantém baixa a concentração de Na^+ no meio intracelular, possibilitando o transporte ativo secundário de outros solutos por meio de co-transportadores localizados na membrana apical (Figura 9). Por exemplo, glicose e aminoácidos são reabsorvidos por mecanismo de co-transporte com o Na^+ , sendo transportados contra o seu gradiente de concentração, ao passo que o Na^+ entra na célula a favor do seu gradiente de potencial eletroquímico.

Além da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, foi demonstrada, a presença de uma segunda bomba de Na^+ , insensível à ouabaína e sensível à furosemida, chamada de $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$. Esta enzima apresenta distribuição paralela à $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, e tem, dependendo da espécie, atividade cerca de 10 vezes menor que esta última enzima e, assim como $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, é modulada pelos hormônios e autacóides responsáveis pela regulação do volume do fluido extracelular. Como todos os elementos das redes de sinalização responsáveis pela modulação “in vitro” da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ se encontram na membrana basolateral e, portanto, na sua imediata vizinhança, somado a sua participação menor no total de Na^+ reabsorvido, foi postulado que esta possa ser responsável pelo ajuste fino da reabsorção de Na^+ no túbulo proximal (Lara *et al.*, 2006).

Em síntese, a presença de diferentes transportadores na membrana basolateral e apical é o fator que direciona o movimento dos solutos da luz tubular para o interstício, permitindo a sua reabsorção. Portanto, o túbulo proximal é o principal segmento responsável pela reabsorção em massa de solutos e água cabendo aos segmentos distais

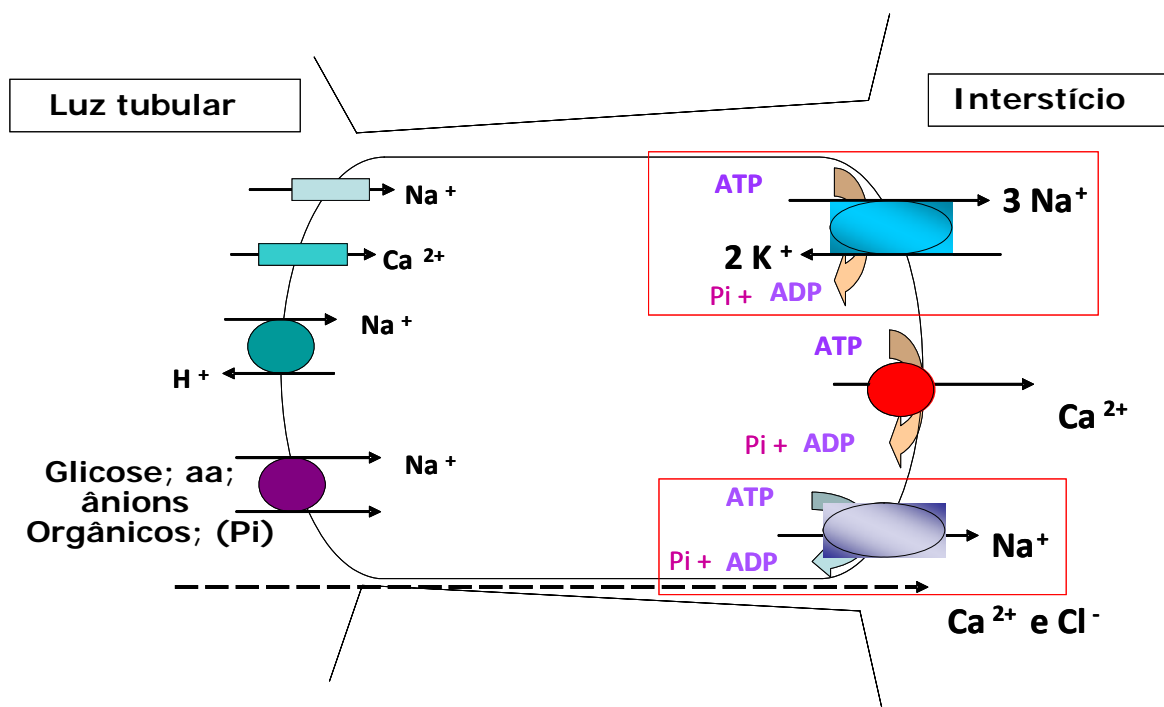


Figura 9. Epitélio de túbulo proximal: diferenças funcionais entre as membranas apical e basolateral. Além de uma H^+ -ATPase (não mostrada), na membrana apical estão localizados transportadores ativos secundários, que utilizam a energia derivada da dissipação do gradiente de Na^+ (criado e mantido pelos transportadores ativos primários da membrana basolateral) para transportar aminoácidos (aa), fosfato inorgânico (Pi) e glicose (no mesmo sentido lúmen \rightarrow citosol do fluxo de Na^+), H^+ (em sentido oposto) e outros íons e moléculas (como por exemplo, fármacos). Na membrana basolateral estão localizados diferentes transportadores ativos primários (ATPases), que utilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar íons (Na^+ e Ca^{2+}) contra seu gradiente de potencial eletroquímico. Outros transportadores (não representados) medeiam o transporte passivo de HCO_3^- , Na^+ acoplado a HCO_3^- , Cl^- (também acoplado a HCO_3^-) e há também canais para Cl^- e K^+ . A seta tracejada indica fluxos passivos através da via paracelular. Reproduzido de Cabral (2006).

do néfron o ajuste fino da composição da urina. Esta reabsorção de um maior volume de fluido nos segmentos proximais não exclui, como mencionado anteriormente, a existência de delicados e complexos mecanismos de regulação.

1.3.2. Mecanismos de reabsorção renal de sódio

A abundância de Na^+ no meio extracelular confere a este íon uma grande importância na determinação do volume deste compartimento. Assim, de todos os sistemas de transporte presentes nas células epiteliais renais, iremos focalizar nosso estudo sobre as ATPases transportadoras de Na^+ , a $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ e a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ resistente a ouabaína, localizadas nas membranas basolateral de células do túbulo proximal, local onde as mesmas participam da reabsorção de 70 a 80% do Na^+ filtrado. Essas ATPases são alvo de um complexo sistema de controle, fatores neurais e humorais, que modulam a excreção de Na^+ . A idéia central a ser desenvolvida nesta dissertação é a de que, se afetadas, estas ATPases, poderiam constituir uma das bases moleculares da hipertensão arterial de origem renal (associada a um aumento anormal da reabsorção de Na^+) nos quadros de programação metabólica. Por isso, serão consideradas a $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ e a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em maiores detalhes no ponto seguinte.

1.3.3. $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$

A $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$, ou a clássica bomba de Na^+ , é responsável pelo transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ através da membrana plasmática da maioria das células de eucariontes superiores. A energia para o trabalho desta bomba é obtida a partir de sua

auto-fosforilação, - utilizando a energia da ligação fosfoanidrido existente entre as fosforilas β e γ do ATP -, em um resíduo de aspartato presente numa seqüência altamente conservada, permitindo então o transporte destes íons (Skou, 1957; Jørgensen & Pedersen, 2001; Horisberger, 2004). Esse transporte acoplado estabelece os gradientes de potencial eletroquímico para Na^+ e K^+ no estado estacionário, essenciais para a manutenção dos potenciais de membrana e, em decorrência destes, para a excitabilidade de células musculares e nervosas. Ele contribui também para a regulação do volume celular e do pH intracelular e para a captação de nutrientes extracelulares, como glicose, aminoácidos e vitaminas essenciais para as células (Jørgensen & Pedersen, 2001; Horisberger, 2004). Sua primeira descrição foi feita por Skou (1957) e essa descoberta lhe rendeu o prêmio Nobel 40 anos mais tarde.

A estrutura heterodimérica da enzima consiste de duas subunidades de proteínas α e β ligadas não-covalentemente (Figura 10). A subunidade α contém pouco mais de 1000 resíduos de aminoácidos e apresenta uma massa molecular de aproximadamente mais de 100 kDa. Contém os sítios de ligação de ATP, Na^+ e K^+ e existe transitoriamente na forma de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico (Lingrel & Kuntzweiler, 1994). Quatro isoformas da subunidade α já foram identificadas em mamíferos e estão correlacionadas a genes diferentes (Shamraj & Lingrel, 1994), apresentando diferenças na afinidade por K^+ , Na^+ , ATP e na sensibilidade à ouabaína (Segall *et al.*, 2001).

Essas isoformas possuem padrões diferentes de expressão em tecidos específicos e são classificadas como subunidades α_1 , α_2 , α_3 , e α_4 , sendo que a isoforma α_1 é expressa praticamente em todos os tecidos. A isoforma α_2 é expressa principalmente nos tecidos nervoso e adiposo, coração e músculos esqueléticos. A isoforma α_3 é encontrada primariamente no tecido nervoso, embora também tenha sido detectada em

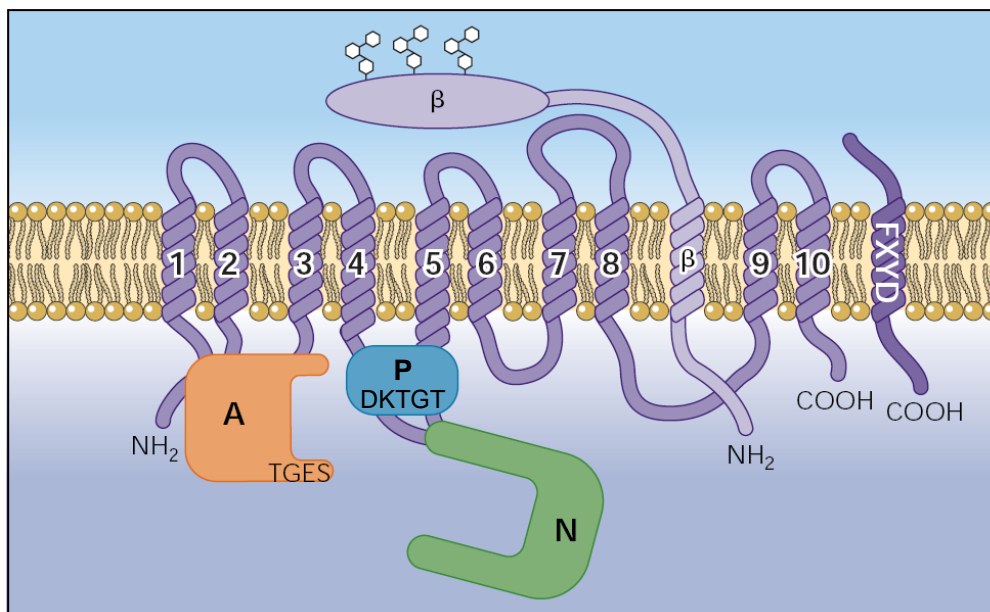


Figura 10. Topologia de membrana proposta para as subunidades α e β da $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase. O modelo mostra as subunidades α e β que podem estar associadas a subunidade γ . A subunidade γ é mostrada com sua conservada sequência FXVD. Na estrutura planar mostrada, aparecem em destaque: A, domínio atuador; P, domínio de fosforilação com a conservada sequência DKTGT que caracteriza ATPases do tipo P; N, domínio de ligação do nucleotídeo (ATP); TGES, representa uma sequência considerada chave na hidrólise do intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico. Os pequenos hexágonos brancos da subunidade β representam as unidades glicosiladas. Adaptado de Horisberger (2004).

outros locais, incluindo macrófagos multinucleados, glândula pineal e endotélio da córnea (Shyjan *et al.*, 1990; Vignery *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 2003). Trabalhos relacionados com a isoforma $\alpha 4$ têm sugerido que sua expressão está restrita a tecidos reprodutivos (Blanco & Mercer, 1998; Duran *et al.*, 2004).

Estudos de clonagem molecular da subunidade α da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ indicam a presença de 10 segmentos transmembrana, com pequenas alças extracelulares e quatro alça citosólicas, uma delas especialmente envolvida na catálise (ver mais adiante). Nesta subunidade podem ser reconhecidos 3 domínios globulares especialmente distintos que estão voltados para o citoplasma e que são conectados por uma haste estreita a um domínio transmembrana de forma aproximadamente cilíndrica e compacta (Kaplan, 2002; Jørgensen *et al.*, 2003; Horisberger, 2004). Estes domínios foram denominados P (domínio de fosforilação), A (domínio atuador) e N (domínio de ligação de nucleotídeos). Resumidamente, o domínio A da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ é constituído pela região N-terminal e a alça citoplasmática da cadeia polipeptídica localizada entre os segmentos transmembrana M2 e M3 (Kaplan, 2002; Jørgensen *et al.*, 2003; Horisberger, 2004). Já os domínios N e P estão co-localizados na grande alça citoplasmática que conecta os segmentos transmembrana M4 e M5 da subunidade α , formada aproximadamente por 430 resíduos de aminoácidos, e que contém os sítios de ligação do ATP e de fosforilação da enzima (sequência conservada como mencionado acima), respectivamente (Jørgensen & Pedersen, 2001; Kaplan, 2002; Jørgensen *et al.*, 2003; Horisberger, 2004).

A subunidade β , contém cerca de 300 resíduos de aminoácidos e peso molecular em torno de 50 kDa. Possui apenas 1 domínio transmembrana cuja pequena extremidade N-terminal está voltada para o citoplasma. Esta subunidade é altamente glicosilada e está praticamente voltada para o meio extracelular (Kaplan, 2002;

Horisberger, 2004). Estudos de clonagem molecular têm também identificado heterogeneidade da subunidade β , mostrando as isoformas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. Originalmente a isoforma $\beta 1$ foi isolada a partir do tecido renal, enquanto as outras isoformas têm sido identificadas em vários tecidos (Martin-Vasallo *et al.*, 1989; Malik *et al.*, 1996).

Além das subunidades α e β , foi identificada uma terceira subunidade denominada γ . Essa subunidade contém 60 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 7 kDa que se associa à $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ de maneira tecido-específica. Ela faz parte de uma família de proteínas denominadas FXYD, caracterizadas por apresentar apenas um único segmento transmembrana. Evidências recentes indicam que ela não é um componente essencial para $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, embora atue como regulador, modulando a afinidade da enzima pelo ATP bem como para os íons Na^+ e K^+ (Rivard *et al.*, 2005).

Horisberger (2004) propôs um modelo estrutural elegante para descrever o acoplamento entre hidrólise do ATP no domínio citoplasmático e o transporte dos cátions envolvendo domínios transmembrana, uma representação do modelo de catálise de Alberts-Post (Post *et al.*, 1960; Cornelius, 1996). Esse modelo (Figura 11) descreve a presença dos domínios A, N e P, chamados de “centro motor” das ATPases do tipo P e devido ao alto grau de conservação da seqüência no domínio P, acredita-se que o mecanismo de catálise que opera nesta parte da proteína possa ser muito semelhante em todas as P-ATPases. Entretanto, as alterações estéricas que definem os sítos de ligação e transporte dos cátions são específicas para cada P-ATPase. Na etapa inicial do ciclo reacional, a enzima no estado E1, com o ATP presente no seu sítio de ligação em estado de alta afinidade ($\sim 1 \mu\text{M}$), liga 3 íons Na^+ no sítio de alta afinidade voltado para o citosol provocando uma alteração conformacional onde o domínio N sofre uma rotação e posiciona a fosforila γ -terminal do ATP fechando o sítio de fosforilação.

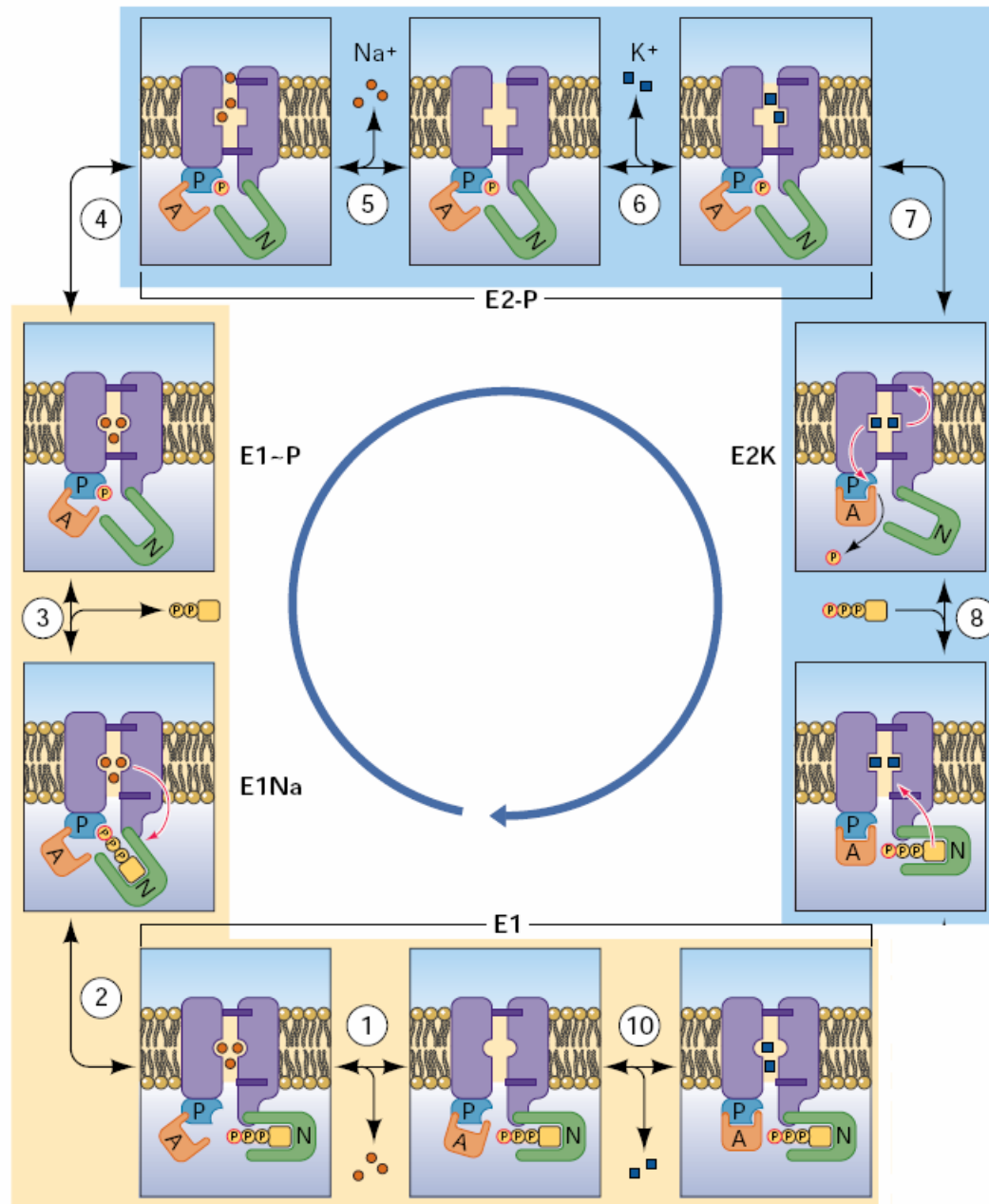


Figura 11. Modelo proposto para o transporte dos cátions pela (Na⁺+K⁺)ATPase. P, A e N correspondem aos domínios de fosforilação, atuador e de ligação de nucleotídeos, respectivamente da subunidade α. Para descrição, ver texto. Adaptado de Horisberger (2004).

Por analogia com a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (Horisberger, 2004), nesta posição o ATP estabelece uma ponte entre os domínios P e N (passo 2 da Figura 11) (Toyoshima & Mizutami, 2004). Essa ponte pode ser rompida permitindo a transferência da fosforila γ -terminal para o resíduo de aspartato D da sequência DKTGT presente no sítio de fosforilação. Em seguida, o domínio A também sofreria uma rotação de 30° em torno do eixo horizontal (Toyoshima & Mizutami, 2004), produzindo um movimento de translação do primeiro segmento transmembrana do lado intracelular e de 90° na terceira volta interna desta α -hélice. Esses autores propõem que esse movimento do primeiro segmento transmembrana provocaria o fechamento do portão interno que é responsável pela entrada dos íons Na^+ . Essa etapa é acompanhada pela liberação do ADP, resultando no estado E1~P da enzima (com os 3 íons Na^+ ocluídos). Durante o ciclo catalítico, esta conformação E1~P de alta energia muda para a conformação E2-P abrindo o portão para o lado extracelular e provocando uma nova alteração conformacional no sítio de ligação dos cátions, com a subsequente liberação dos íons Na^+ . A conformação E2, agora com os sítios dos cátions vazios está pronta para a entrada dos íons K^+ . A ocupação dos sítios da enzima no estado E2-P por 2 íons K^+ vindos do meio extracelular resulta em duas mudanças: a defosforilação do resíduo fosforilado de aspartato na sequência DKTGT e a oclusão do K^+ pelo fechamento do portão extracelular. O domínio N agora possui um sítio acessível ao ATP intracelular e, na etapa final de cada ciclo de transporte de cátions, o ATP (ou outros nucleotídeos como ADP, ou análogos não hidrolisáveis do ATP como visto em estudos “in vitro”) liga-se a esse sítio intracelular de baixa afinidade para nucleotídeos (da ordem de 100-1000 μM) provocando uma mudança conformacional da forma E2K para a forma E1, resultando na abertura do portão intracelular, com subsequente liberação do K^+ do lado citoplasmático. Essas etapas podem ocorrer na ausência do nucleotídeo no sítio de baixa

afinidade, mas com uma velocidade menor (Horisberger, 2004). É interessante antecipar desde já que esta ligação de ATP num sítio de baixa afinidade parece estar alterada em células de tecidos de animais desnutridos. Este assunto será retomado posteriormente (Resultados e Discussão).

A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ está sujeita a uma complexa regulação, que acaba conferindo às células a capacidade de coordenar precisamente a atividade da enzima com as suas necessidades fisiológicas. Em sua grande maioria, cascatas de sinalização ativadas por hormônios e autacóides (aldosterona, norepinefrina, dopamina, insulina e angiotensina II) modulam a atividade de cinases e fosfatases que alteram o grau de fosforilação da subunidade α em domínios regulatórios específicos (Aperia *et al.*, 1994; Féraille & Doucet, 2001). Este fenômeno resulta em modificações nos parâmetros cinéticos da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e em modificações da expressão gênica e isto, conseqüentemente, no número de unidades enzimáticas residentes na membrana celular (Ewart & Klip, 1995; Blanco & Mercer, 1998). Tem sido demonstrado que modificações na atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, levando-a a um estado descontrolado poderiam ser o ponto de partida para a gênese de quadros de hipertensão arterial (De Ferrari, 2003) e, como proposto para a $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ (ver texto abaixo), ela poderia ser um dos diversos componentes celulares, que quando alterados, participam na gênese da hipertensão arterial de origem renal.

1.3.4. Na⁺-ATPase

A primeira descrição acerca da existência de uma “segunda bomba” de Na⁺ em tecido renal ocorreu no ano de 1969 e diversos dados elucidando características cinéticas e bioquímicas da Na⁺-ATPase vieram comprovar sua existência nos anos seguintes. Em 1969, Whittembury e Fishman (1969) descreveram um mecanismo de transporte de Na⁺, concomitante com Cl⁻ e água, na ausência de K⁺ e na presença de ouabaína, em fatias de rim de ratos. No ano seguinte Whittembury & Proverbio (1970) verificaram, em homogenato de córtex renal de rato, a inibição deste transporte alternativo de Na⁺ por ácido etacrínico. Posteriormente foi encontrada, na fração microsomal de córtex de rim de rato, uma atividade ATPásica estimulada por Na⁺ insensível à ouabaína 10 mM o que mostrou a associação entre os fenômenos de hidrólise de ATP e o fluxo ativo de Na⁺ (Proverbio *et al.*, 1975). Além disso, também foi demonstrado que esse transporte ativo é estimulado por Na⁺, é insensível ao K⁺ e à ouabaína e é inibido por ácido etacrínico, furosemide e triflocina (Del Castillo *et al.*, 1982; Proverbio *et al.*, 1989). Na ausência de KCl e presença de 7 mM de ouabaína este transporte foi considerado inicialmente corresponder a cerca de 10% do transporte de Na⁺ mediado pela (Na⁺+K⁺)ATPase (Proverbio *et al.*, 1989). A partir do conjunto destes dados iniciais foi sugerida a existência de duas bombas de Na⁺ no túbulo proximal: a clássica (Na⁺+K⁺)ATPase e a Na⁺-ATPase insensível à ouabaína com importantes diferenças nas suas propriedades cinéticas (Tabela 2) e regulatórias.

A caracterização da Na⁺-ATPase como uma entidade molecular diferente da (Na⁺+K⁺)ATPase também foi confirmada por De Souza e colaboradores (2007). Estes autores imunoprecipitaram a (Na⁺+K⁺)ATPase com anticorpo monoclonal anti- α 1, de células MDCK I (de origem distal), revelando que a Na⁺-ATPase insensível à ouabaína e sensível à furosemide permanecia no sobrenadante com uma atividade específica

Tabela 2. Caracterização parcial das atividades da Na⁺-ATPase e da (Na⁺+K⁺)ATPase em córtex de rim de rato.

Característica	Na ⁺ -ATPase	(Na ⁺ +K ⁺)ATPase
Requerimento de Mg ²⁺	Sim	Sim
K _m ^{MgATP} (mM:mM)	1,2:0,48	0,5:0,5
K _m ^{Na} (mM)	8,0	16,0
Requerimento de K ⁺	Não	Sim
Estimulação por cátion	Na ⁺ >Li ⁺	K ⁺ >Rb ⁺ >NH ₄ ⁺ >Cs ⁺ >Na ⁺
Estimulação por ânion	Não	Não
Substrato	ATP	ATP>>>GTP, ITP,ADP,CTP
Temperatura ótima (°C)	47	52
pH ótimo	6,9	7,2
Sensibilidade a ouabaína (7 mM)	0%	100%
Sensibilidade à furosemida (2 mM)	95%	5%
Sensibilidade ao ácido etacrínico (2 mM)	100%	60%

ATP, adenosina trifosfato; GTP, guanosina trifosfato; ITP, inosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; CTP, citidina trifosfato. Estão em destaque (cercados em vermelho) as três maiores características diferenciadoras. Adaptado de Proverbio *et al.*, 1989.

idêntica à encontrada antes da imunoprecipitação. Os parâmetros cinéticos desta Na^+ -ATPase isolada são semelhantes aos encontrados em frações de córtex renal, confirmando que, mesmo em territórios celulares diferentes, a Na^+ -ATPase apresenta propriedades cinéticas semelhantes.

A Na^+ -ATPase teria uma distribuição paralela à da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ em mamíferos, como proposta por Borgatti e colaboradores (1985). Treze anos antes havia sido descrito em fatias de medula externa renal, onde se encontra o ramo ascendente grosso da alça de Henle, um transporte de Na^+ não acoplado a K^+ , insensível à ouabaína e sensível a ácido etacrínico, demonstrando assim a ubiquidade da “segunda bomba” e de sua coexistência com a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ em segmentos no néfron com alta capacidade de transporte de Na^+ (De Jairala *et al.*, 1972).

Para a Na^+ -ATPase também foram propostas conformações diferentes ao longo do ciclo de catálise: E1 e E2 (De Souza *et al.*, 2003; Figura 12). Inicialmente, ocorreria a ligação do Na^+ e, posteriormente, a ligação do ATP, formando um intermediário de alta energia (E1~P). Este sofreria uma mudança conformacional, originando um intermediário de baixa energia e pouca afinidade por Na^+ (E2-P), o que acarretaria a sua liberação para o meio extracelular. Subseqüentemente, se completa a hidrólise do intermediário e a liberação do Pi. A forma E₂ sofreria então uma nova alteração conformacional retornando ao estado E1. A formação de um intermediário fosforilado em seu ciclo catalítico a caracteriza como uma P-ATPase, sendo possível especular que exista certa homologia estrutural com as ATPases desta classe, ao menos nas regiões mais conservadas.

Apesar de muitos trabalhos já publicados sobre as características cinéticas da Na^+ -ATPase, seu papel fisiológico ainda não foi definitivamente estabelecido. Alguns trabalhos correlacionam seu papel fisiológico com a regulação do meio intracelular e

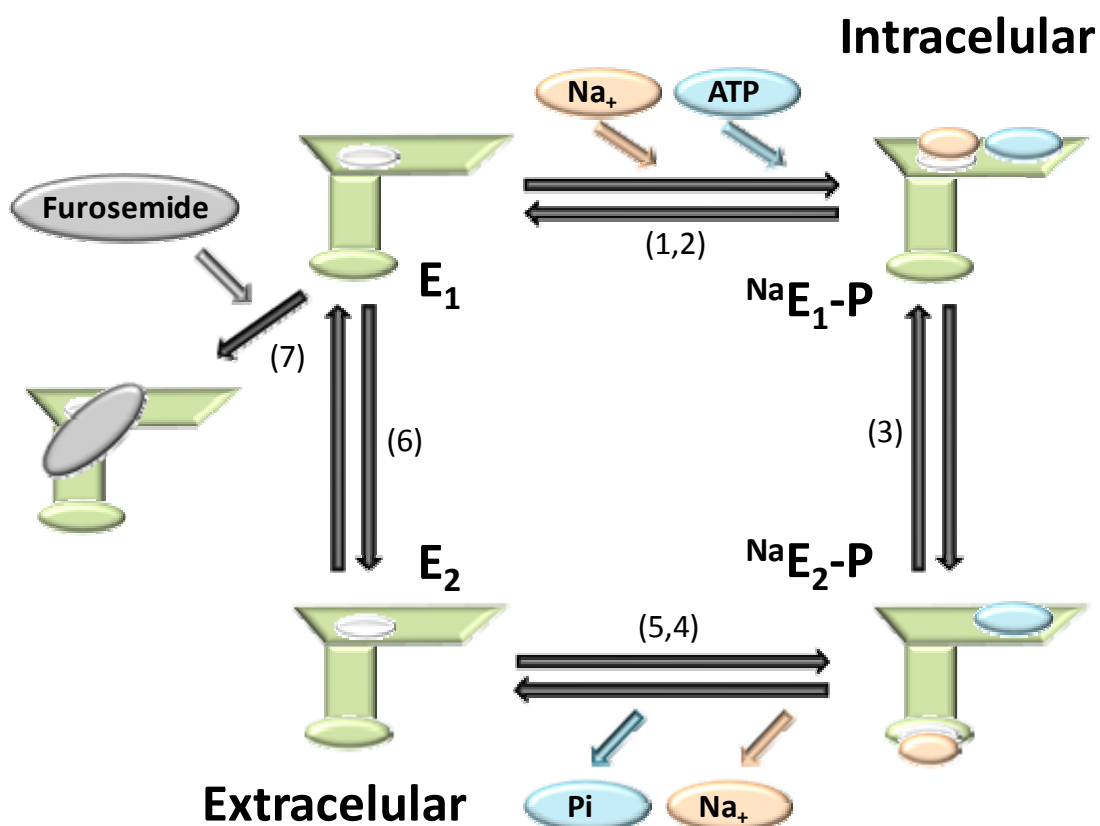


Figura 12. Ciclo catalítico da Na⁺-ATPase. O ciclo inicial proposto para a Na⁺-ATPase consiste das etapas: (1) ligação do Na⁺; (2) fosforilação por ATP formando um intermediário de alta energia; (3) interconversão para um intermediário de baixa energia e pouca afinidade por Na⁺ provocando a liberação do mesmo para o meio extracelular; (4) hidrólise do intermediário fosforilado; (5) liberação de Pi; (6) nova mudança conformacional retornando ao estado E₁. A furosemida parece inibir a formação do intermediário fosforilado estabilizando um complexo inativo E.Furosemida (7). De Souza *et al.*, 2003.

com a regulação da osmolaridade do meio extracelular, uma vez que esta enzima também transporta Na^+ através da membrana contra seu gradiente de potencial eletroquímico (Provérbio *et al.*, 1988a; Provérbio *et al.*, 1988b; Del Castillo *et al.*, 1985). Pode-se ver hoje que algumas evidências indicaram há muito tempo a participação desta enzima na reabsorção de Na^+ no túbulo proximal. Merecem ser citadas as encontradas no estudo realizado através de micropunção de néfrons corticais, demonstrando que a reabsorção de Na^+ é parcialmente inibida por furosemida (Malnic *et al.*, 1969). Apontaram para isso também, as observações de que ratos alimentados com dieta rica em NaCl durante um período de quatro meses apresentam um aumento de 70% no acúmulo ativo de Na^+ medido em vesículas “inside out” de membrana basolateral de túbulo proximal de rim, enquanto a atividade $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$ permanece inalterada (Marin *et al.*, 1986).

Em conjunto, essas evidências sugerem que a Na^+ -ATPase participa da reabsorção de Na^+ em diferentes segmentos do néfron, podendo ser um dos possíveis mecanismos celulares alterados nos distúrbios que envolvem mudanças no volume do meio extracelular. Como a regulação da pressão arterial está intimamente associada ao volume extracelular a Na^+ -ATPase, junto com a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ pode ser um dos componentes celulares, que quando alterados, participam na gênese da hipertensão arterial de origem renal como proposto anteriormente no texto.

1.3.5. Regulação da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ e da Na^+ -ATPase por Ang II em túbulos proximais e vias de sinalização celular acopladas

A reabsorção de Na^+ em túbulos proximais renais é modulada por diferentes hormônios, onde podemos destacar como um dos principais a Ang II e seus peptídeos

gerados por proteólise progressiva e limitada. Como um dos objetivos da presente dissertação foi o de estudar a influência da Ang II no transporte renal de Na^+ de ratos programados, o texto a seguir estará especialmente focado neste que é considerado um importante hormônio responsável pela economia corporal de Na^+ (Férraille & Doucet, 2001).

O primeiro evento da cascata para síntese de Ang II sistêmica é a secreção de renina que ocorre principalmente no tecido renal. Este processo é regulado por três diferentes mecanismos: (1) a diminuição da concentração de Na^+ do fluido luminal que chega à macula densa e que, levando a uma diminuição da reabsorção de NaCl através destas células especializadas, gera sinais químicos (provavelmente de Ca^{2+}) para as células justaglomerulares que respondem com a liberação de renina para a circulação; (2) a diminuição da pressão sanguínea nos vasos pré-glomerulares; (3) atividade simpática renal, cujo sinalizador é a noradrenalina. Assim como no primeiro caso, os dois últimos processos culminam com a liberação sistêmica de renina (Dzau *et al.*, 1988; Aurell, 1998; Opolski & Filipiak, 2000; DiBona, 2002), embora alterações simultâneas no sistema renina-angiotensina intrarenal sejam também importantes (Harris & Gomez, 1997; De Gasparo *et al.*, 2000).

Em seres humanos, a síntese de renina é iniciada com a formação do pré-pró-renina constituída de 406 aminoácidos. No retículo endoplasmático da célula justaglomerular o peptídeo sinal de 20 aminoácidos é clivado da pré-pró-renina, formando pró-renina (Peach, 1977; Re, 2003). Esta é então empacotada nos grânulos de secreção do aparelho de Golgi, onde ocorre a retirada do resíduo pró-peptídico de 46 aminoácidos da sua porção N-terminal, formando uma carboxipeptidase glicosilada de peso molecular de aproximadamente 44 kDa. Após ser liberada por exocitose para a circulação geral, ela é convertida finalmente em renina também por proteólise limitada

num processo catalisado por uma enzima semelhante à tripsina (Hsueh *et al.*, 1991). Na última década foi demonstrado que a renina pode também ser produzida em diversos tecidos e, portanto, o sistema renina-angiotensina pode ser ativado localmente em diferentes territórios (como por exemplo, no coração) e também em diversas regiões do tecido renal (Harris *et al.*, 1997; De Gasparo *et al.*, 2000). Nestes tecidos, há produção local de concentrações altas de Ang II como, por exemplo, no espaço peritubular proximal que circunda as ATPases localizadas na membrana basolateral, (Kobori *et al.*, 2001; Nishiyama *et al.*, 2002), revelando uma intensa atividade de renina.

Após ser liberada na circulação, a renina promove a clivagem de seu substrato, o angiotensinogênio (uma α_2 -globulina), na ligação peptídica formada entre a Leu¹⁰ e a Val¹¹. Dessa forma, é gerado o decapeptídeo angiotensina I (Ang I), intermediário da cascata que corresponde à porção N-terminal do angiotensinogênio. Após a formação de Ang I, a enzima conversora de angiotensina (peptidildipeptídeo-hidrolase, ECA) catalisa a quebra da ligação entre a Phe⁸ e a His⁹ na porção carboxi-terminal deste peptídeo, formando Angiotensina II (Ang II), octapeptídeo considerado como o hormônio vasoativo mais relevante em mamíferos.

A ECA está amplamente distribuída em diferentes órgãos e fluidos corporais, principalmente no leito vascular pulmonar e no rim, e existe sob duas formas: solúvel e ligada à membrana. A maior parte se apresenta ligada à membrana e está localizada na membrana plasmática de diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais vasculares, membrana luminal de células epiteliais renais e células neuroepiteliais (Soubrier *et al.*, 1993; Carey & Siragy, 2003). Assim como a ECA, o angiotensinogênio também se encontra em grandes quantidades no tecido renal e, o mais importante do ponto de vista da programação metabólica na desnutrição, ambos componentes do

sistema se encontram diminuídos na desnutrição intra-uterina (Woods & Rasch, 1998; Woods *et al.*, 2001).

Atualmente são descritos dois tipos principais de receptores para Ang II: AT₁ e AT₂ (Bumps *et al.*, 1991; Goodfriend, 2000; Paul *et al.*, 2006) que, quando estimulados, desencadeiam complexos eventos de sinalização celular, muitas vezes antagônicos, que regulam a reabsorção e a excreção renal de Na⁺ influenciando desta forma a pressão arterial (Jagadeesh, 1998; Dinh *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2006). Os receptores do tipo AT₁ estão amplamente distribuídos no sistema cardiovascular, renal, endócrino e nervoso em humanos (Allen *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2006). Em túbulos proximais renais estes receptores estão presentes na membrana apical e basolateral (Carey & Siragy, 2003). Além da Ang II, o receptor AT₁ liga, seletivamente e com alta afinidade, bifenilimidazoles como o losartan (DuP 753) e candesartan, duas ferramentas farmacológicas poderosas e específicas para o estudo dos processos modulados por Ang II que envolvem a participação destes receptores. Em ratos e em camundongos foi mostrada a presença de dois subtipos de receptores AT₁ denominados: AT_{1A} e AT_{1B} que apresentam 95% de homologia entre si (Zhou *et al.*, 1993; De Gasparo *et al.*, 2000). O mRNA do receptor AT_{1A} é expresso em células do músculo liso vascular de aorta, no pulmão e nos ovários, enquanto que o do receptor AT_{1B} é expresso principalmente na hipófise anterior, na adrenal e no útero (Kakar *et al.*, 1992). Os dois tipos de mRNA são expressos de forma similar em baço, fígado e rim (Kakar *et al.*, 1992). Os receptores AT_{1A} são sensíveis ao losartan em concentrações nanomolares, possuem alta afinidade para Ang II, moderada afinidade pela angiotensina III (Ang III) e muito pouca para angiotensina de 1 a 7 {Ang-(1-7)} (Zhou *et al.*, 1993; Douglas & Hopfer, 1994). Em humanos e em outros mamíferos até o presente momento não foram detectados subtipos de receptores AT_{1B}.

O receptor AT₁ pertence à classe de receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (De Gasparo *et al.*, 2000) que, quando estimulados por Ang II, aumentam a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase (Therien & Blostein, 2000) e da Na⁺-ATPase (Rangel *et al.*, 2005) da membrana basolateral de túbulos proximais, com consequente aumento na reabsorção de Na⁺. A ligação de Ang II promove mudanças conformacionais na molécula do receptor, favorecendo a sua interação com diversas proteínas G (Hunyady *et al.*, 1996; De Gasparo *et al.*, 2000), que por sua vez ativam uma fosfolipase C (PLC), levando à hidrólise de fosfatidil inositol-bis-fosfato (PIP₂) da membrana plasmática em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), e que culmina simultaneamente com aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular e ativação de uma proteína cinase C (PKC) (Rangel *et al.*, 2005).

Os três grandes grupos de PKCs e suas diferentes isoformas (clássicas, nóveis e atípicas) parecem mediar sinais celulares que levam ao estabelecimento de quadros de hipertensão arterial. Salamanca e Khalil (2005), demonstraram que a ligação de Ang II aos seus receptores (Ang II sistêmica ou localmente produzida no epitélio tubular proximal) ativaria a cascata de sinalização descrita acima podendo modificar desta forma o estado de fosforilação da Na⁺-ATPase e da (Na⁺+K⁺)ATPase e modulando consequentemente a reabsorção proximal de Na⁺. Além disso, observaram que ocorre um aumento das quantidades das PKCs dos três grupos, sendo uma forte evidência do envolvimento destas cinases na gênese da hipertensão arterial. A transferência de PKCs para a superfície celular ou ativação de cinases residentes em estado latente (Chakravarthy *et al.*, 1994) parece ativar uma miríade de outras cinases capazes de interagir com os miofilamentos, aumentar o estado de contração do músculo liso vascular e, consequentemente, a resistência vascular periférica que conduz à hipertensão.

Com relação aos receptores AT₂, eles são altamente expressos nos tecidos mesenquimais fetais de roedores e do homem (Thomas & Mendelsohn, 2003), mas com poucos dias de nascimento, a sua expressão diminui rapidamente para níveis muito baixos. Apesar disso, o receptor AT₂ ainda pode ser encontrado em tecidos adultos (Goodfriend, 2000), como no sistema nervoso central (Tsutsumi & Saavedra, 1991), na medula adrenal e zona glomerulosa do córtex supra-renal (Riordan, 1995), no rim (células epiteliais glomerulares, túbulos corticais e células intersticiais) (Ozono *et al.*, 1997), no coração (miocárdios atrial e ventricular e células do músculo liso das artérias coronárias) e nos vasos sanguíneos (Asano *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Wharton *et al.*, 1998). O receptor AT₂ mostra as seguintes características: (1) alta afinidade pela família de compostos tetraimidazolespiridinas denominados PD (123319 e 123177); (2) baixa afinidade pelo losartan (Nishimura *et al.*, 1994); (3) ativação por reagentes de grupamentos tióis (como o ditioneitol, DTT); e (4) tem como agonista específico o CGP 42112A [nicotinil-Tir-(N^α-benzilcarbonil-Arg)Lys-His-Pro-Ile-OH] (Bernstein & Berk, 1993).

A maioria das ações descritas para a ligação de Ang II aos receptores AT₂ mostraram, de modo geral, um contrabalanço dos efeitos mediados por AT₁, tais como o efeito antiproliferativo, vasodilatador e natriurético (Carey & Siragy, 2003; Dinh *et al.*, 2001). A estrutura molecular desta classe de receptores se assemelha também à superfamília dos receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, principalmente Gi, Go e Gs (Ozono *et al.*, 1997; Goodfriend, 2000; Hansen *et al.*, 2000; Thomas & Mendelsohn, 2003; De Souza, *et al.*, 2004; Lara *et al.*, 2006) que, quando estimulados, podem inibir a atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica (Hakam & Hussain, 2006) e Na⁺-ATPásica (De Souza, *et al.*, 2004; Lara *et al.*, 2006) por duas principais vias de sinalização celular diferentes. A primeira envolve mudanças conformacionais na

molécula do receptor, favorecendo a sua interação com proteínas $G_{i/o}$ (Hakam & Hussain, 2006; Lara *et al.*, 2006), o que por sua vez aumenta os níveis de óxido nítrico (ON), através de uma óxido nítrico sintetase (NOS). Os níveis aumentados de ON levariam à ativação de uma guanilato ciclase, culminando com aumento dos níveis de cGMP intracelular e ativação de uma proteína cinase G (PKG). A segunda via de sinalização celular também envolve mudanças conformacionais na molécula do receptor, só que dessa vez, favorecendo a sua interação com uma proteína G_s (De Souza, *et al.*, 2004), que leva ao aumento dos níveis intracelular de cAMP e ativação da proteína cinase A (PKA). Ambas as vias descritas acima envolvendo PKA e PKG, levam a um aumento na fosforilação da $(Na^+ + K^+)ATPase$ e da $Na^+ - ATPase$ em resíduos de serina específicos, levando à inibição das mesmas e a uma menor reabsorção de Na^+ renal através do epitélio tubular proximal.

A partir das informações introduzidas pode-se postular que a hipertensão arterial poderia estar associada a alterações na expressão de receptores de Ang II ou à expressão e atividade de diferentes isoformas de cinases, tanto no leito vascular quanto nos túbulos renais, contribuindo para a uma maior vasoconstrição e para o aumento da reabsorção de Na^+ . Estas hipóteses, em conjunto com outras, foram levadas em consideração ao delinear os objetivos desta dissertação.

1.4. A hipertensão arterial de origem renal como consequência da programação metabólica: diferentes processos e mecanismos

A hipertensão arterial acomete 25% da população mundial acima dos 20 anos de idade e é considerada o principal fator de risco para doenças cardiovasculares (Staessen *et al.*, 2003). O anuário estatístico do Ministério da Saúde mostrou que as doenças do

aparelho circulatório correspondem a 27% das mortes de causas definidas ocorridas no Brasil. A hipertensão arterial está associada a 60% dos infartos do miocárdio, 25% das causas de tratamentos dialíticos e 25% dos acidentes vasculares cerebrais. Tem sido motivo de preocupação das autoridades de saúde frente ao ônus social que acarreta, porque incide numa parcela economicamente ativa da população (Ministério da Saúde, 2001).

É bem conhecido que o rim participa ativamente do processo de regulação da pressão arterial e da gênese da hipertensão arterial, afirmação que tem um importante suporte no trabalho de Grisk e Retting (2001). Esses autores realizaram o transplante cruzado de rins de animais normotensos e hipertensos histocompatíveis, demonstrando que quando são transplantados rins provenientes de ratos hipertensos em suas respectivas linhagens normotensas, estas desenvolvem hipertensão. Além disso, quando rins de ratos normotensos são transplantados para ratos hipertensos, estes têm a sua pressão arterial reduzida. Dessa forma, o rim parece ser um órgão chave para o estudo da hipertensão arterial e por ser particularmente vulnerável à programação metabólica (figura 13), constitui um interessante modelo-chave para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares que levam à hipertensão arterial observada na vida adulta nos quadros de programação metabólica por desnutrição protéica nas etapas iniciais da vida.

1.4.1. Redução no número de néfrons

Diversos estudos têm demonstrado a direta relação entre a programação metabólica, a redução no número de néfrons e a hipertensão arterial (Hughson *et al.*, 2003; Hoy *et al.*, 2005). Brenner e colaboradores (1988) propuseram que o baixo peso

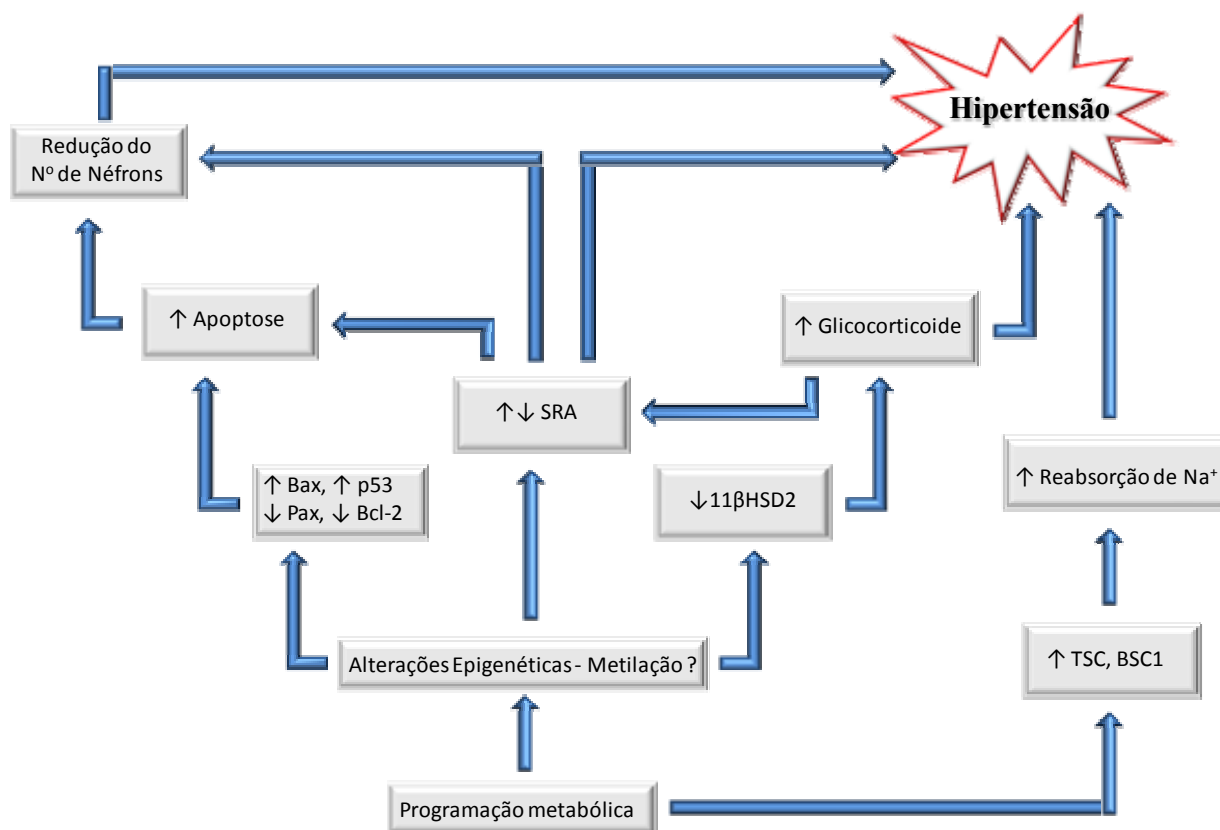


Figura 13. Mecanismos pelo qual a programação metabólica pode levar à hipertensão arterial na vida adulta. SRA, sistema-renina-angiotensina; Bax e p53, fatores pró-apoptóticos; Pax e Bcl-2, fatores anti-apoptóticos; 11βHSD2, enzima 11β Hidroxiesteróide desidrogenase do tipo II; TSC; co-transportador $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$; BSC1, co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$. As setas indicam sentido das diferentes influências, em alguns casos interativas que convergem no estabelecimento de quadros de hipertensão arterial. Adaptado de Nejad *et al.*, 2006.

no nascimento, uma clássica característica da programação metabólica por desnutrição protéica, está associada a um déficit congênito no número de néfrons, o que predispõe para uma redução da excreção renal de Na^+ e, assim, a um aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento da hipertensão arterial, especialmente em populações submetidas a dietas com alto conteúdo de Na^+ como é o caso em algumas regiões costeiras do nordeste brasileiro (Matos & Ladeia, 2003). Essa hipótese também é baseada em trabalhos que demonstram que a redução no número de néfrons submete o glomérulo a uma hipertrofia e hiperfiltração compensatória (Paixão *et al.*, 2001), que seria uma resposta adaptativa na tentativa de sustentar uma função renal adequada. Essa adaptação, entretanto, levará a uma hipertensão glomerular, perpetuando um ciclo vicioso no processo de perda de néfrons (Figura 14). Experimentalmente, essa perda de função da massa renal manifesta-se clinicamente com o desenvolvimento da hipertensão arterial e proteinúria, ambas acelerando o processo de falência renal (Hostetter *et al.*, 1981; Oliver *et al.*, 1994).

1.4.2. Apoptose

Outro mecanismo que pode levar à hipertensão arterial é a apoptose em etapas críticas do desenvolvimento renal (Sorenson *et al.*, 1995; Porteous *et al.*, 2000), que leva principalmente a uma redução do número de néfrons e contribui para as alterações descritas no tópico anterior. Muitos trabalhos demonstram que a programação metabólica influencia os mecanismos de regulação da apoptose, por exemplo, a desnutrição protéica em ratas durante a segunda metade da gestação, foi associada com uma significativa redução no peso corporal e renal da sua prole (15% e 20% respectivamente). Esse mesmo trabalho demonstrou que a prole apresentava um menor

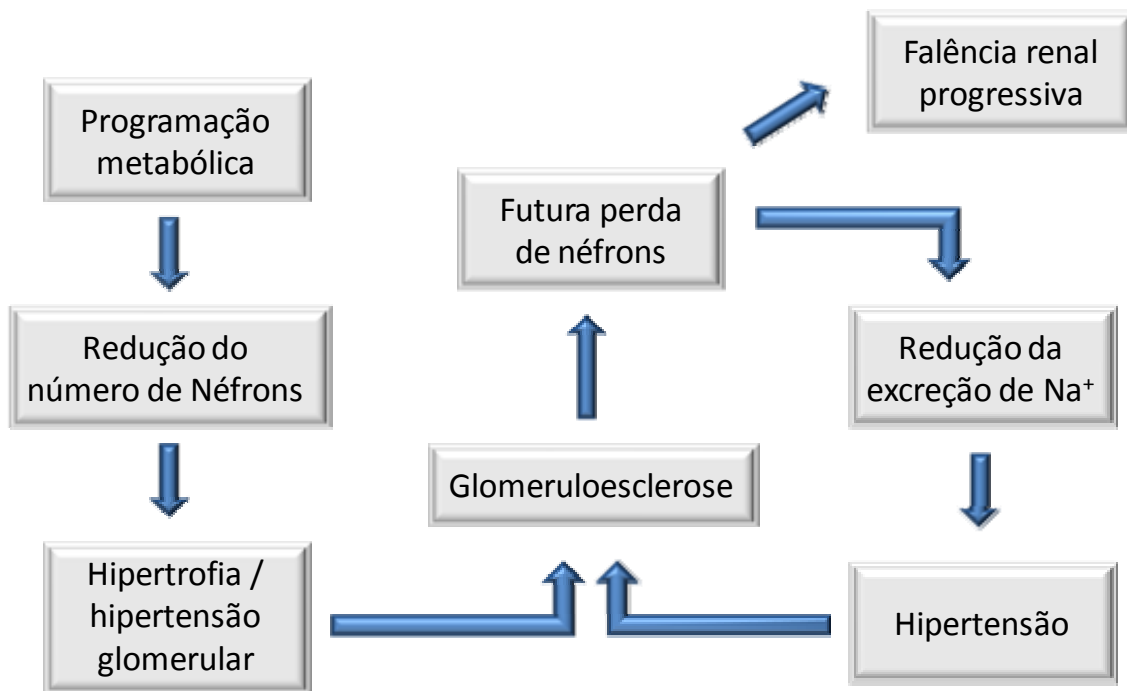


Figura 14. Mecanismo pelo qual a programação metabólica pode levar a redução no número de néfrons com consequente hipertensão arterial na vida adulta.

Adaptado de Nejad *et al.*, 2006.

número de néfrons (28%), aumento da pressão arterial sistólica e aumento de células apoptóticas (no glomérulo, células epiteliais de diferentes segmentos do néfron e células intersticiais) (Vehaskari *et al.*, 2001). Além disso, Welham e colaboradores (2002) demonstraram que a programação metabólica por desnutrição protéica durante toda a gravidez foi associada com o aumento de células apoptóticas na fase de desenvolvimento metanéfrico com redução no número de células progenitoras. Esses autores sugeriram que o aumento significativo de células apoptóticas pode ser relacionado com um aumento de fatores anti-apoptóticos (ex: Pax-2 e Bcl-2) e/ou diminuição de fatores pró-apoptóticos (ex: Bax e p53) (Welham *et al.*, 2002). Em outro modelo de programação metabólica, a insuficiência útero-placentar, foi demonstrado que a prole programada apresenta uma redução do número de néfrons (25%) e aumento de células apoptóticas. Essas mudanças foram associadas com uma alteração na expressão gênica de fatores pró e anti-apoptóticos (diminuição na expressão de mRNAs para Bcl-2 e aumento na expressão de mRNAs para Bax e p53) onde a alteração da expressão de p53 foi relacionada com o status de metilação do DNA (Pham *et al.*, 2003). Os autores propuseram que a insuficiência útero-placentar levaria a um menor grau de metilação do DNA desse fator, explicando assim a observada redução no número de néfrons e conseqüentemente o aumento da pressão arterial.

1.4.3. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e economia corporal de Na⁺

Embora ainda não estejam esclarecidos os mecanismos pelo qual a programação metabólica leva à hipertensão arterial na vida adulta, evidências substanciais indicam que alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) podem ser uma das

principais vias. Em modelos de hipertensão primária, como nos ratos espontaneamente hipertensos (SHR), é possível observar diferenças na expressão dos componentes do SRAA quando comparados com animais normotensos (Pratt *et al.*, 1989). Além disso, ratos transgênicos para o SRAA (introdução do gene *Ren-2* [renina] de camundongos no genoma de ratos) desenvolvem hipertensão sugerindo que esse sistema pode ser crítico na etiologia desta patologia (Mullins *et al.*, 1990).

Diversos outros sistemas de hormônios e autacoides, entre eles os que envolvem endotelina, peptídeos natriuréticos, neuropeptídeo Y e óxido nítrico podem influenciar a regulação da pressão sanguínea e a função renal e manipulações que interrompam o SRAA são altamente efetivas no controle da hipertensão. Sherman & Langley-Evans (2000) observaram que o pré-tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina (Captopril) ou do antagonista do receptor AT₁ (Losartan) reverte permanentemente o efeito do aumento da pressão sanguínea decorrente da desnutrição materna, demonstrando mais uma vez o potencial do SRA como uma das principais vias que levam a hipertensão arterial nos modelos de programação metabólica (Sherman & Langley-Evans, 2000).

É importante frisar que todos os componentes do SRAA participam do desenvolvimento renal e desempenham um importante papel na nefrogênese (Guron & Friberg, 2000). Por que dessa forma e, nesta linha, diversos trabalhos vêm associando os efeitos da programação metabólica sobre o SRAA e conseqüentemente na gênese da hipertensão. Estudos demonstram que a programação metabólica diminui a expressão dos componentes do SRAA durante o período da nefrogênese e que esta diminuição associa-se com uma redução no número de néfrons e hipertensão na vida adulta (Woods & Rasch, 1998; Woods *et al.*, 2001; Vehaskari *et al.*, 2004). Além disso, outros estudos sugerem uma interação entre glicocorticóides e o SRA intra-renal, outra alteração

observada na programação metabólica que será discutida a seguir e, que pode regular negativamente o SRAA na vida fetal, levando a um aumento da pressão sanguínea no adulto como resultado de respostas adaptativas originais que se tornaram definitivas (Celsi *et al.*, 1998).

Outro efeito da programação metabólica sobre o SRAA, não mais no período de nefrogênese e sim na vida adulta, é o desequilíbrio na expressão dos receptores de Ang II. É sugerido por recentes observações que animais expostos durante vida fetal à dietas com baixa proteína, apresentam um aumento na expressão do receptor AT₁, acompanhada da diminuição da expressão do receptor AT₂ (Mc Mullen *et al.*, 2003; Sahajpal & Asthon, 2003), sem que até o momento se soubesse quais seriam as conseqüências deste evento. Por sua vez, num outro interessante estudo, Bogdarina e colaboradores (2007) mostraram um aumento da expressão do receptor AT_{1b} na glândula adrenal de ratos que sofreram desnutrição protéica durante a gravidez, esse aumento que foi correlacionado com um menor grau de metilação da região promotora do gene, que levaria a um aumento na expressão do receptor. Esses autores propuseram que o aumento do receptor levaria a uma resposta aumentada da Ang II sobre a glândula adrenal, com conseqüente aumento da liberação de aldosterona.

O aumento dos níveis circulantes de aldosterona impacta seu principal alvo que são os receptores localizados nas células principais do túbulo contornado distal (Feraille & Doucet, 2001). O resultado da ativação de vias acopladas a estes receptores, conduz a três conjuntos de respostas com tempos de estabelecimento diferentes. As rápidas envolvem ativação (mediada por cinases) dos transportadores de Na⁺ presentes na membrana luminal; as intermediárias consistem principalmente no aumento do endereçamento de transportadores de Na⁺ (principalmente canais sensíveis a amiloride) para a membrana luminal e de unidades de (Na⁺+K⁺)ATPase para a membrana

basolateral. Finalmente, as respostas lentas são aquelas que envolvem um aumento da transcrição tanto de transportadores quanto de cópias de $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. Estes processos distais, de maneira convergente, contribuiriam para a expansão do fluido extracelular e estabelecimento de um quadro de hipertensão arterial.

Os efeitos vasoativos da Ang II, seus efeitos centrais (presóricos, na sede e no apetite para Na^+ e na secreção de ADH) e no sistema nervoso autônomo não serão abordados nesta, uma vez que o foco desta dissertação estará colimado para os efeitos de Ang II na Na^+ -ATPase do túbulo proximal, decorrentes da programação metabólica e seu possível impacto na expansão de volume e na gênese de hipertensão arterial.

1.4.4. Glicocorticóides

No início dos anos 90, foi proposto que haveria uma relação entre o aumento da exposição a glicocorticóides, nas janelas de desenvolvimento susceptíveis a programação metabólica (Figura 6) e a hipertensão arterial (Edwards *et al.*, 1993). Desde então, diversos trabalhos demonstram o papel da superexposição do feto a glicocorticóides maternos no disparo de eventos que programam a hipertensão arterial na vida adulta (Langley-Evans *et al.*, 1996; Lindsay *et al.*, 1996; Nyrienda *et al.*, 1998). Sob circunstâncias normais o feto é protegido do excesso de glicocorticóides pela atividade placentária da enzima 11β - hidroxesteróide desidrogenase do tipo 2 (11β -HD2), responsável pela conversão do cortisol a cortisona (forma inativa do hormônio). Entretanto, foi observado que durante a programação metabólica por desnutrição protéica, os ratos apresentam uma baixa expressão e atividade desta enzima, indicando que esses ratos são super-expostos ao hormônio (Bertram *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento com inibidores da síntese de glicocorticóides, de ratas que sofreram

desnutrição protéica durante a gravidez protege o feto da hipertensão arterial observada na vida adulta (Langley-Evans, 1997).

Há mais de 30 anos foi estabelecido que os glicocorticóides são reguladores potentes do crescimento e desenvolvimento fetal (Rheinisch *et al.*, 1978); porém aumentam a pressão arterial por aumentar a retenção de Na^+ e água (efeito mineralocorticóide) e por aumentar a sensibilidade dos vasos a hormônios vasoconstritores, com destaque para a Ang II (Whorwood *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado que ratos programados metabolicamente também apresentam um aumento na expressão de receptores para glicocorticóides (Bertram *et al.*, 2001). Recentes estudos sugerem que esse aumento pode estar relacionado com o padrão de metilação do DNA: observa-se que, no fígado e hipocampo ocorre uma diminuição da metilação em ilhas CpG da região promotora do gene que codifica para estes receptores, com conseqüente aumento da sua expressão (Weaver *et al.*, 2004). Em conjunto, esses dados dão suporte à hipótese de que a o excesso de glicocorticóides em janelas críticas do desenvolvimento, gerados pela programação metabólica, levam a o aumento da pressão sanguínea na vida adulta.

1.4.5. Manipulação renal de Na^+

No que diz respeito a possíveis alterações na manipulação renal de Na^+ provocadas pela programação metabólica, há poucos estudos. Dentre eles, pode ser mencionado o que mostra associação da programação metabólica pré-natal, por administração de dexametasona, com menor peso corporal e renal, menor número de néfrons, aumento da pressão sanguínea, albuminúria, diminuição da taxa de filtração glomerular, diminuição da excreção urinária de Na^+ e aumento do conteúdo tecidual de

Na^+ (Celsi *et al.*, 1998). De fato, a redução na excreção de Na^+ e a diminuição da taxa de filtração glomerular são indicadores da retenção de Na^+ . Adicionalmente, foi observado que ratos com restrição protéica materna durante a segunda metade da gravidez apresentam menor peso no nascimento, desenvolvimento de hipertensão arterial em 8 semanas de idade e significativo aumento na expressão dos co-transportadores de Na^+ , o simporter Na^+-Cl^- (TSC) e o simporter $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (BSC1) (Manning *et al.*, 2002).

Apesar de todos os estudos que permitiram propor o esquema de interações resumidos na Figura 13, ainda não é conhecido o efeito da programação metabólica sobre os mecanismos celulares e moleculares da reabsorção renal de Na^+ que poderiam levar à hipertensão arterial, uma vez que os estudos existentes não abordam o principal local onde acontece este processo, o túbulo proximal, nem os principais transportadores de Na^+ , a $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ e a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$. A hipótese de que estes transportadores poderiam ser afetados pela programação metabólica foi considerada para delinear os objetivos desta dissertação apresentados a seguir.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar a existência de alterações moleculares e celulares nos transportadores ativos primários de Na^+ nos túbulos proximais renais de animais programados pela desnutrição protéica durante a lactação.

2.2. Objetivos Específicos

1. Correlacionar parâmetros do crescimento corporal de ratos programados metabolicamente com a evolução da massa renal e o estabelecimento de alterações nos transportadores proximais de Na^+ no adulto jovem.
2. Investigar possíveis alterações na atividade destes transportadores e, no caso da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$, na sua expressão e localização na membrana basolateral de túbulos proximais.
3. Investigar alterações em etapas no ciclo de catalise das ATPases transportadoras de Na^+ , visando localizar pontos específicos afetados pela programação metabólica.
4. Estudar possíveis alterações regulatórias associadas a Ang II, hormônio essencial para homeostasia corporal de Na^+ .
5. Investigar a existência de alterações específicas nos receptores de Ang II (AT_1 e AT_2), bem como a influência da programação metabólica na formação/dissociação de heterodímeros destes receptores.

6. Estudar a influência nas proteínas G associadas a receptores AT₁, visando obter informações sobre um possível efeito da programação metabólica no acoplamento de elementos de vias de sinalização que tem como alvo as ATPases transportadoras de Na⁺.
7. Procurar alterações na expressão e na atividade de proteínas cinases C e A, elementos das mesmas vias de sinalização.
8. Propor um modelo integrador que aponte para alterações induzidas pela programação metabólica resultante da desnutrição protéica e ajude a compreender – ao menos parcialmente – como estas modificações poderiam ser marcadores de doenças e indicadores de risco cardiovascular na vida adulta.

3. Metodologia

3.1. Reagentes

Os reagentes Ang II, ATP, furosemida, ouabaína, calfostina, Hepes, Tris, Bis-Tris Propano, PMSF, inibidor de tripsina (tipo II-S), EDTA, histona H8, foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Todos os outros reagentes foram da mais alta pureza. Os anticorpos contra os receptores AT₁ (rabbit-policlonal IgG), AT₂ (rabbit-policlonal IgG) e Gq α (rabbit-policlonal IgG), foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). O anticorpo secundário anti-rabbit (NA934v5 BATCH 347890) foi adquirido da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Todas as soluções foram feitas com água deionizada, pelo Sistema Milli-Q de resinas (Millipore Corp., Marlboroug, MA). O ³²Pi foi obtido do Instituto Brasileiro de Energia e Pesquisas Nucleares (IPEN), São Paulo, Brasil. A membrana de nitrocelulose (Hybond), o kit ECLTM e o Hiper Film foram comprados da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK).

3.2. Modelo animal

Para o acasalamento foram utilizado ratos da linhagem Wistar machos e fêmeas com 3 a 4 meses de idade. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura ambiental controlada (22 ± 1 °C) e iluminação artificial controlada (fotoperíodo de 12 horas), com livre acesso à ração e água. O acasalamento foi realizado durante um período de 10 dias de convívio na mesma gaiola, na proporção de 3 fêmeas para 2 machos. Após a fecundação, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais, recebendo ração industrializada específica para ratos e água *ad libitum* durante todo o período de gestação. Para um melhor desenvolvimento

lactotrófico, após o nascimento foram separados, aleatoriamente, 6 filhotes machos por ninhada (Moura *et al.*, 1997). Esses filhotes foram amamentados por mães lactantes divididas em 2 grupos: 1) Grupo controle - mães que receberam dieta contendo 20% de proteína (PTN) durante todo o período de lactação; 2) Grupo desnutrido 8% - mães que receberam dieta contendo 8% de PTN durante todo o período de lactação (Figura 15). Ambas as dietas, contendo 20 ou 8% de PTN (caseína) e confeccionadas em nosso laboratório, seguiram as recomendações da AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993) sendo as mesmas diferenciadas apenas no conteúdo de proteínas e carboidratos, sendo isocalóricas e compostas pela mesma quantidade de vitaminas e sais minerais (Tabela 3). Ao final da lactação, ao 21º dia após o nascimento, os animais de cada grupo foram separados da mãe (desmame) dando origem aos 2 grupos experimentais, descritos a seguir, que foram o objeto de estudo durante o desenvolvimento da presente dissertação:

- 1) A prole controle: que foi amamentada por mães que se alimentaram com dieta contendo 20% de PTN no período de lactação.
- 2) A prole metabolicamente programada: que foi amamentada por mães que se alimentaram com dieta contendo 8% de PTN no período de lactação.

Esses dois grupos, após o desmame, foram mantidos em gaiolas separadas e todos foram alimentados com dieta industrializada específica para ratos (contendo quantidade igual de PTN - 20%) e água *ad libitum* até o sacrifício (60º dia de vida) (Figura 15). Todos os procedimentos envolvendo animais foram levados a cabo observando as recomendações sobre experimentação com animais do National Institute of Health (nº 85-23). Os protocolos, assim como o projeto no qual esta dissertação encontra-se inserida, foram aprovados pela Comissão de Avaliação da Utilização de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e do Centro de

Tabela 3. Componentes das dietas

Ingredientes (g/kg)	Grupo Controle	Grupo Desnutrido (8%)
Caseína	200,0	80,0
L-Cisteína	3,0	3,0
Amido	529,5	649,5
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja ¹	70,0	70,0
Celulose	50,0	50,0
BHT ²	0,014	0,014
Mistura de minerais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5

¹Óleo de soja: ml/kg; ²BHT: Tert-butylhydroquinona. Adaptado de Reeves *et al.*, 1993.

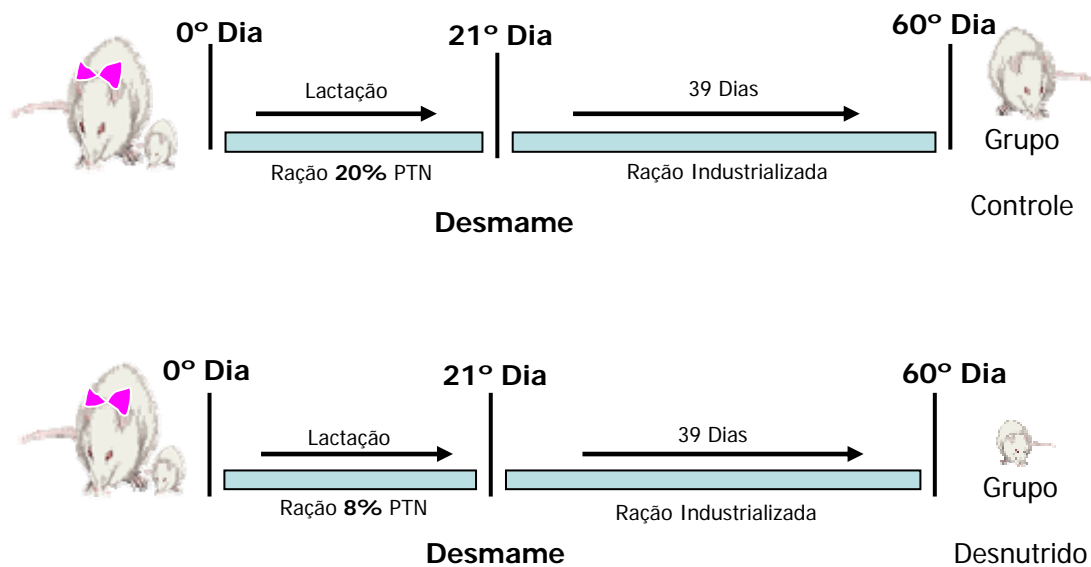


Figura 15. Modelo experimental. Os ratos utilizados para os experimentos provêm de dois grupos: mães que se alimentaram de uma ração controle (20% de proteína) e desnutrido (8% PTN), durante o período de lactação (0-21º dia após nascimento). Após esse período a prole oriunda de ambos os grupos alimentou-se de ração industrializada (Labina) contendo 20% de proteína, do vigésimo primeiro ao sexagésimo dia (dia do sacrifício, para mais detalhes ver texto). Adaptado de Passos *et al.*, 2000.

Ciências da Saúde da UFRJ após a instalação deste último.

3.3. Medida não invasiva da pressão arterial

Aos 60 dias de vida a pressão arterial foi medida pletismograficamente através do método de “tail-cuff” usando o aparelho Letica LE 5000 (Barcelona, Espanha) (Figura 16). Para essa determinação, os animais foram mantidos a 30-32 °C por 30 min para que as pulsações na artéria caudal fossem detectáveis. A pressão sanguínea e a frequência cardíaca foram aferidas de três a cinco vezes, em três dias diferentes e, a partir destas determinações, foram utilizadas as médias dos valores das pressões sistólica, diastólica e média, além da frequência cardíaca.

3.4. Obtenção de homogenato total e da fração de membranas de túbulos proximais de rins de rato

As preparações de homogenato total de córtex renal de rim e da fração de membranas foram obtidas como descrito por Vieyra e colaboradores (1986), com algumas modificações. Os rins foram retirados após o sacrifício e imediatamente colocados a 4 °C em solução isotônica tamponada contendo sacarose 250 mM, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM e inibidor de tripsina (tipo II-S) 0,15 mg/ml. Ainda banhados por esta solução, os rins foram dissecados e fatiados com um micrótomo Stadie-Riggs de lucite com navalha de aço, para retirar apenas a porção mais externa do córtex (*cortex-corticis*), composta principalmente de túbulos proximais (> 95 % da população celular; Whittembury & Proverbio, 1970; Proverbio & Del Castillo, 1981). Os cortes foram pesados (sem a solução), adicionando-se um volume da solução acima equivalente a quatro vezes a massa dos cortes (1 g de tecido para 4 ml de solução).

A



B

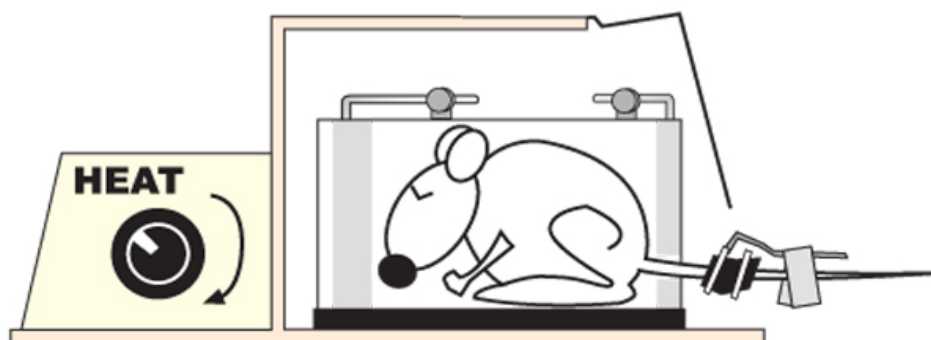


Figura 16. Aparelho para medida não invasiva da pressão arterial Leticia LE 5000. Os animais foram mantidos em uma câmara aquecida com um “cuff” e um sensor preso à cauda (B), os valores foram mensurados e registrados no aparelho (A). Retirado do site do fornecedor: <http://www.panlab.com>

As fatias dissecadas foram picadas e depois homogeneizadas usando um homogeneizador de vidro e bastão de teflon, separando uma alíquota do homogenato para as medidas posteriores. A suspensão foi então centrifugada a $1000 \times g$ durante 15 min a $4^\circ C$, numa centrífuga Sorvall RC-5B, empregando um rotor SS-34. Nesta primeira centrifugação as células não rompidas na homogeneização, os grandes fragmentos de membrana e os núcleos são descartados após a sua sedimentação. O sobrenadante foi centrifugado a $15000 \times g$ por 20 min nas mesmas condições anteriores, para sedimentar as mitocôndrias e os ribossomos. O sobrenadante, contendo fragmentos de membranas e fragmentos de retículo endoplasmático, foi novamente centrifugado numa ultracentrífuga Beckman L5-50B, utilizando um rotor tipo 70 Ti a $35000 \times g$ por 45 min. Nesta centrifugação sedimentam as membranas luminal e basolateral, em parte resseladas em vesículas (~10 % do total; Boumendil-Podevin & Podevin, 1983). O sedimento foi ressuspendido e homogeneizado suavemente em solução isotônica de sacarose 250 mM, dividido em tubos *ependorf* e estocados a $-20^\circ C$. Após terminada a preparação, a concentração de proteína da fração de membranas ou do homogenato total foi dosada através do método de Folin (Lowry *et al.*, 1951), colocando SDS 2,5% (peso/volume) para uma adequada solubilização das proteínas integrais das membranas.

3.5. Preparação do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

A síntese do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ foi realizada como descrito por Maia e colaboradores (1983). O procedimento consiste em promover a ligação covalente do ^{32}Pi (ortofosfato radioativo) ao ADP, formando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Para isso, são realizadas “*in vitro*” duas reações da via glicolítica: a da oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, com fosforilação concomitante por ^{32}Pi no carbono 1 para formar o 1,3-difosfoglicerato e a de transferência da fosforila marcada deste último composto para o ADP. As concentrações

dos reagentes e das enzimas envolvidas (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato cinase) foram escolhidas para garantir o deslocamento das reações (que “in vitro” envolvem pequenas variações de ΔG^0) no sentido favorável à formação do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

3.6. Atividade $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPásica}$

A atividade $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPásica}$ foi determinada medindo colorimetricamente o fosfato inorgânico (Pi), resultante da hidrólise do ATP (Tausky & Shorr, 1952). A atividade foi calculada pela diferença entre as determinações na ausência e na presença de 2 mM de ouabaína (inibidor específico da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$). O meio de reação continha (em mM): Bis-Tris-propano 50 (pH 7,4), EDTA 0,2, MgCl_2 5, NaCl 120 e proteína 0,1 mg/ml, exceto no experimento de afinidade por Na^+ e K^+ (onde as concentrações de Na^+ e K^+ variaram de forma inversa e complementar de 0 a 150 mM (Figura 24). As membranas foram pré-incubadas neste meio a 37 °C por 10 min para, no caso dos tubos contendo ouabaína, assegurar uma completa inativação da $\text{Na}^+\text{+K}^+\text{-ATPase}$. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de uma mistura de ATP (5 mM final) e KCl (24 mM final) e parada após 10 min pela adição de 1,5 volume de carvão ativado em HCl 0,1 N. O carvão ativado foi lavado com HCl (0,1 N) até estar livre da presença de Pi contaminante.

3.7. Atividade $\text{Na}^+\text{-ATPásica}$ insensível à ouabaína

A atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foi medida pela quantificação do (^{32}Pi) liberado resultante da hidrólise do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, como descrito por Caruso-Neves e colaboradores (2000). A atividade foi calculada pela diferença entre as determinações na ausência e na

presença de furosemide (inibidor da Na^+ -ATPase; 2 mM). O meio de reação continha (em mM): Hepes-Tris 20 (pH 7,0), ouabaína 2, MgCl_2 10, NaCl 120 e proteína 0,2 mg/ml. A reação foi iniciada pela adição de 5 mM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($\sim 1,7 \times 10^6$ cpm/nmol de ATP) e parada após 10 min com a adição de carvão ativado em HCl 0,1 N. O ^{32}Pi liberado foi medido empregando um contador de cintilação líquida Packard Tri-Carb 2100 TR.

A reação de atividade da Na^+ -ATPase na presença de Ang II foi iniciada pela adição de proteína, previamente incubada por 10 min com ouabaína. Com este procedimento a Ang II não é proteolisada pelas peptidases presentes tanto no homogenato total quanto nas frações de membrana, antes do início da hidrólise do ATP.

3.8. Atividade das proteínas cinases C e A

A atividade da PKC e PKA na fração de membranas foi medida pela quantificação da (^{32}P)fosforila γ -terminal do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ incorporada à histona. A reação foi iniciada pela adição de 10 μM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($\sim 6,6 \times 10^7$ cpm/nmol de ATP). O meio de reação continha Hepes-Tris 20 mM (pH 7,0), MgCl_2 4 mM, histona (H8) 1,5 mg/ml e proteína 0,7 mg/ml. A reação foi parada pela adição de TCA 40% (peso/volume), colocada em gelo e filtrada em filtro Millipore (0,45 μm de diâmetro de poro). Os filtros foram lavados com 8 ml de solução gelada de TCA 20% (peso/volume) e 9 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). A radioatividade incorporada à histona foi medida através de cintilação líquida como no caso da hidrólise do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. A atividade das cinases foi calculada a partir da diferença entre a reação na ausência e na presença de seus inibidores: calfofina C 10 nM (inibidor das formas clássicas e novel das PKC) e peptídeo (5-22) inibidor da PKA (PKAi) 10 nM.

3.9. SDS-PAGE e imunodeteccção

As proteínas presentes no homogenato total e na fração de membranas foram separadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com SDS, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo para a proteína de interesse. Para a imunodeteccção da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, dos receptores de Ang II, da PKA, da proteína $\text{Gq}\alpha$ e das diferentes isoformas de PKC foram usadas diluições de 1:500 (para os anticorpos primários) e 1:2500 (para o secundário). O anticorpo primário foi incubado com as membranas de nitrocelulose por 1 h, e essas lavadas com Tris 10 mM (pH 7,4) (TBS) 3 vezes por 5 min. Após a lavagem das membranas, elas foram incubada com o anticorpo secundário por 1 h. As proteínas e o padrão de peso molecular foram separados e transferidos para a membrana de nitrocelulose, corados com vermelho de *ponceau* para controle de carregamento e determinação de peso molecular, respectivamente.

3.10. Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi utilizada para detectar os receptores AT_1 e AT_2 presentes nas frações de membrana. Inicialmente, as frações de membranas (1 mg/ml de proteína) foram incubadas em uma solução contendo Chaps 0,01 % (volume/volume) durante 30 min. Em paralelo, 35 μl da solução estoque de proteína A foram centrifugados a $3300 \times g$ por 1 min, em uma centrifuga de tubos *ependorf* 5415R com rotor F45-24-11 (todas as centrifugações da imunoprecipitação foram feitas nesta centrífuga). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de TBS e lavado 3 vezes com esta mesma solução. O anticorpo primário para AT_1 ou AT_2 (7 μg) foi acrescentado à proteína A numa proporção de 1:1 (PA:anticorpo), agitando por 20 min, para depois adicionar 35 μl de uma solução contendo BSA (1 mg/ml) e

Chaps (0,01 %). Esse procedimento evita que a proteína A/agarose se ligue a outras proteínas de membrana além do anticorpo primário. Um volume de 10 µl desta solução contendo a proteína A bloqueada com anticorpo primário e BSA foram adicionados à fração de membranas, agitando a 4 °C da noite para o dia. O meio foi centrifugado a 1000 × g a 4 °C em uma centrífuga de mesa refrigerada e o sobrenadante foi separado do sedimento. No sobrenadante se encontra a fração de membranas sem os receptores AT₁ ou AT₂ (de acordo com o anticorpo primário usado) que precipitaram com o complexo proteína A/agarose. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 ml de TBS, centrifugado por 10 min a 16100 × g e, após descartado o sobrenadante, esse procedimento foi repetido três vezes, sendo a terceira centrifugação de apenas 4 min para permitir a formação de um sedimento pouco compactado. Após a adição de 40 µl de tampão de amostra, as suspensões eram incubadas a 100 °C por 4 min para desligar a proteína A do anticorpo e do receptor e, a seguir, centrifugadas a 16100 × g por 2 min a 4 °C na mesma centrífuga (para sedimentar as partículas de proteína A/agarose), recolhendo finalmente 40 µl do sobrenadante contendo o receptor e o anticorpo (que não interagem mais devido à presença do detergente no tampão de amostra). Após esses procedimentos foi feita uma eletroforese seguida de imunodeteção (como descrito anteriormente), aplicando 40 µl no poço do gel de poliacrilamida tanto do imunoprecipitado como do sobrenadante (controle da eficiência da imunoprecipitação). Para a imunodeteção dos heterodímeros AT₁/AT₂ e AT₂/AT₁ foram utilizadas as mesmas proporções dos anticorpos citados acima. Entretanto, o imunoprecipitado do receptor AT₁ foi incubado com o anticorpo anti-AT₂ e o imunoprecipitado do receptor AT₂ foi incubado com o anticorpo anti-AT₁.

3.11. Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software Graphpad Prism[®] 4. Para analisar duas médias, os resultados foram submetidos ao test-t de Student. Para a comparação de mais de duas médias os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando era detectada diferença entre as médias, foi utilizado o pós-teste de Tukey. A significância estabelecida para diferença estatística foi de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

Diversos estudos têm demonstrado que a gestação e/ou lactação são períodos críticos para o desenvolvimento e que a desnutrição, atuando nessas fases, pode resultar em alterações bioquímicas, celulares e moleculares que contribuem para o estabelecimento de condições para o surgimento de doenças crônicas na vida adulta. O fenômeno descrito acima se denomina programação metabólica (Barker, 1993, 1994, 1997, 2002; Waterland & Garza, 1999). Durante vários anos o principal objetivo de muitos autores foi analisar os efeitos da programação metabólica nos períodos de gestação ou gestação e lactação (Barker, 1993, 1994, 1997, 2002; Waterland & Garza, 1999; Kumarasamy *et al.*, 2005; Fowden *et al.*, 2006; Fernandez-Twinn *et al.*, 2006). Entretanto, poucos estudos focaram na avaliação da desnutrição somente durante o período da lactação, visto que esse é um período crucial de desenvolvimento para o estabelecimento da programação metabólica em mamíferos.

No modelo experimental utilizado nesta dissertação, as ratas (mães) submetidas à desnutrição protéica durante o período de lactação, com o objetivo de programar metabolicamente sua prole, apresentaram uma redução estatisticamente significativa no consumo alimentar a partir do 15º dia em relação às ratas controle ($31,3 \pm 0,3$ vs $37,9 \pm 0,6$ g; $29,9 \pm 1,1$ vs $43,8 \pm 1,7$ g; mães desnutridas e mães controle aos 15 e 21 dias, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 17). Lisboa e colaboradores (2005) demonstraram que ratas (mães) alimentadas com uma dieta de restrição protéico-energética durante a lactação apresentaram menor peso corporal e menor ingestão alimentar até o dia do desmame de sua prole, corroborando nossos resultados. Nesse mesmo estudo observaram-se também as concentrações séricas de leptina e prolactina. A associação entre leptina e prolactina baseada na evolução de ambos os hormônios durante a gestação e a lactação de mães alimentadas de forma “normal” está bem estabelecida (Mukherjea *et al.*, 1999). Esses dois hormônios desempenham um importante papel

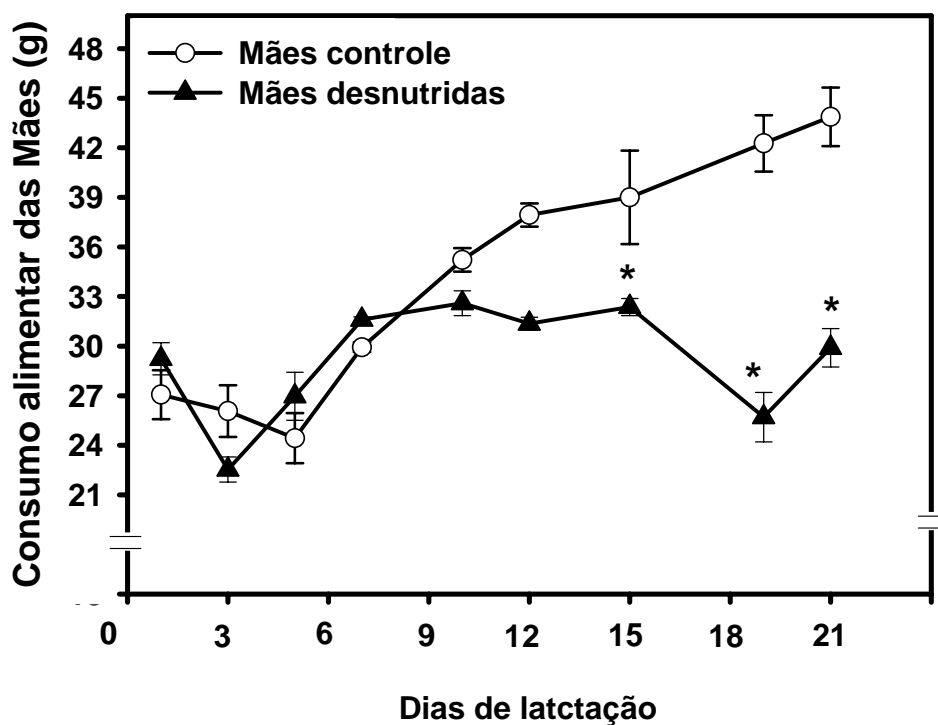


Figura 17. Consumo alimentar das mães controle e desnutridas. O consumo alimentar das ratas (mães) que ingeriram dieta controle (20% de PTN) ou hipoproteica (8% de PTN) foi medido do 1º ao 21º dia de vida de seus filhotes – período de lactação (n = 10 mães controle; n = 10 mães desnutridas). Os valores são expressos em média ± EPM. *: diferença estatisticamente significativa de mães desnutridas em relação a mães controle ($p < 0,05$).

no consumo alimentar e na evolução do peso corporal durante a fase de lactação das mães, com níveis de leptina sérica (hormônio com ação anorexígena) diminuídos e níveis de prolactina (hormônio com ação orexígena) aumentados. Esse perfil hormonal permite a redução da taxa metabólica basal e o aumento do consumo alimentar das lactantes favorecendo uma melhor lactogênese (Mukherjea *et al.*, 1999). O que se observou nas mães desnutridas foi um aumento de leptina e uma diminuição de prolactina séricas (Lisboa *et al.*, 2005). Esta inversão na concentração sérica dos hormônios é a que pode levar a um menor consumo alimentar, com conseqüente diminuição do peso corporal por uma maior ação da leptina e concomitante diminuição da ação da prolactina. A diminuição da lactogênese, com repercussão na alimentação da prole, seria o fator responsável pela programação metabólica desta durante a lactação.

Apesar do modelo experimental utilizado na presente dissertação ser diferente do utilizado por Lisboa e colaboradores (2005), pode-se sugerir que o mesmo desequilíbrio hormonal entre leptina e prolactina observado por ela aconteça em nosso modelo, levando a diminuição da ingestão alimentar observada nas mães desnutridas durante a lactação. Isso se deve ao fato de que apesar do modelo experimental utilizado nesta dissertação consistir somente de restrição protéica, uma concomitante redução calórica pode também acontecer. Esta hipótese se apóia nos resultados da Figura 17, onde se observa que as ratas (mães) que sofreram desnutrição protéica apresentam uma redução significativa na ingestão alimentar a partir do 15º dia e cada vez mais acentuada, em relação ao controle, até o final da lactação. Assim, a diminuição do consumo alimentar levou a uma restrição energética, além de protéica, que se instalaria e continuaria ao longo da segunda metade da lactação.

Com relação aos filhotes, os ratos programados metabolicamente apresentaram uma redução significativa do consumo alimentar em relação aos ratos controle ($5,5 \pm 0,2$ vs $8,2 \pm 0,2$ g no 5º dia após o desmame e $20,4 \pm 0,2$ vs $25,6 \pm 0,3$ g no dia do

sacrifício; programados e controle respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 18). A prole programada também apresentou uma diminuição significativa do peso corporal ($71,6 \pm 2,8$ vs $115,4 \pm 2,7$ g no dia do desmame e $276,6 \pm 7,4$ vs $337,2 \pm 5,9$ g no dia do sacrifício; programados e controle respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 19). A trajetória completa da evolução ponderal dos filhotes a partir do desmame até o sacrifício pode ser descrita pela equação:

$$MC_t = MC_d + MC_{\max} (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Eq. 1}) \quad (\text{Costa-silva } et al., 2009)$$

onde MC = massa corporal no tempo “t” após o desmame; MC_d = massa corporal no dia desmame; MC_{\max} = massa corporal máxima no adulto jovem; k = constante de velocidade de ganho de massa corporal em dias⁻¹; t = tempo em dias após o desmame foi utilizada para calcular os parâmetros de crescimento corporal que são apresentados na Tabela 4. Nessa tabela pode-se observar que os ratos programados metabolicamente apresentam uma diminuição na constante de velocidade de ganho de massa corporal ($0,0204 \pm 0,0014$ vs $0,0357 \pm 0,0034$ dias⁻¹; programados e controle respectivamente; $p < 0,001$), com aumento do tempo médio ($T_{1/2}$, calculado a partir da relação $\ln 2/k$) para alcançar o valor assintótico da massa corporal máxima quando comparados com grupo controle ($36,8 \pm 2,5$ vs $20,7 \pm 1,4$ dias, programados e controle respectivamente; $p < 0,001$). A diferença nos valores de MC_{\max} , calculada empregando a função acima ($494,0 \pm 27,2$ vs $438,2 \pm 22,5$ g, programados e controle respectivamente), não se mostrou estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando o cálculo se faz acompanhando a evolução ponderal até a idade adulta. Este padrão de evolução ponderal difere daquele recentemente observado em nosso laboratório – em colaboração com o Departamento de Fisiologia da UFPE – com um modelo de desnutrição crônica, no qual os filhotes de mães alimentadas normalmente durante a gestação e a lactação são submetidos a uma dieta multicarenciada (incluindo proteína a 8%) após o desmame

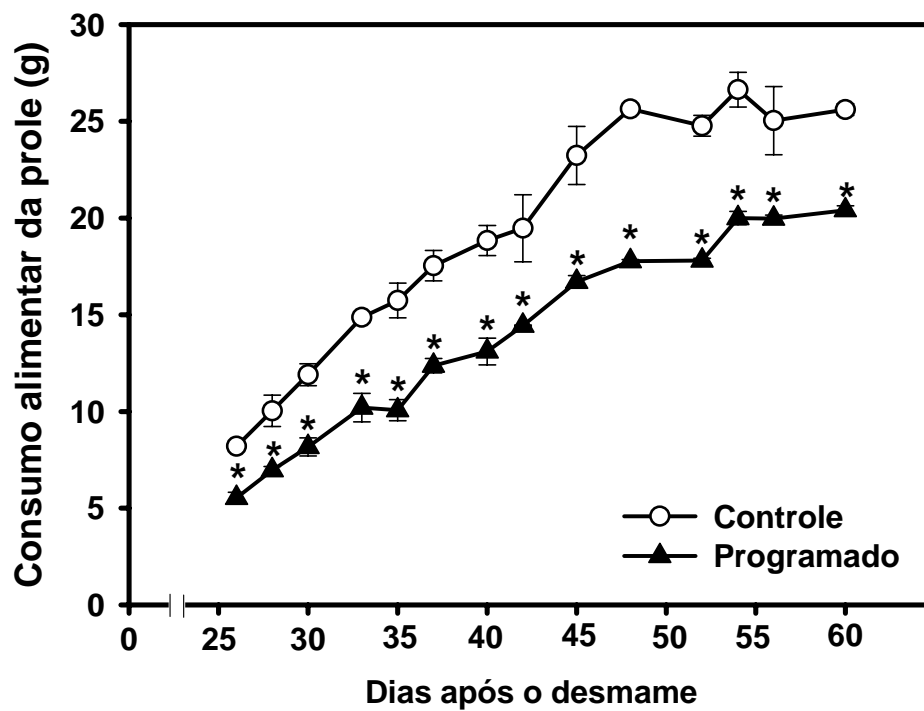


Figura 18. Consumo alimentar dos ratos controle e programados. O consumo alimentar foi medido do 26° dia de vida (semana do desmame) ao 60° dia (sacrifício) (n = 18 programados; n = 14 controles). Os valores são expressos em média ± EPM. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle. (p < 0,05).

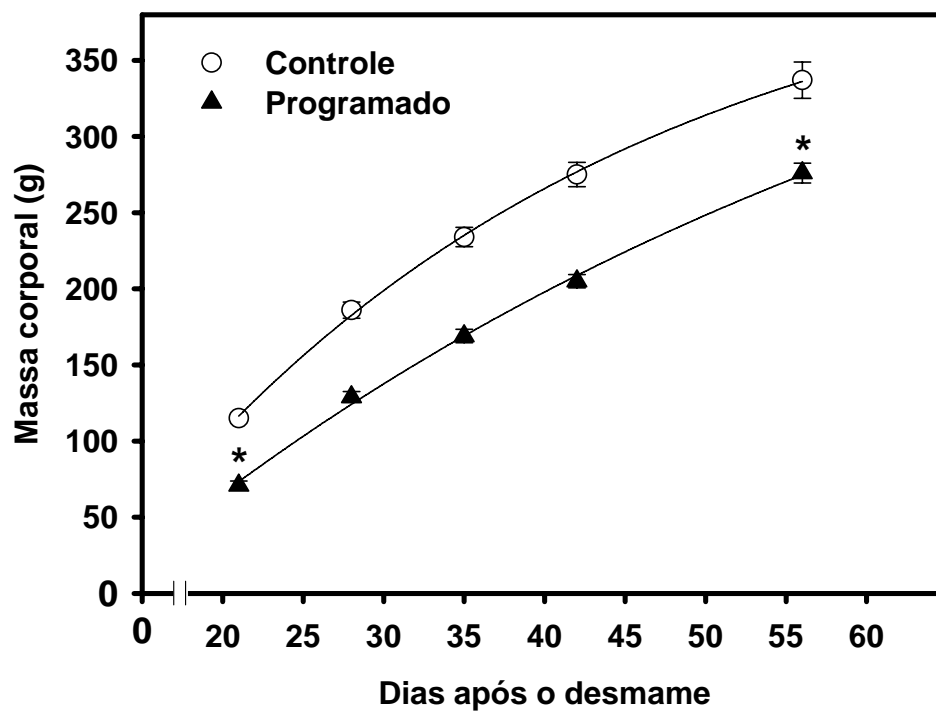


Figura 19. Massa corporal absoluta dos ratos controle e programados. O massa corporal foi medida do 21º dia de vida (desmame) ao 60º dia (sacrifício) (n = 18 programados; n = 14 controles). Os valores são expressos em média \pm EPM. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle. ($p < 0,05$).

Tabela 4. Parâmetros da trajetória de crescimento (ganho de massa corporal) em ratos controle e programados.

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo programado
MC_d^1	$115,5 \pm 2.7$	$71,6 \pm 2.8^*$
MC_{max}^2	$438,2 \pm 22.5$	$494,0 \pm 27.2^{NS}$
k^3	$0,03575 \pm 0,0034$	$0,0204 \pm 0,0014^*$
$T_{1/2}^4$	$20,7 \pm 1.4$	$36,8 \pm 2.5^*$

¹ Massa corporal no desmame (dados experimentais em gramas, média \pm EPM);

² Valor assintótico da função que descreve a evolução da massa corporal após o desmame (média \pm EPM) obtidos empregando a Equação 1;

³ Constante do ganho de massa corporal (em dias⁻¹) obtida empregando a Equação 1;

⁴ Metade do tempo necessário para alcançar o valor assintótico da massa corporal (em dias) calculado através da $\ln 2/k$;

* : $P < 0,001$; ^{NS} = Diferença não significativa em relação ao controle.

(Costa-Silva *et al.*, 2009; anexo 1). A manutenção de uma massa corporal diminuída na idade adulta nos ratos cronicamente desnutridos talvez seja devida ao fato do crescimento ser completado precocemente (Costa-Silva *et al.*, 2009). Embora as alterações nos transportadores renais de Na^+ – incluindo a resposta a Ang II – nos filhotes adultos cronicamente desnutridos e nos filhotes programados durante a lactação possam ser comparáveis, as origens destas alterações parecem ser diferentes. No presente trabalho, elas resultam de programação ocorrida numa etapa precoce e chave do crescimento, enquanto que, no modelo empregado por Costa-Silva e colaboradores, as alterações parecem resultar de um insulto metabólico que persiste e se estende até a vida adulta.

Essa redução na massa corporal da prole nas etapas iniciais de vida é uma clássica característica observada nos diferentes modelos de programação metabólica por desnutrição protéica (Vicente *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2008) que podem levar, em longo prazo, a diferentes alterações em diferentes sistemas, órgãos e tecidos com alterações hormonais variadas, complexas e correlacionadas. Em relação à proporção entre massa corporal e consumo alimentar, o presente estudo revela uma diferença significativa entre os ratos programados e os ratos controle que persistiu ao longo do período de análise ($0,04 \pm 0,01$ vs $0,11 \pm 0,05$ no dia do desmame; $0,05 \pm 0,003$ vs $0,08 \pm 0,002$ no 60º dia, Programado e controle respectivamente) (Figura 20), mostrando que os ratos programados comem inicialmente menos não porque são menores, e sim porque foram programados para se alimentarem desta forma. E esta programação pode envolver aumento nas concentrações plasmáticas de leptina, uma vez que, mesmo com massa corporal diminuída, as mães desnutridas submetidas à desnutrição protéica durante a lactação apresentam gordura visceral preservada e, portanto, um maior percentual de gordura corporal (Lisboa *et al.*, 2005).

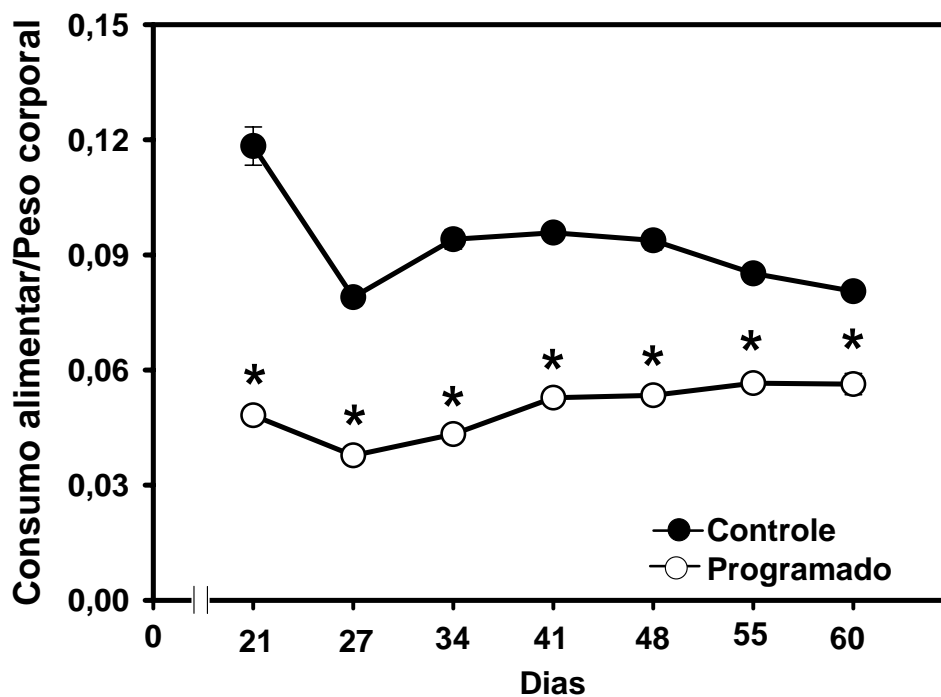


Figura 20. Razão do consumo alimentar pela massa corporal dos ratos controle e programados. A relação foi calculada dividindo o consumo alimentar médio pela massa corporal de cada rato durante as semanas de vida do desmame ao sacrifício (n = 18 programados; n = 14 controles). Os valores são expressos em média \pm EPM. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle ($P < 0,05$).

Com relação à leptina nas fases iniciais da vida, alguns trabalhos demonstram que a prole programada metabolicamente por desnutrição protéica na lactação exibe um aumento na concentração do hormônio até o desmame (Teixeira *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2008). Sugere-se que a hiperleptinemia da prole até o desmame, deve-se ao fato de que as mães lactantes apresentam um aumento na concentração sérica de leptina (Lisboa *et al.*, 2005) e a mesma é transferida para sua prole através do leite (Xésus *et al.*, 1997) agindo possivelmente como um modulador metabólico, sinalizando o status nutricional materno para os filhotes, levando a uma diminuição na ingestão alimentar e peso corporal nas fases iniciais da vida (Vicente *et al.*, 2004; Lisboa *et al.*, 2005). Como consequência da superexposição a leptina na fase lactacional, ratos programados desenvolvem resistência hipotalâmica ao hormônio na vida adulta (150 dias) (Passos *et al.*, 2004), permitindo-lhes não apenas alcançar uma massa corporal comparável à da prole normal (Tabela 4) como possivelmente transitar para a obesidade (Ahima *et al.*, 1996; Shingal *et al.*, 2002).

No presente estudo, o sobrepeso projetado para os ratos programados no âmbito de validade da função empregada (que descreve o crescimento até a idade adulta, Tabela 4) pode ser indicativo de uma tendência que poderá se acentuar em idades tardias, como observado em estudos epidemiológicos em desnutrição humana (Shingal *et al.*, 2002) e em modelos experimentais de programação metabólica (Cravo *et al.*, 2002). A obesidade, com frequência, coexiste com alterações hormonais que podem alcançar o eixo renina/angiotensina, uma vez que uma clara correlação entre obesidade e hipertensão essencial tornou-se evidente na última década (para uma visão global ver Díaz, 2002), tendo como um dos mecanismos associados o aumento da reatividade vasoconstritora à Ang II (Stepp *et al.*, 2007), hormônio que também aumenta no tecido renal na obesidade (Hall *et al.*, 2001). Este ponto será retomado posteriormente ao

apresentar e discutir os resultados da resposta alterada a Ang II por parte da Na⁺-ATPase de túbulos proximais.

A diminuição da massa corporal, aos 60 dias, dos ratos programados teve repercussão na massa renal. A massa renal apresentou uma diminuição significativa – embora pequena 16-18% – nos ratos programados quando comparados com os controles ($2,4 \pm 0,05$ vs $2,9 \pm 0,07$ g; programados e controle respectivamente, $p < 0,001$) (Figura 21), acompanhando a diminuição que se observou na massa corporal total no dia do sacrifício. A proporção entre massa renal total e massa corporal (Índice Renal), não mostrou diferença significativa entre os grupos ($6,9 \pm 0,08$ mg/g vs $7,2 \pm 0,1$ mg/g $p > 0,05$, para ratos programados e controle, respectivamente) (Figura 22), indicando que a desnutrição materna afetou as trajetórias de crescimento corporal e renal de maneira semelhante, como visto em outros modelos de programação metabólica (Sahajpal & Ashton, 2005; Hoppe *et al.*, 2007) e também na desnutrição crônica (Costa-Silva *et al.*, 2009). Todavia, em nível tissular e celular, rins menores em animais desnutridos em diferentes momentos do crescimento, mesmo que acompanhando o tamanho corporal, pode apresentar importantes alterações morfofuncionais como diminuição no número de néfrons – mais acentuada que a redução da massa tissular –, hipertrofia glomerular, diminuição do ritmo de filtração glomerular e até incipiente glomeruloesclerose (Paixão *et al.*, 2001; Nejad *et al.*, 2006). Em recente trabalho (Costa-Silva *et al.*, 2009) mostramos que alterações funcionais “escondidas” atrás de uma aparente normalidade funcional – e de um Índice Renal preservado –, podem constituir as primeiras manifestações de disfunção renal tardia em estágios posteriores do desenvolvimento. Ainda, esta equivalência em massa pode não implicar, em nível molecular, em preservação da atividade específica de importantes sistemas de transporte transtubular de íons ou de enzimas-chave em redes sinalizadoras que participam da regulação de eventos de transporte transepitelial.

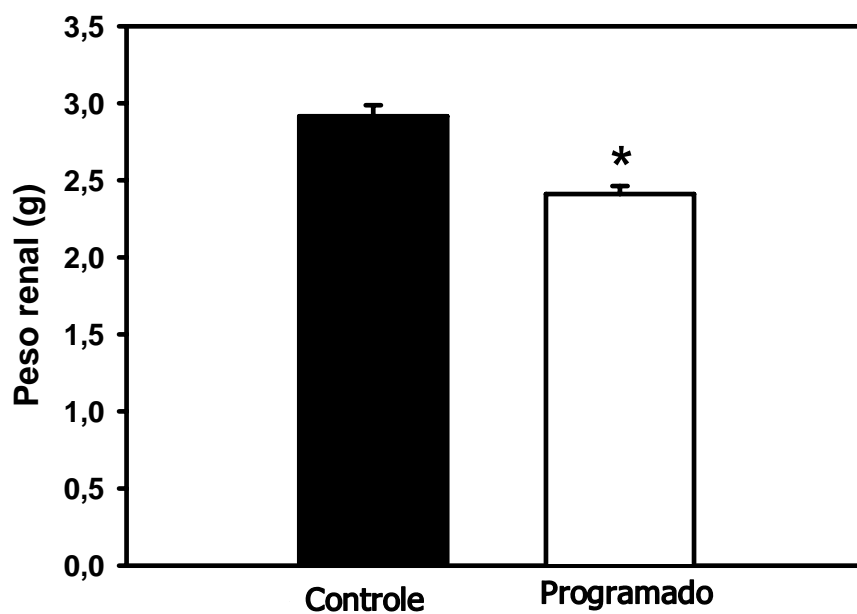


Figura 21. Peso renal dos ratos controle e programados. O peso renal dos ratos foi medido no 60º dia de vida (sacrifício) (n = 18 programados; n = 14 controles). Os valores são expressos em média ± EPM. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (p < 0,05).

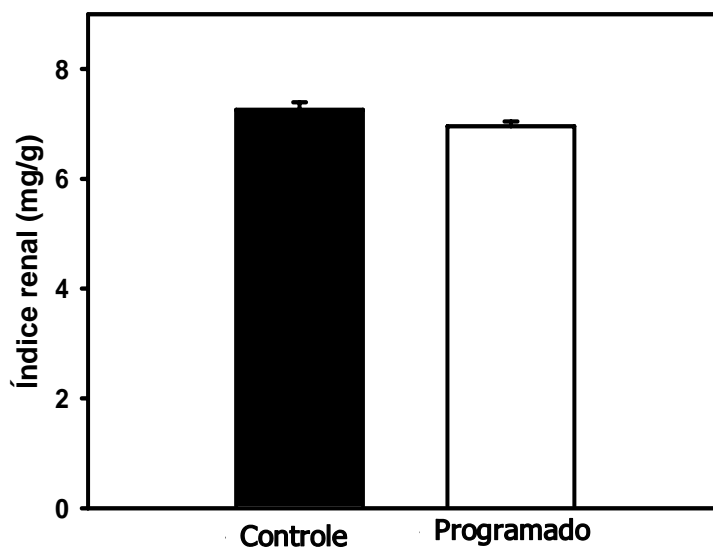


Figura 22. Índice renal dos ratos controle e programados. A razão entre o peso renal e a massa corporal dos ratos (índice renal) foi calculada dividindo o peso renal úmido pela massa corporal no 60º dia (sacrifício) (n = 18 programados; n = 14 controles). Os valores são expressos por média \pm EPM. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle ($p < 0,05$).

Alterações renais podem mudar em diferentes momentos da vida juvenil de ratos programados e afetar de maneira diferente, transportadores diversos, receptores hormonais e enzimas de redes de sinalização (Vieira-Filho *et al.*, 2009; anexo 2).

Esta visão de que em rins menores de maneira proporcional à massa corporal podem ser encontradas alterações significativas em transportadores tubulares é reforçada inicialmente pelos resultados que mostram profundas alterações no comportamento da principal maquinaria molecular responsável pela reabsorção em massa do Na^+ filtrado nos glomérulos, a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Figuras 23-25). Estes primeiros experimentos foram delineados para investigar, ao mesmo tempo, (i) possíveis alterações na capacidade máxima de transporte ativo de Na^+ acoplado à K^+ (medindo a hidrólise de ATP que sustenta energeticamente esse transporte), (ii) afinidade aparente para Na^+ e (iii) afinidade aparente para K^+ , variando as concentrações destes íons de forma inversa e complementar, de maneira a manter constante a sua concentração total em torno de 150 mM, aproximadamente igual à soma com proporções variáveis dos dois íons, encontrada nos diferentes compartimentos líquidos de tecidos de mamíferos (Pitts, 1968). As Figuras 23 e 24 mostram um aumento em torno de 35-40% na atividade $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$ máxima do grupo programado em relação ao controle, medida nas combinações de concentrações 70 mM Na^+ / 80 mM K^+ ; 100 mM Na^+ / 50 mM K^+ ; 120 mM Na^+ / 30 mM K^+ ; 140 mM Na^+ / 10 mM K^+ ; 145 mM Na^+ / 5 mM K^+ ; 148 mM Na^+ / 2 mM K^+ . Este aumento, no entanto, não é acompanhado de mudanças de afinidade aparente para Na^+ , que é semelhante nos dois grupos ($\text{Na}^+_{0.5} \approx 35$ mM) e próxima à concentração intracelular de Na^+ medida em túbulos proximais com diferentes métodos (Kleinzeller & Janeck, 1962; Kumar *et al.*, 1986). Em contraste, a medida da afinidade aparente para K^+ (Figura 25) revela um acentuado aumento nos animais programados ($\text{K}^+_{0.5} < 2$ mM) em relação ao

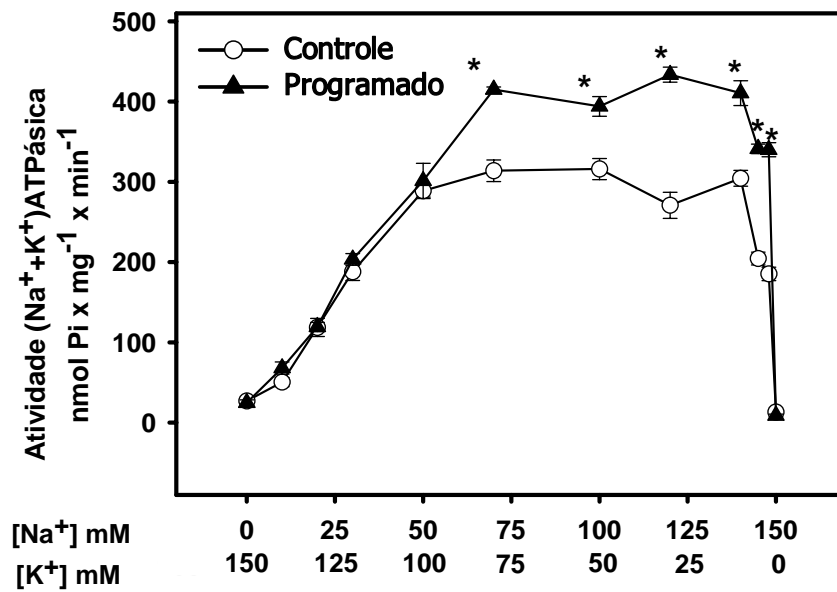


Figura 23. Medida da atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica na fração de membrana basolateral de túbulos proximais dos ratos controle e programados. As atividades foram medidas como descrito na Metodologia. As concentrações de Na⁺ e K⁺ variaram de forma inversa e complementar, mantendo a sua soma em 150 mM. Os valores são expressos em nmol Pi × mg⁻¹ × min⁻¹ (média ± EPM) (n = 5 programados; n = 6 controles). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05).

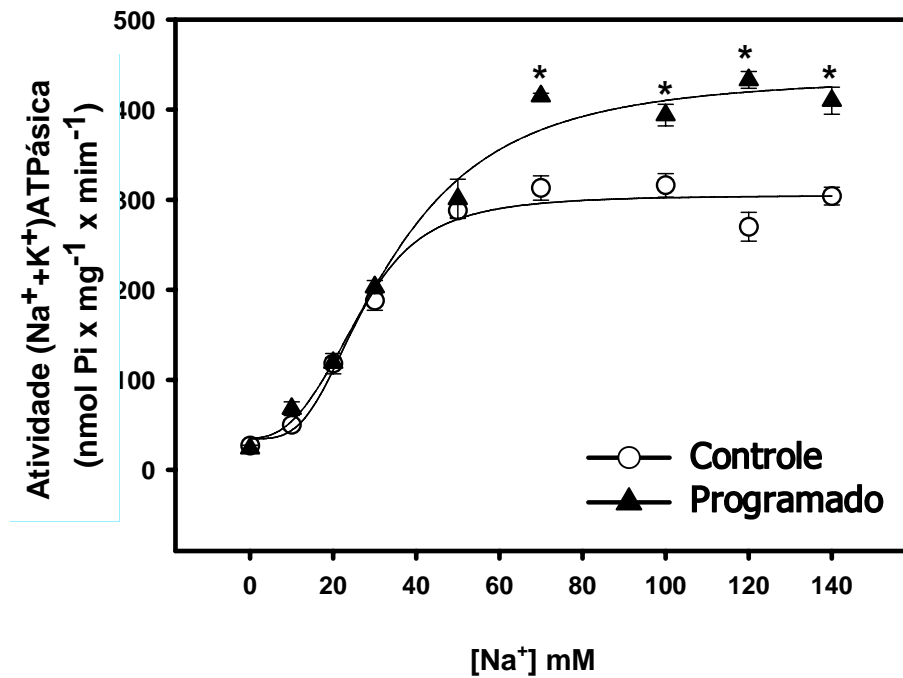


Figura 24. Ativação da (Na⁺+K⁺)ATPásica por concentrações crescentes de Na⁺ e afinidade aparente por Na⁺. Os valores da atividade (controle e programado) mostrados na Figura 23 foram regraficados em função das concentrações de Na⁺ entre 0 (contaminante) e 140 mM. A função que melhor se ajustou aos pontos experimentais ($r^2 = 0,993$ para controle; $r^2 = 0,994$ para o grupo desn. 8%) é a seguinte: $v = V_o + \{(V_{\max} \times [Na]^n)/(Na_{0,5}^n + [Na]^n)\}$. Os valores dos parâmetros cinéticos calculados (V_o , V_{\max} , $Na_{0,5}$ e n_{Na}) são apresentados na Tabela 5 cuja legenda indica o significado de cada parâmetro. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programado e o controle ($P < 0,05$).

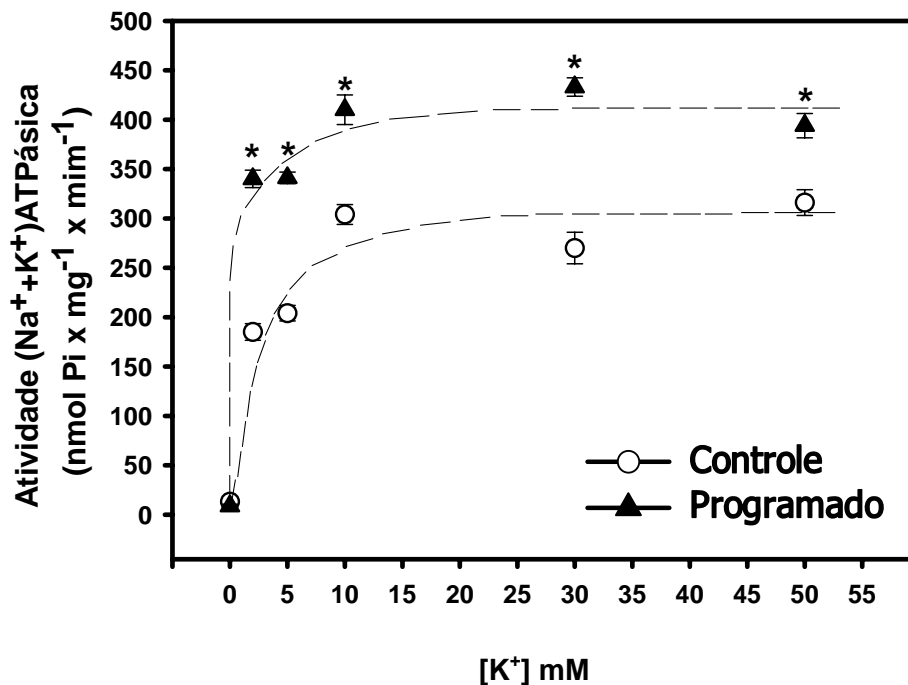


Figura 25. Ativação da (Na⁺+K⁺)ATPásica por concentrações crescentes de K⁺ e afinidade aparente para K⁺. Os valores de atividade (controle e programado) mostrados na Figura 23 foram regraficados em função das concentrações de K⁺ entre 0 (contaminante) e 50 mM. O rápido aumento da atividade já com a primeira concentração de K⁺ ensaiada até o momento de (2 mM), não permite calcular acuradamente K⁺_{0,5}. Apesar das primeiras tentativas de ajuste indicarem uma hipérbole retangular (macaeliana) como sendo a função mais adequada, as curvas ajustadas aos pontos experimentais foram traçadas a mão. Os valores dos parâmetros cinéticos estimados (V_{\max} e $K_{0,5}$) são apresentados na Tabela 5. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle ($P < 0,05$).

controle ($K^{+}_{0.5} \approx 5 \text{ mM}$) que exibe a afinidade usual para os sítios de ligação de K^{+} voltados para o meio extracelular (Tabela 5). Estes últimos resultados mostram que, ao contrário do que ocorre nos ratos controle, a programação afeta os filhotes de mães desnutridas na etapa do ciclo em que o K^{+} acelera a quebra do intermediário fosforilado durante o ciclo de catálise (Figura 11), de modo tal que a $(Na^{+}+K^{+})ATPase$ já se encontra maximamente ativada em concentrações normais de K^{+} plasmático. Esta ativação pode ser o resultado de vários mecanismos que, inclusive poderiam interagir de modo redundante e não excludente em nível da própria molécula de ATPase, em nível do seu entorno lipídico, em nível de expressão da ATPase e em nível do seu endereçamento para a membrana basolateral.

Níveis de expressão modificados e alterações nas propriedades catalíticas poderiam estar associados para induzir as alterações mostradas nas Figuras 22-25 para os animais programados. McDonough e colaboradores (1988) mostraram que hormônios tireoideanos regulam de maneira diferencial a expressão das diferentes subunidades da $(Na^{+}+K^{+})ATPase$, estimulando a expressão da subunidade α (nas suas diferentes isoformas) em tecido muscular cardíaco (α_1) e esquelético (α_1) e da subunidade β em tecido renal. Esta observação poderia explicar o extraordinário aumento da afinidade aparente por K^{+} (Figuras 23 e 25), uma vez que esta subunidade – de funções desconhecidas por vários anos – parece desempenhar um papel fundamental na modulação da afinidade da ATPase para K^{+} (Jaisser *et al.*, 1994) e, acelerando desta forma a etapa da defosforilação (Figura 11), contribuir para o aumento observado na velocidade de hidrólise (Figuras 23-25). O aumento dos níveis plasmáticos do hormônio tireoideano observados na programação metabólica por desnutrição protéica na lactação, persistentes ao longo da vida do animal adulto jovem (Vicente *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2008), poderiam constituir uma das bases hormonais para o aumento da atividade da $(Na^{+}+K^{+})ATPase$ de túbulos proximais.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da ativação da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ por Na^+ e K^+ nos grupos controle e programado.

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Programado
$V_{\max, \text{Na}}$	270,3 ¹	402,4 ¹
$\text{Na}^+_{0,5}$	26,2 ²	35,4 ²
n_{Na}	3,4 ³	2,4 ³
$V_{o, \text{Na}}$	34,5 ⁴	35,4 ⁴
$V_{\max, \text{K}}$	296,7 ⁵	412 ⁵
$\text{K}^+_{0,5}$	$\approx 4^6$	$< 2^7$
$V_{o, \text{K}}$	13,0 ⁸	8,8 ⁸

¹ V_{\max} obtida da curva de ativação por Na^+ (Figura 24) em $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, ajustada aos pontos experimentais empregando a equação descrita na legenda da Figura 24;

² Concentração de Na^+ (mM) necessária para atingir $V_{\max}/2$ na curva de ativação por Na^+ (Figura 24), calculada empregando a equação descrita na legenda da Figura 24;

³ Coeficiente de Hill calculado empregando a equação descrita na legenda da Figura 24;

⁴ Velocidade na ausência de Na^+ (contaminante) em $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, obtida da curva de ativação por Na^+ (legenda da Figura 24);

⁵ V_{\max} obtida a partir dos valores experimentais de atividade (em $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) nas concentrações 10, 20 e 30 mM de K^+ (Figuras 23 e 25);

⁶ Concentração de K^+ (mM) necessária para atingir $V_{\max}/2$ na curva de ativação por K^+ no grupo controle (Figura 25), estimada a partir da curva traçada a mão;

⁷ O rápido aumento da atividade, aproximando-se da saturação com 2 mM de K^+ (Figura 25), não permite calcular qualquer valor abaixo desta concentração;

⁸ Valores experimentais (em $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) de atividade sem K^+ adicionado (Figura 23).

Mudanças na afinidade para outro substrato da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, o ATP, foram também induzidas por hormônios tireoideanos (Katyare *et al.*, 2007). Merece destaque o fato de que o aumento observado na velocidade de hidrólise no componente regulatório de baixa afinidade da curva de ATP, encontra-se associado a uma diminuição dos níveis de colesterol na membrana dos microsomas obtidos a partir de tecido renal que – ao aumentar a fluidez da bicamada lipídica – favoreceria os movimentos espaciais dos domínios funcionais da ATPase que ocorrem durante a catálise (Figura 11) e que aceleram a catálise. O componente regulatório de baixa afinidade, que estimula a quebra do intermediário fosforilado formado durante o ciclo da catálise, desaparece quando a tireóide é removida e é recuperado com a substituição hormonal (Katyare *et al.*, 2007).

A Figura 26 mostra um ensaio de atividade $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPásica}$ em homogenato total e na preparação de membranas, realizado em concentrações saturantes de Na^+ e K^+ para evitar interferências de efeitos de afinidade, para avaliar o possível estímulo da migração de cópias da bomba do citosol, após a sua síntese, para seu endereço na membrana basolateral. Em ambas as preparações a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ foi significativamente maior no grupo programado do que no controle ($81,0 \pm 9,3$ vs $52,5 \pm 5,0$ $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ no homogenato; $418 \pm 31,4$ vs $200,0 \pm 41,0$ $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ na fração enriquecida de membranas basolaterais). Todavia, o aumento na fração de membrana ($\approx 100\%$) foi maior do que no homogenato ($\approx 60\%$) o que levou a postular que haveria um aumento na expressão e no trânsito das subunidades da ATPase para a membrana basolateral, um fenômeno que também ocorre na presença de níveis aumentados de hormônios tireoideanos (Katyare *et al.*, 2007). Esta hipótese foi corroborada com os experimentos que mostraram que essa diferença, de aproximadamente 40%, é semelhante ao aumento encontrado ($\approx 35\%$) nos experimentos de imunodeteção da subunidade $\alpha 1$ – a isoforma constitutiva em túbulos renais

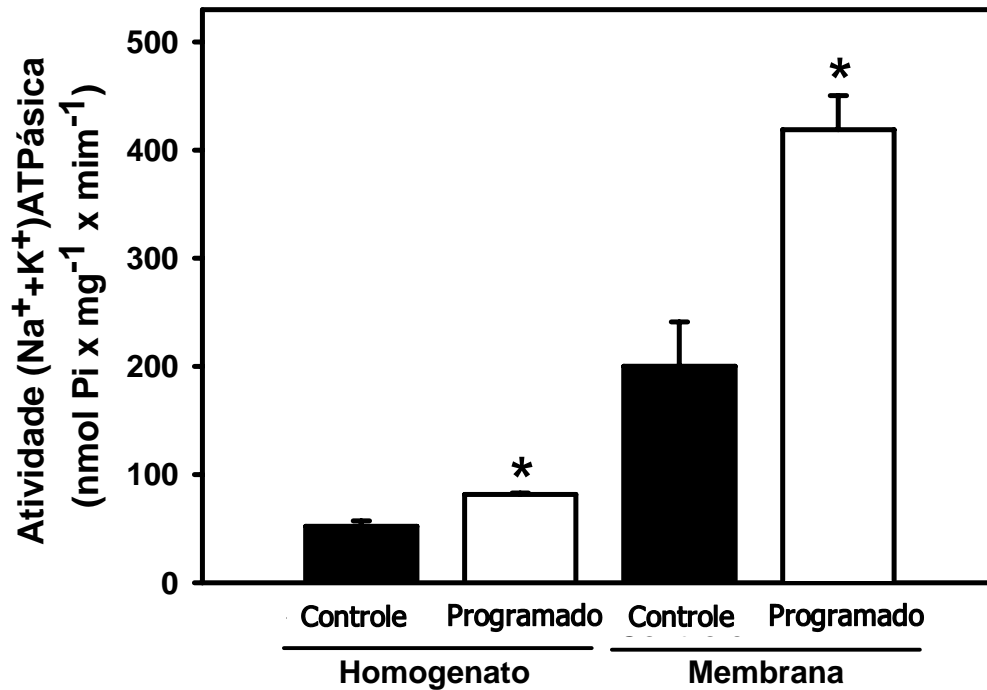


Figura 26. Medida da atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica no homogenato total e na fração de membrana basolateral de túbulos proximais dos ratos controle e programados. As atividades foram medidas como descrito na Metodologia. Os valores são expressos em nmol Pi × mg⁻¹ × min⁻¹ (média ± EPM) (n = 8 programados; n = 6 controles) *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05).

(McDonough *et al.*, 1988) – nas membranas basolaterais (Figura 27). A presença de um número aumentado de cópias da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ na membrana basolateral, junto com um aumento da afinidade para K^+ (e o consequente aumento do número de recâmbio da enzima), seriam responsáveis por um aumento significativo, em torno de 50% da capacidade de transporte de Na^+ . Este aumento da capacidade de transporte de Na^+ (e concomitantemente de água) em rins pequenos poderia ser vista como capaz de criar uma vantagem competitiva para contribuir ao crescimento da massa corporal total (75-80% composta por água) e de componentes estruturais como, por exemplo, proteínas. Em condições de restrição protéica, um aumento na capacidade de co-transportar os aminoácidos e a glicose (co-transporte dependente de Na^+ através da membrana luminal; Figura 9) poderia também conferir uma vantagem adaptativa, muito embora a reabsorção proximal de aminoácidos e glicose seja sempre completa (Ullrich, 1979). Se este “imprinting”, estabelecido durante da programação por desnutrição protéica maternal durante a lactação, se mantiver durante a vida adulta, poderá levar a respostas renais e cardiovasculares alteradas e prejudiciais (Costa-Silva *et al.*, 2009), como mostrado em diversos estudos epidemiológicos que associam programação por desnutrição e doenças cardiovasculares e renais (Rich-Edwards *et al.*, 1997; Forsen *et al.*, 1999; Langley-Evans *et al.*, 1999).

Como mencionado na Introdução, a Na^+ -ATPase insensível à ouabaína é considerada a maquinaria molecular responsável pelo ajuste fino da reabsorção proximal de Na^+ (Proverbio *et al.*, 1989; Caruso-Neves *et al.*, 1997; Caruso-Neves *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 2002; Bełtowski *et al.*, 2007). A Figura 28 mostra as determinações da atividade desta “segunda bomba de Na^+ ” (Whittembury & Proverbio, 1970) no homogenato total e na fração enriquecida de membranas basolaterais de túbulos proximais, visando evidenciar possíveis mudanças resultantes

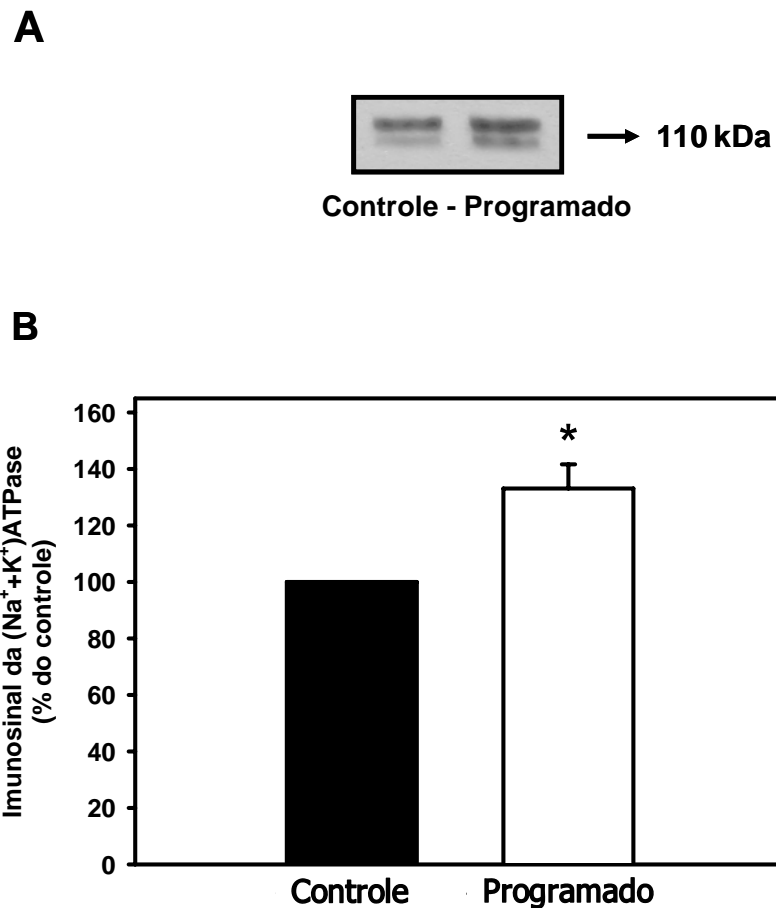


Figura 27. Imunodeteccção da subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$ na fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados. A imunodeteccção foi realizada como descrito na Metodologia. A: imunodeteccção representativa da subunidade catalítica $\alpha 1$ em ≈ 100 kDa. B: O gráfico mostra a representação quantitativa das densitometrias da imunodeteccção da subunidade α da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$ de túbulos de ratos programados, expressos como fração de imunodeteccção em ratos controle ($n = 6$ para cada grupo) normalizados pelo conteúdo protéico total corado pelo vermelho de Ponceau. Os valores são expressos em média \pm EPM, calculados tomando como 100% o valor densitométrico do controle analisado simultaneamente. *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle ($P < 0,05$).

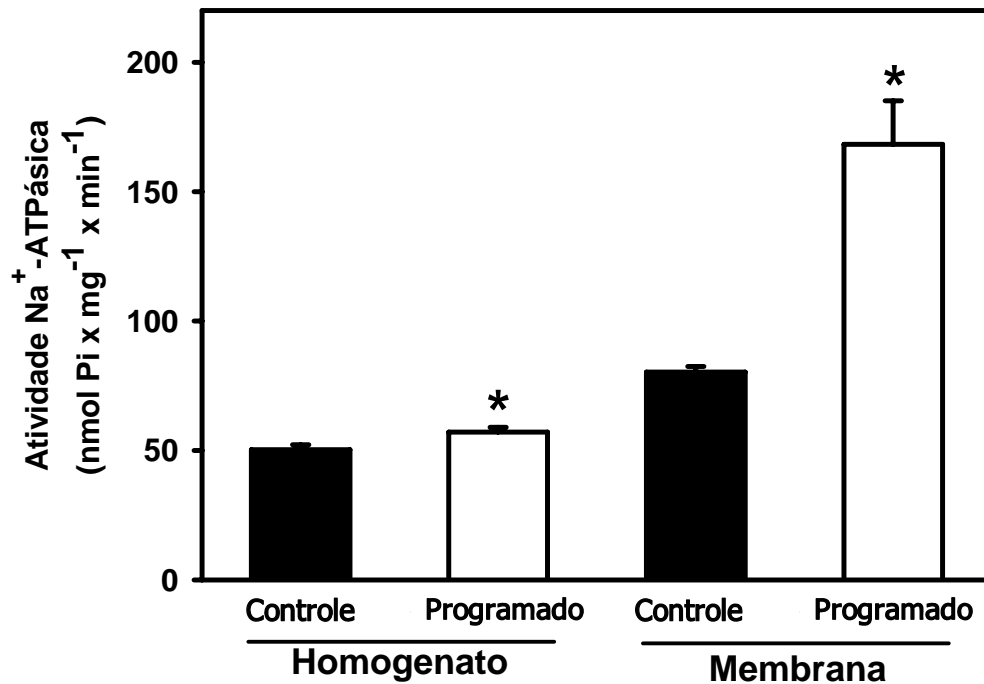


Figura 28. Medida da atividade Na⁺-ATPásica no homogenato total e na fração de membrana basolateral de túbulos proximais dos ratos controle e programados. As atividades foram medidas como descrito na Metodologia nos grupos experimentais e nas preparações indicadas na abscissa. Os valores são expressos em nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹ (média ± EPM) (n = 12 programados; n = 10 controles). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05).

da programação. No homogenato total de tecido há um aumento da atividade Na^+ -ATPásica no grupo de animais programados que, embora pequeno, é estatisticamente significativo ($57,0 \pm 1,9$ vs $50,3 \pm 1,9$ $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; programado e controle respectivamente, $p < 0,05$). Todavia, o aumento mais marcante – de mais de 100% – se observa na fração de membranas ($168,0 \pm 16,8$ vs $80,3 \pm 2,1$ $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; programado e controle respectivamente, $p < 0,001$). O fato da atividade nas membranas em relação ao homogenato estar aumentada três vezes nos animais programados e em torno de 60% nos controle, sugere que, no primeiro grupo, está aumentado o número de cópias da ATPase transferidas para a membrana. A sua síntese parece estar ligeiramente aumentada uma vez que há também um aumento na atividade medida no homogenato. Por não existirem ainda anticorpos para a imunodeteção da Na^+ -ATPase, não foi possível estimar eventuais diferenças na transladação desta ATPase desde os sítios citosólicos de síntese para a membrana basolateral.

Assim como no caso da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, um aumento juvenil da atividade específica da Na^+ -ATPase poderia conferir uma vantagem adaptativa durante o crescimento de animais com rins de tamanho diminuído. E, do mesmo modo, constituindo a base de alterações tardias nos processos de transporte transepitelial que poderiam ser ainda mais relevantes do que aquelas associadas à $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. Isto em função do proposto papel na modulação fina da reabsorção proximal de Na^+ desempenhado por esta ATPase (Proverbio *et al.*, 1989; Caruso-Neves *et al.*, 1997; Caruso-Neves *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 2002; Bełtowski *et al.*, 2007). Recentemente (Bełtowski *et al.*, 2007) foi mostrada a potencial associação desta ATPase com o estabelecimento de quadros de hipertensão e obesidade – associados a hiperleptinemia – o que poderia estar também ocorrendo na idade tardia dos ratos programados durante a lactação, especialmente em condições de resistência central à leptina quando se chega à vida adulta (Vicente *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2008). O elo

entre a hiperleptinemia crônica e o aumento na atividade da Na^+ -ATPase parece ser a formação de espécies reativas de oxigênio (Beltowski *et al.*, 2007), como também ocorre em casos de hipóxia placentária (Borrego-Díaz *et al.*, 2008). A convergência de programação metabólica por desnutrição protéica maternal, estresse oxidativo placentário e aumento da atividade Na^+ -ATPásica no desmame foi recentemente demonstrada em nossos laboratórios (UFRJ e UFPE) (Vieira-Filho *et al.*, 2009), confirmando a hipótese de que, em diferentes momentos e modelos de programação por desnutrição protéica, alterações da Na^+ -ATPase e – consequentemente – no ajuste fino da reabsorção proximal de Na^+ poderiam constituir o “imprinting” comum que, perdurando na vida adulta contribuiria para a instalação de quadros associados ao inadequado manejo de sal.

A Ang II, como descrito na Introdução é um dos mais importantes moduladores da Na^+ -ATPase. A hipótese de trabalho foi a de que o aumento da atividade da Na^+ -ATPase na membrana basolateral poderia também resultar de hiperatividade nas respostas regulatórias à Ang II, provocadas pela programação causada pela desnutrição protéica durante a lactação e que, em função disto, a atividade da Na^+ -ATPase não mais responderia frente a concentrações crescentes de Ang II como ocorre com a enzima de rins de animais normais (Rangel *et al.*, 2005). Como na membrana basolateral das células dos túbulos proximais se encontra toda a maquinaria molecular de sinalização associada à regulação desta ATPase por Ang II (Rangel *et al.*, 2005), o que não ocorre para a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, que requer a participação de componentes citosólicos (Aperia *et al.*, 1994), os seguintes experimentos foram delineados para abordar a idéia de que o aumento da atividade Na^+ -ATPásica poderia resultar de uma resposta anormal à Ang II estabelecida em decorrência da programação. A Figura 29 mostra que, a diferença entre as atividades entre o grupo programado e o grupo controle, observada na ausência de Ang II, desaparece na presença de Ang II. E isto, confirmando a hipótese acima, ocorre

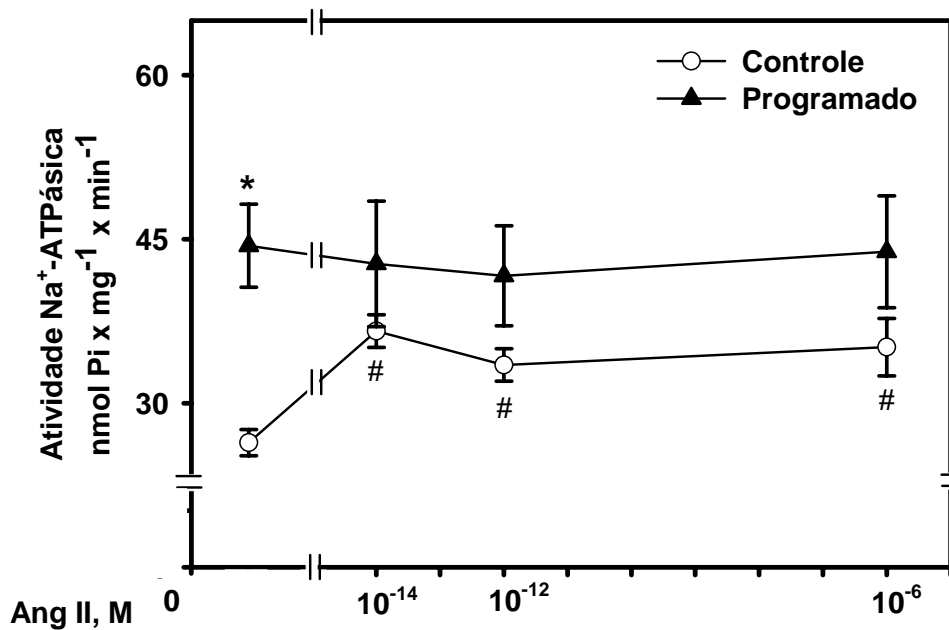


Figura 29. Modulação da atividade Na⁺-ATPásica da fração de membranas basolateral de túbulos proximais por Ang II nos ratos controle e programados. A atividade Na⁺-ATPásica foi medida como descrito na Metodologia, na ausência ou na presença das concentrações de Ang II indicadas na abscissa. Os valores são expressos por média ± EPM (n = 5 para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05). #: diferença estatisticamente significativa entre os valores de atividade com angiotensina em relação à atividade controle sem angiotensina (p < 0,05). Não se observaram diferenças entre os dois grupos na presença de concentrações crescentes de Ang II.

tanto naquelas concentrações semelhantes às encontradas na circulação quanto na presença de aquelas mais altas, encontradas no fluido tubular (Braam *et al.*, 1993) que banha a membrana basolateral onde se localiza a Na⁺-ATPase. Enquanto os ratos controle respondem a uma concentração de 10⁻¹⁴ M de Ang II com um aumento de cerca de 40% na atividade Na⁺-ATPásica (de 26,4 ± 2,1 para 36,6 ± 1,5 nmol Pi × mg⁻¹ × min⁻¹), os ratos programados mantêm sem modificações a sua elevada atividade inicial (sem Ang II) de 44,4 ± 3,8 nmol Pi × mg⁻¹ × min⁻¹ (portanto 70% acima do controle), em toda a faixa de concentrações de Ang II ensaiadas. A perda da resposta regulatória frente à Ang II confirma a hipótese de que a programação induz um estado constitucionalmente ativado como se fosse resultante da ação deste hormônio.

As Figuras 30 e 31 mostram que, aos 60 dias, o nível de expressão de receptores de Ang II na membrana basolateral se encontra alterado nos filhotes desnutridos. Pode ser observado um aumento de ≈ 40% nos níveis de expressão de receptores AT₁ (Figura 30) e uma diminuição da mesma ordem nos receptores AT₂ (Figura 31). A alteração em espelho, provocada pela programação por desnutrição protéica maternal nos níveis de receptores AT₁ e AT₂ na membrana basolateral da prole, poderia decorrer de uma resposta adaptativa no eixo renina/angiotensina, frente à diminuição que a desnutrição perinatal poderia provocar na síntese de renina e nos níveis tissulares renais de Ang II. Woods e colaboradores (Woods *et al.*, 2001) demonstraram a diminuição de mRNA para renina – sem alterações na atividade da enzima conversora ou nos níveis de angiotensinogênio – em filhotes recém nascidos de mães desnutridas e este poderia ser também o caso na desnutrição perinatal. Muito embora deva ser admitido que níveis de mRNA nem sempre possam ser correlacionados com níveis de expressão protéica e que os modelos de desnutrição maternal durante a gestação e na lactação podem exercer influências diferenciadas na prole (Fowden *et al.*, 2006), o aumento de receptores AT₁ poderia ser visto como uma resposta compensatória frente aos reduzidos níveis

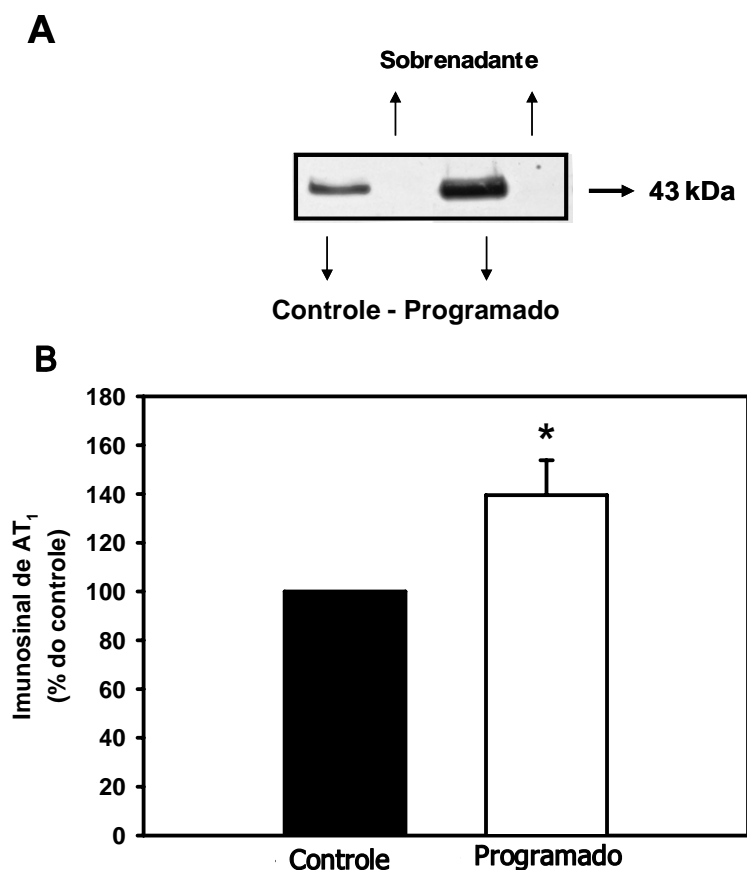


Figura 30. Imunoprecipitação seguida de Western blotting dos receptores AT₁ presente na fração de membrana basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados. A imunoprecipitação dos receptores AT₁ foi realizada como descrito na Metodologia. A: imunodeteção representativa de receptores AT₁. B: o gráfico mostra a representação quantitativa das densitometrias das imunoprecipitações de receptores AT₁ de túbulos de ratos programados, expressos como fração da imunodeteção em ratos controle (em ambos os casos normalizados pelo conteúdo protéico total corado pelo vermelho de Ponceau). Os valores são expressos em média ± EPM (n = 4 para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05).

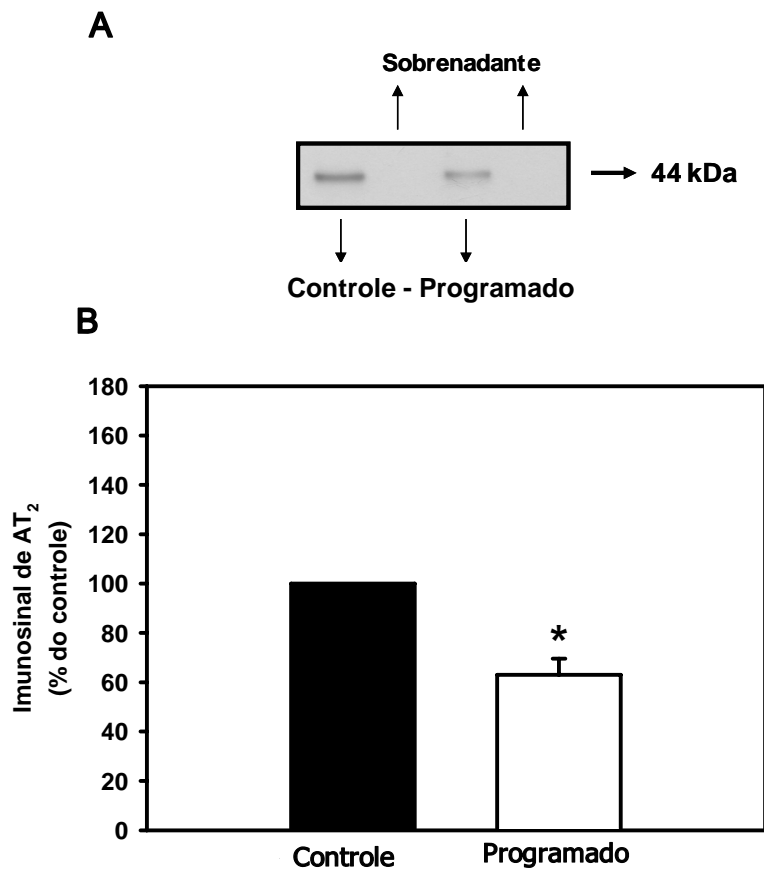


Figura 31. Imunoprecipitação seguida de Western blotting dos receptores AT₂ presentes na fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados. A imunoprecipitação dos receptores AT₂ foi realizada como descrito na Metodologia. A: imunodeteção representativa de receptores AT₂. B: o gráfico mostra a representação quantitativa das densitometrias das imunoprecipitações de receptores AT₂ de túbulos de ratos programados, expressos como fração de imunodeteção em ratos controle (em ambos os casos normalizados pelo conteúdo protéico total corado pelo vermelho de Ponceau). Os valores são expressos por média ± EPM (n = 4 para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05).

tissulares de Ang II ou um resultado direto e pouco específico da deficiência nutricional durante a gestação nos receptores fetais (Sahajpal & Ashton, 2003). Todavia, a simultânea diminuição de receptores AT₂ (Figura 31) é compatível com a idéia de uma resposta adaptativa a baixos níveis de renina e angiotensinogênio que seria compensada com uma hiperatividade do sistema renina/angiotensina, via aumento de receptores AT₁ com depressão associada de receptores AT₂. A evolução destas modificações no sistema renina/angiotensina parece ser complexa e não completamente desvendada nos diversos modelos de desnutrição, já que a desnutrição protéica crônica aumenta todos os componentes do sistema, incluindo angiotensinogênio e enzima conversora (Sahajpal & Ashton, 2003, 2005). Contudo, a importância desta hiperatividade do sistema renina/angiotensina juvenil na programação de hipertensão no adulto – qualquer que seja o seu mecanismo subjacente – parece estar bem clara. A administração, entre a segunda e quarta semana de idade, de losartan (Sherman & Langley-Evans, 2000), um antagonista de receptor AT₁, ou de captopril (Sherman & Langley-Evans, 2000), um inibidor da enzima conversora de angiotensina, diminuem o estabelecimento de hipertensão a longo prazo em ratos com desnutrição protéica.

Além da sua alteração quantitativa, alterações nos mecanismos de resposta e, portanto, na ativação/desativação de redes de sinalização acopladas a estes receptores poderiam estar também presentes. Recentes observações chamam a atenção para a ocorrência de alterações epigenéticas que poderiam estar associadas à programação (para revisões recentes ver Nuyt & Szyf, 2008 e Patel *et al.*, 2009). Dentre os fatores epigenéticos que poderiam influenciar a transcrição gênica e o desenvolvimento parecem se destacar a metilação de moléculas de DNA e acetilação/desacetilação de histonas (Gluckman & Hanson, 2008; Park *et al.*, 2008). Como estes processos ocorrem no útero e na lactação a metilação de DNA se torna um bom candidato para mediar distúrbios por interferência ambiental (como a desnutrição), oferecendo assim um

mecanismo potencial para a programação. Num trabalho recente, Bogdarina e colaboradores (Bogdarina *et al.*, 2007) mostraram que a expressão de receptores AT_{1b} na glândula adrenal de fetos de rato programados por desnutrição materna, está aumentada na primeira semana de vida em associação com hipometilação do promotor do gene que codifica para o receptor AT_{1b} o que pode ser associado à resposta hiperativa da glândula adrenal fetal frente à Ang II observada na desnutrição materna (McMullen *et al.*, 2004). Esta alteração, provavelmente provocada pela insuficiência alimentar de doadores de grupos metila (Burns *et al.*, 1997), poderia também estar presente no tecido renal, explicando assim o aumento da expressão de receptores AT₁ no grupo programado (Figura 30). E uma resposta alterada da Na⁺-ATPase, como a mostrada na Figura 29, poderia ser o correlato que, a nível deste transportador ativo de Na⁺, alterações epigenéticas poderiam também acontecer, programando assim para alterações no manejo renal de sal que, guardando a memória da programação, provocariam hipertensão na vida adulta.

A desnutrição perinatal seria capaz de provocar também alterações na rota de sinalização existente entre os receptores de Ang II na membrana basolateral e a Na⁺-ATPase inserida na vizinhança? Os experimentos que serão apresentados e discutidos a seguir forma delineados para abordar esta pergunta. As Figuras 32 e 33 mostram o imunossinal da proteína G, isoforma Gq – associada aos receptores de Ang II na membrana basolateral de túbulos proximais – obtido com o emprego do anticorpo específico que reconhece a subunidade α da proteína Gq. Para detectar a proteína Gq ligada unicamente aos receptores AT₁, estes foram primeiro imunoprecipitados com o mesmo anticorpo utilizado nos experimentos da Figura 30 para depois imunoensaiar o sedimento utilizando anticorpo anti-proteína Gq. Apesar do aumento de aproximadamente 40% na expressão de receptores AT₁ encontrado nos experimentos da

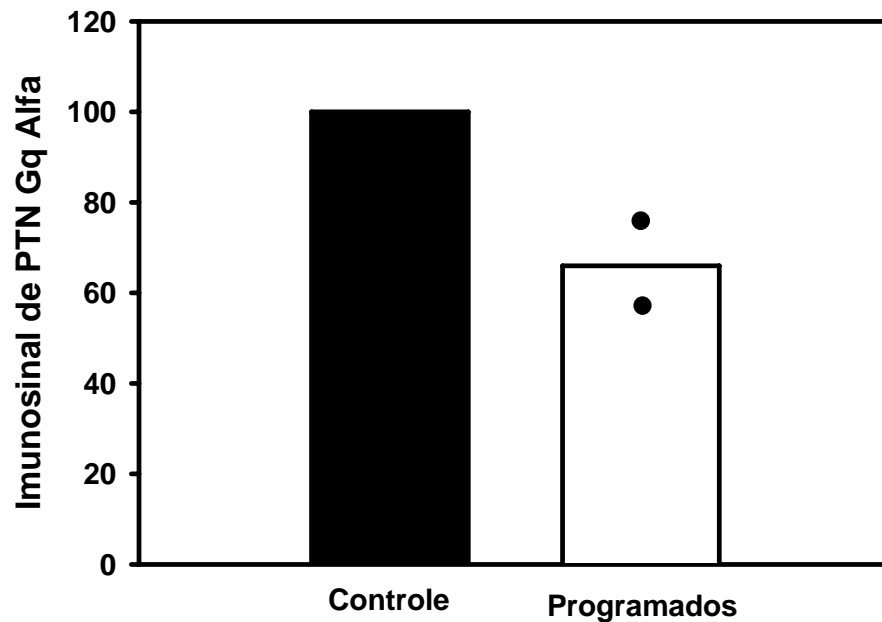


Figura 32. Imunodeteção da proteína $Gq\alpha$ em fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados após imunoprecipitação do receptor AT_1 . O receptor AT_1 foi inicialmente imunoprecipitado como descrito na Metodologia e em seguida foi realizado o ensaio de Western blotting para a detecção da subunidade α da proteína Gq. O gráfico mostra a representação quantitativa das densitometrias da imunodeteção da subunidade α da proteína de túbulos proximais de ratos programados, expressos como fração de imunodeteção em ratos controle normalizados pelo conteúdo protéico total corado pelo vermelho de Ponceau ($n = 2$ para ambos os grupos experimentais; Os valores experimentais encontram-se representados pelos círculos inseridos na barra do grupo programado).

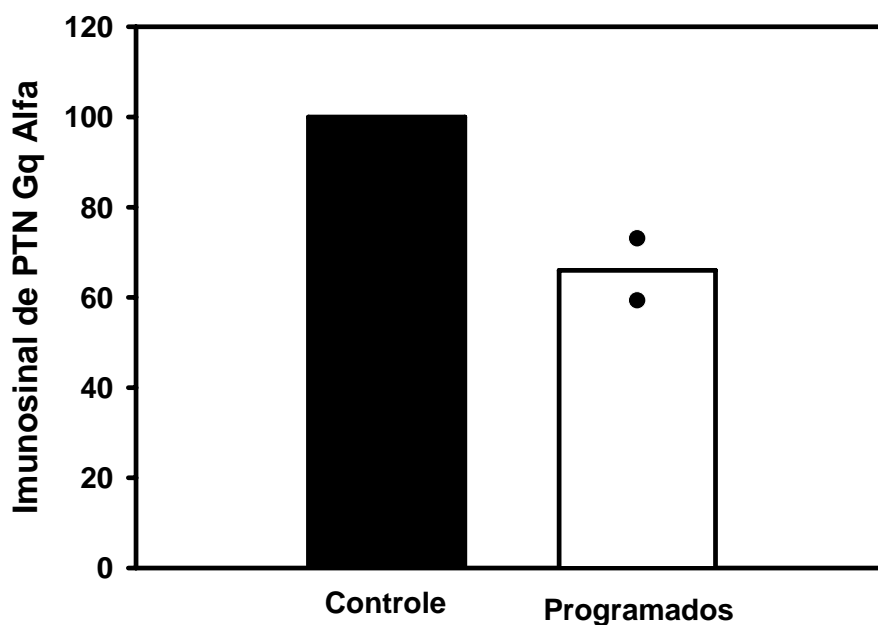


Figura 33. Imunodeteção da proteína Gq em fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados após a imunoprecipitação do receptor AT₂. O receptor AT₂ foi inicialmente imunoprecipitado como descrito na Metodologia e em seguida foi realizado o ensaio de Western blotting para a detecção da subunidade α da proteína Gq. O gráfico mostra a representação quantitativa das densitometrias da imunodeteção da subunidade α da proteína de túbulos proximais de ratos programados, expressos como fração de imunodeteção em ratos controle normalizados pelo conteúdo protéico total corado pelo vermelho de Ponceau (n = 2 para ambos os grupos experimentais; Os valores experimentais encontram-se representados pelos círculos inseridos na barra do grupo programado).

Figura 30, observa-se uma diminuição de aproximadamente 30-40% na quantidade de proteína Gq nos ratos programados em relação aos controles (Figura 32). Estes resultados indicam que, nos ratos desnutridos, aproximadamente 50% dos receptores AT₁ se encontram depletados de sua proteína Gq. É interessante destacar que esta diminuição também é detectada no mesmo grupo, na mesma proporção (≈35%) em relação ao controle, quando a imunoprecipitação se ensaia com anticorpo anti-receptor AT₂ e a imunodeteção é efetuada com anticorpo anti-proteína Gq (Figura 33). Como não existem evidências de acoplamento de proteínas Gq a receptores AT₂, esta diminuição provavelmente reflete o decréscimo acima observado de proteína Gq acoplada a receptores AT₁, que foram co-precipitados na forma de heterodímeros com receptores AT₂ ao utilizar o anticorpo contra estes últimos. Recentemente, nosso laboratório mostrou (Axelband *et al.*, 2009) que heterodímeros são formados e dissociados na membrana basolateral de túbulos proximais em resposta a flutuações nos níveis de Ang II. A Figura 34 apresenta experimentos de imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor AT₁ (e imunodeteção com anticorpo anti-receptor AT₂; painel A) e de imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor AT₂ (seguida de imunoensaio do sedimento com anticorpo anti-receptor AT₁; painel B). A Figura 34A mostra um aumento de heterodímeros AT₁/AT₂, resultante da imunoprecipitação inicial com anticorpos anti-receptor AT₁, na mesma proporção (≈35%) que o aumento primário de receptores AT₁ na membrana dos ratos desnutridos (Figura 30). Por sua vez, a Figura 34B mostra uma diminuição de heterodímeros AT₁/AT₂, após imunoprecipitação com anticorpo anti-receptor AT₂, também semelhante à diminuição observada na membrana (≈30%; Figura 31). Estes resultados, em conjunto, são fortemente indicativos de que a programação por desnutrição perinatal não afetaria a formação de heterodímeros de receptores de Ang II na membrana basolateral. Como a dimerização/dissociação parece responder a flutuações nos níveis de Ang II (Axelband *et al.*, 2009) a falta de resposta

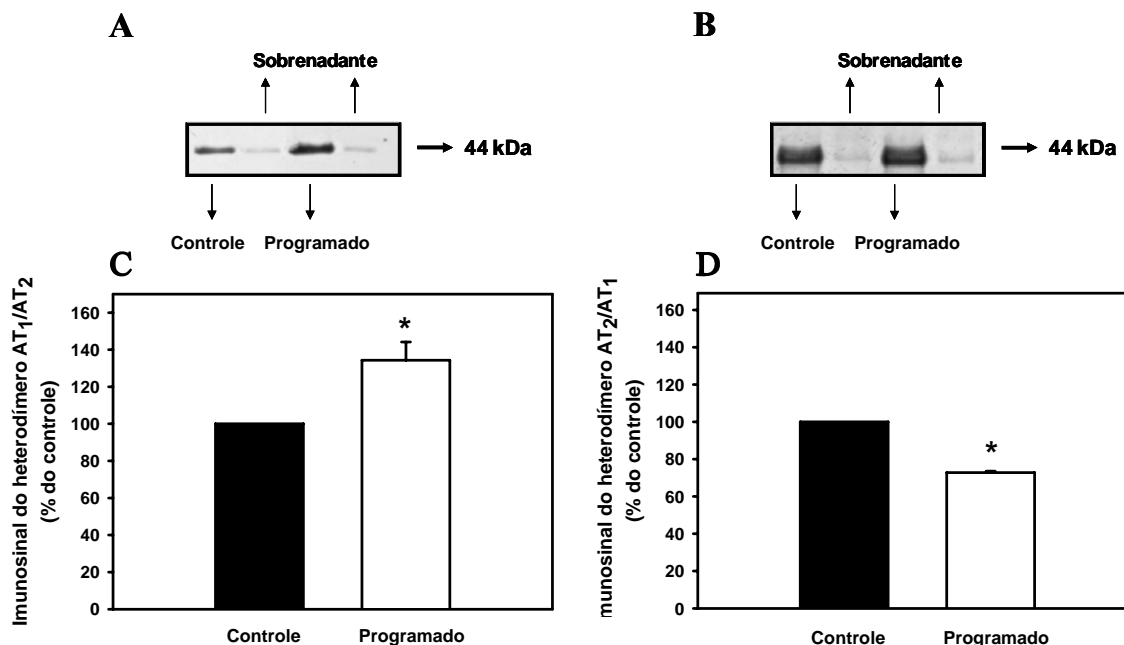


Figura 34. Imunodeteção de heterodímeros AT₁/AT₂ e AT₂/AT₁ em fração de membranas basolateral de túbulos proximais de ratos controle e programados. A e B: mostram imunodeteção representativa dos heterodímeros AT₁/AT₂ e AT₂/AT₁, respectivamente. C e D: Os gráficos mostram o resultado da imunoprecipitação com anticorpos anti-receptor AT₁, seguida de imunoenensaio do sedimento com anticorpo anti-receptor AT₂ e da imunoprecipitação com anticorpos anti-receptor AT₂, seguida de imunoenensaio do sedimento com anticorpo anti-receptor AT₁, respectivamente. Os gráficos mostram a representação quantitativa das densitometrias da imunodeteção, expressos como fração de imunodeteção em ratos controle normalizados pelo conteúdo protéico total corado com o vermelho de Ponceau. Os valores são expressos por média ± EPM, depois de transformados em valores percentuais (n = 4 para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05).

da Na⁺-ATPase numa faixa ampla de concentrações de Ang II entre 10⁻¹⁴ e 10⁻⁶ M (Figura 29) poderia resultar da existência de receptores dimerizados estáticos, igualmente não responsivos a Ang II, provavelmente como resultado da depleção de proteína Gq dos receptores AT₁ e, conseqüentemente, das vias de sinalização que se continuam a partir dela.

No rim, as ações fisiológicas mais conhecidas da Ang II são aquelas mediadas pelo receptor AT₁ acoplado à proteína Gq, num complexo processo onde diferentes evidências experimentais (De Gasparo *et al.*, 2000; Dinh *et al.*, 2001; Féraillé & Doucet, 2001) indicam haver ativação de uma fosfolipase C (PLC), hidrólise de fosfatidil inositol-bis-fosfato (PIP₂) da membrana plasmática em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), e que culmina simultaneamente com aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular e ativação de uma PKC. Essa sucessão de eventos foi observada de maneira clara durante a ativação da Na⁺-ATPase de membrana basolateral de túbulos proximais por Ang II (Rangel *et al.*, 2005) e, dependendo das condições de ensaio, também na modulação da (Na⁺+K⁺)ATPase (para uma revisão específica sobre sua regulação ver Therien & Blostein, 2000). As PKCs parecem desempenhar um papel-chave, não apenas como elementos intermediários de uma via isolada que conduz desde os receptores de Ang II até seus alvos finais (no caso de nosso interesse as ATPases transportadoras de Na⁺), mas também na encruzilhadas de vias que se entrelaçam para provocar efeitos opostos (Therien & Blostein, 2000; Féraillé & Doucet, 2001). Por este motivo, elas foram escolhidas nesta dissertação para investigar a influência da programação metabólica nas redes de sinalização celular que associam receptores de Ang II as duas ATPases estudadas. Como a modulação da Na⁺-ATPase de túbulos proximais por Ang II via PLC e PKC conta com a maquinaria sinalizadora completa na membrana basolateral isolada de túbulos renais (Rangel *et al.*, 2005), enquanto a regulação da (Na⁺+K⁺)ATPase depende criticamente de elementos citosólicos (Aperia

et al., 1994; Theriem & Blostein, 2000), a discussão dos dados obtidos que serão apresentados a seguir, estará especialmente focada na primeira.

A Figura 35 mostra ensaios típicos da imunodeteção de isoformas representativas dos três diferentes tipos de PKCs e a quantificação destes diferentes ensaios empregando diferentes preparações de membrana. Empregando os anticorpos específicos foi investigado o efeito da programação sobre as isoformas alfa (PKC α , representativa das PKCs clássicas), epsilon (PKC ϵ , representativa das novéis, independentes de Ca^{2+}) e as atípicas zeta e lambda (PKCs ζ e λ). Observa-se que a quantidade das PKCs α , ϵ e λ imunodetectada na membrana basolateral de túbulos proximais nos ratos programados é significativamente menor do que nos ratos controle (19%, 13% e 16%, respectivamente; Fig. 35 A, B, C) não havendo diferença quando se analisa a isoforma ζ . A Figura 36 mostra a atividade de PKC sensível à calfoestina C (atributo das PKCs clássicas e novéis) onde pode ser observada uma acentuada diminuição na atividade cinásica nos ratos programados em relação ao controle ($0,3 \pm 0,3$ vs $2,0 \pm 0,3$ pmol P-esterificado por mg de histona em 1 min, respectivamente). Estes resultados, diminuição da expressão e decréscimo ainda maior da atividade deste conjunto de PKCs, junto com a depleção de proteína Gq dos receptores AT_1 (Figura 32), podem explicar a falta de resposta da Na^+ -ATPase dos ratos programados a concentrações crescentes de Ang II (Figura 29). Havendo este desacoplamento evidente entre receptores AT_1 e pelo menos dois elementos chave da rede de sinalização a eles vinculada, qual seria a causa do aumento constitutivo e consolidado (em torno de 100%) da atividade Na^+ -ATPásica no adulto jovem (Figura 28).

Quatro hipóteses – não excludentes – podem ser formuladas. A primeira é a de que, após o primeiro “imprinting” que levou ao aumento constitutivo da atividade Na^+ -ATPásica, provavelmente mudanças epigenéticas que levaram à hiperexpressão de

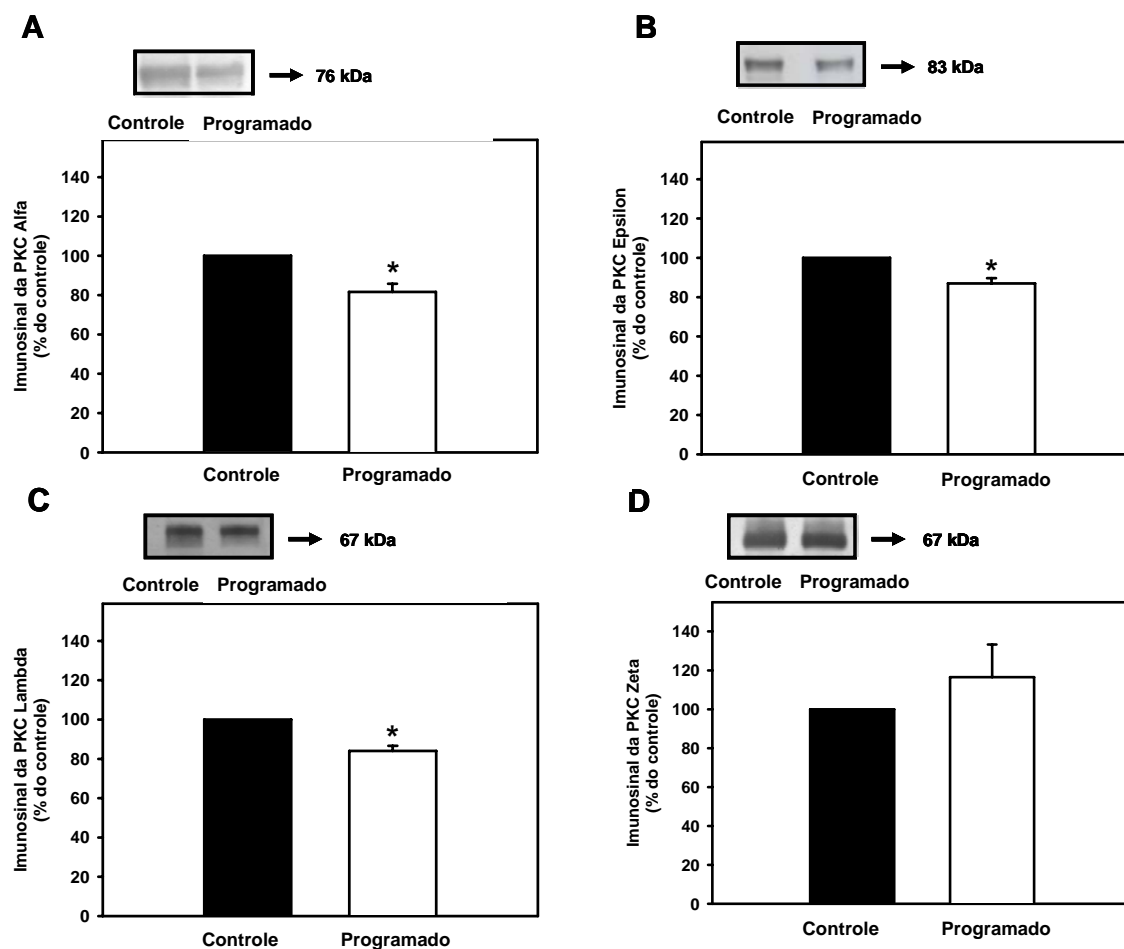


Figura 35. Diferentes isoformas da proteína cinase C em túbulos proximais renais. As isoformas alfa (painel A), epsilon (painel B), lambda (painel C) e zeta (painel D) da PKC foram imunodetectadas na fração de membranas basolaterais de túbulos proximais dos ratos programados e controle. Os gráficos mostram a representação quantitativa das densitometrias das imunodeteções das diferentes isoformas de PKC ratos programados, expressos como fração de imunodeteção em ratos controle normalizados pelo conteúdo protéico total corado com o vermelho de Ponceau. Os valores são expressos por média \pm EPM, depois de transformados em valores percentuais ($n = 6$ para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle ($P < 0,05$).

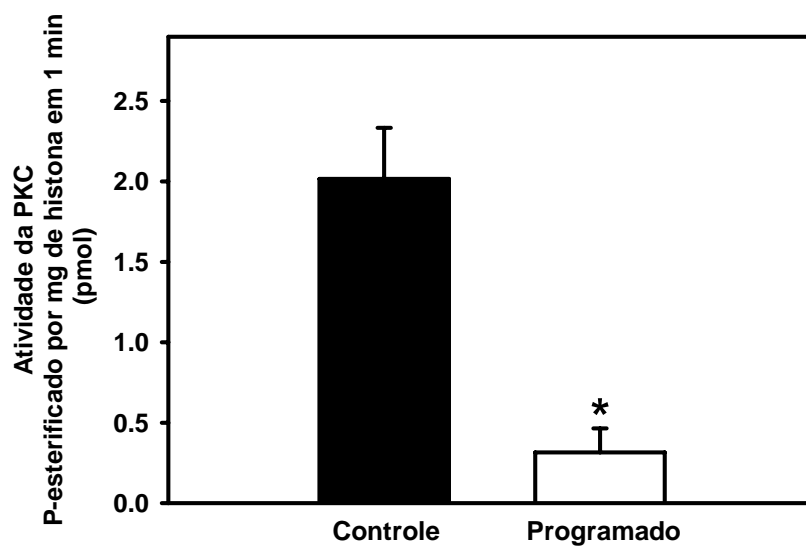


Figura 36. Atividade da PKC sensível à calfofina C. A atividade da PKC foi medida na fração de membranas de túbulos proximais e calculada como descrito na Metodologia. Os valores são mostrados como média \pm EPM (n = 6 para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle ($P < 0,05$).

receptores AT_1 , uma resposta contra-regulatória poderia ter sido gradativamente instalada em função de um progressivo e sustentado decréscimo da concentração citosólica de Na^+ nas células do túbulo proximal. Variações de Na^+ intracelular, numa faixa muito estreita de concentrações, parecem desempenhar um papel crucial na regulação do transporte mediado pela $(Na^+ + K^+)ATPase$ por uma diversidade de mecanismos que vão desde a síntese de unidades de transporte até uma influência na atividade, na composição e na localização de receptores, enzimas e co-fatores associados a regulação por fosforilação/defosforilação (Efendiev *et al.*, 2003). Este poderia ser também o caso em relação à Na^+ -ATPase com o Na^+ intracelular influenciando os componentes membranares da rede de sinalização através de mudanças sutis de potencial elétrico transmembrana (parcialmente dependentes de Na^+) (Therien & Blostein, 2000) ou através dos sensores de Na^+ (Cann, 2007) encontrados na superfície interna de células de procariotes e postulados para diferentes regiões do néfron (Sealey *et al.*, 1988).

A segunda hipótese seria a de que a diminuição dos receptores AT_2 estabelecida também durante a lactação e preservada ao longo da vida fazendo parte da memória da programação (Figura 31), poderia haver induzido um cambio permanente nas propriedades catalíticas e regulatórias da Na^+ -ATPase. Muito embora a rede de sinalização acoplada a receptores AT_2 não tenha sido desvendada, há evidências de que seus efeitos seriam mediados por uma complexa rede que envolve ONS/óxido nítrico (Hakam & Hussain, 2006), PLA_2 (Haithcock *et al.*, 1999), ceramida (Berry *et al.*, 2001), inativação de MAPKs e ativação de tirosino-fosfatases (Dinh *et al.*, 2001) e a ativação de PKG e PKA que poderiam inibir a Na^+ -ATPase via uma proteína $G_{i/o}$ e G_s , respectivamente (Lara *et al.*, 2006). A atenuação de respostas contra-balanceadoras mediadas pelos receptores AT_2 , através da diminuição da formação de óxido nítrico, da alteração do estado de fosforilação/defosforilação de resíduos regulatórios específicos

da ATPase e, especialmente, pela atenuação do sinal regulatório a nível de $G_{i/o}$ detectado por Lara e colaboradores (Lara *et al.*, 2006), poderia ter deixado, durante as etapas finais de maturação renal durante a lactação marcas permanentes na Na^+ -ATPase que condicionaram e fixaram sua catálise num patamar de velocidade mais elevado. Deve ser mencionado que estes fatores foram implicados na regulação da (Na^++K^+) ATPase renal (Aperia *et al.*, 1994; Ewart & Klip, 1995; Therien & Blostein, 2000; Féraille & Doucet, 2001; Efendiev *et al.*, 2003) podendo igualmente, através dos mesmos mecanismos, modular a Na^+ -ATPase via receptores AT_2 e, de maneira global, o transporte transepitelial de Na^+ .

A terceira hipótese teria como base alterações estruturais no entorno lipídico da Na^+ -ATPase que é o mesmo da (Na^++K^+) ATPase. Se a resposta da Na^+ -ATPase frente a modificações provocadas pela desnutrição durante a lactação no entorno lipídico que a envolve, fosse semelhante – em termos de aceleração do recâmbio – àqueles recentemente observados ou postulados também para a (Na^++K^+) ATPase (Katyare *et al.*, 2007), ela poderia também persistir na idade adulta exibindo uma atividade constitutiva elevada como a mostrada na Figuras 28 e, ao mesmo tempo, não responsiva a Ang II (Figura 29).

A quarta e última hipótese baseia-se em resultados da presente dissertação. Como descrito na introdução, a PKA residente na membrana plasmática também poderia estar envolvida na rede de sinalização celular que estaria modulando a atividade das ATPases transportadoras de Na^+ . A Figura 37 mostra a atividade da PKA na membrana basolateral de túbulos proximais, onde foi observada uma acentuada diminuição da atividade desta cinase nos ratos programados quando comparados ao controle. Desta forma, como sugerido para PKC, à diminuição da atividade da PKA poderia estar também relacionada a um menor número de cópias desta cinase na

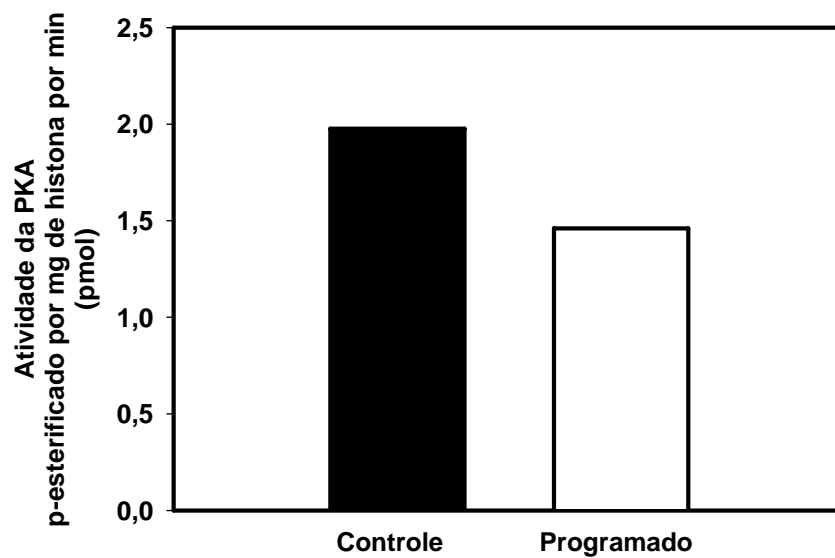


Figura 37. Atividade da PKA sensível à PKAi. A atividade da PKA foi medida na fração de membranas de túbulos proximais e calculada como descrito na Metodologia (n = 2 para ambos os grupos experimentais).

membrana basolateral. Na Figura 38 observa-se que esta hipótese é plausível, uma vez que há uma diminuição significativa de 22% de PKAs nos ratos programados em relação aos controles. A partir desses resultados, diminuição na expressão e atividade da PKA, pode-se sugerir que o aumento (mais de 100%) observado na atividade Na^+ -ATPásica dos ratos programados metabolicamente pode estar relacionado com a possível “falta” dos sistemas contra-reguladores acoplados ao receptor AT_2 .

O aumento observado na expressão e atividade $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPásica}$ (figura 26) e o aumento da atividade da Na^+ -ATPásica (figura 28) nos ratos programados, poderia culminar em uma maior reabsorção Na^+ no túbulo proximal, levando a uma expansão do líquido extracelular com consequente aumento da pressão arterial. Entretanto, como se pode observar na Figura 39, não houve diferença significativa dos ratos programados em relação aos controles na pressão arterial sistólica ($133 \pm 3,7$ mmHg vs $129 \pm 6,0$ mmHg), diastólica ($106 \pm 4,0$ mmHg vs $98 \pm 6,0$ mmHg) e média ($115 \pm 4,0$ mmHg vs $107 \pm 6,0$ mmHg; programado e controle, nos três casos).

Os trabalhos que mostram hipertensão em animais programados foram realizados com animais adultos (90, 120 dias de vida). Dessa forma, as alterações precoces (aos 60 dias de vida) detectadas nos transportadores de Na^+ dos ratos programados metabolicamente (Figura 26 e 28), poderiam ser as alterações moleculares que conduziriam esses animais a hipertensão arterial em idades posteriores (90, 120 dias de vida) e, portanto, possíveis marcadores de doença na vida adulta. Contudo, apesar de não apresentarem alteração na pressão arterial, podemos observar na Figura 40 que nos ratos programados já se observa, aos 60 dias de vida, um aumento estatisticamente significativo da frequência cardíaca ($378 \pm 10,3$ bpm vs $422 \pm 9,0$ bpm; programados e controle).

Este último resultado indica fortemente o estabelecimento de um quadro de

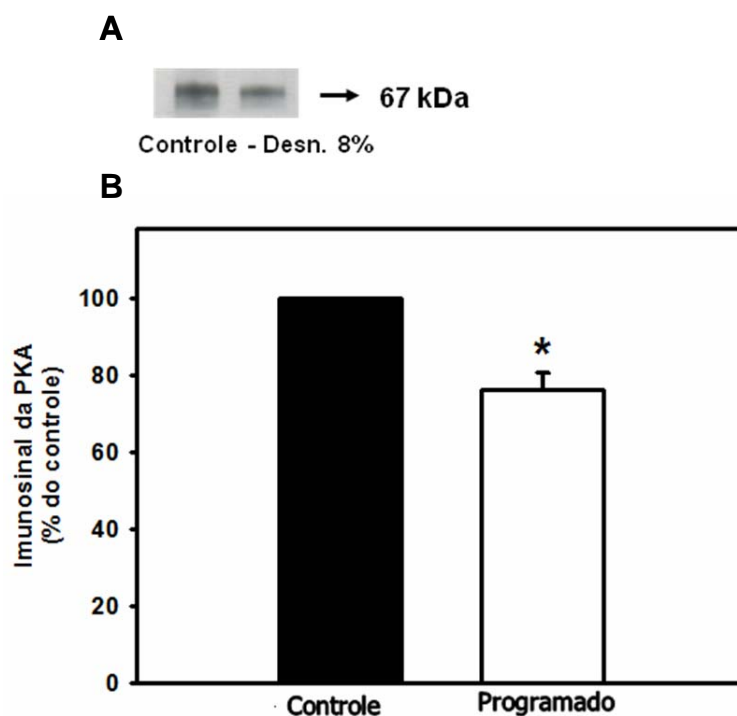


Figura 38. Imunodeteção da PKA em túbulos proximais renais. A PKA foi imunodetectada na fração de membranas basolaterais de túbulos proximais dos ratos programados e controle. A: mostrada imunodeteção representativa da PKA. B: O gráfico mostra a representação quantitativa das densitometrias das imunodeteções das diferentes isoformas de PKA ratos programados, expressos como fração de imunodeteção em ratos controle normalizados pelo conteúdo protéico total corados pelo vermelho de Ponceau. Os valores são expressos por média \pm EPM, depois de transformados em valores percentuais ($n = 4$ para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle ($P < 0,05$).

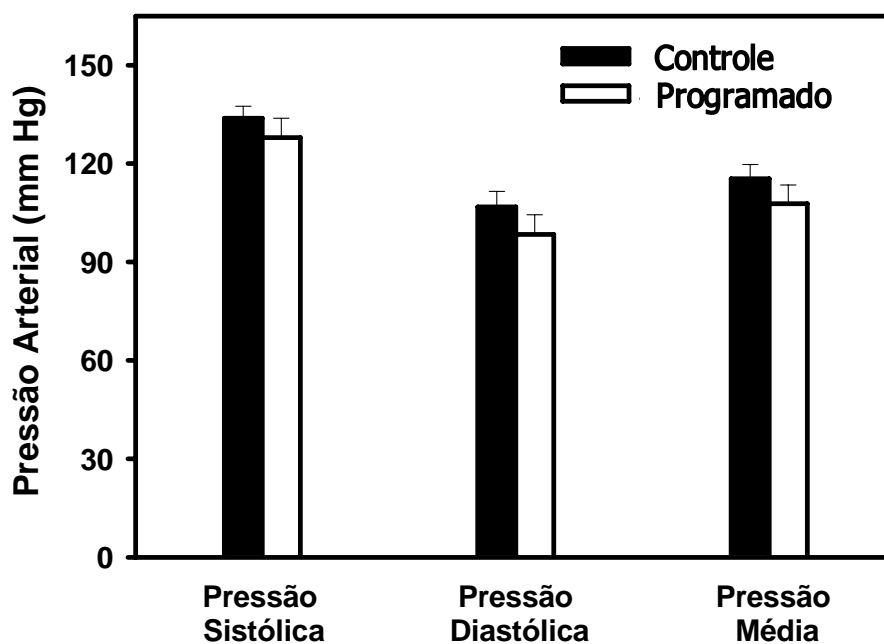


Figura 39. Efeito da programação metabólica na pressão arterial de ratos controle e programados. A pressão arterial sistólica, diastólica e média foi aferida no 60º dia de vida (sacrifício), como descrito na Metodologia. Os resultados estão expressos em mmHg (média \pm EPM) (n = 6 para ambos os grupos experimentais).

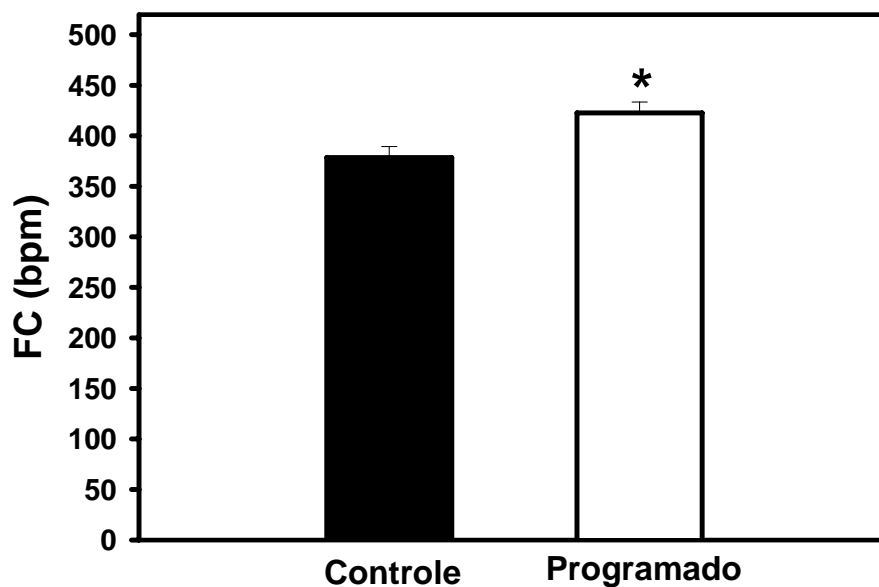


Figura 40. Efeito da programação metabólica na frequência cardíaca dos ratos controle e programados. A frequência cardíaca (FC) foi aferida no 60º dia de vida (sacrifício), como descrito na Metodologia. Os resultados estão expressos como batimentos por min (bpm) (média \pm EPM) (n = 6 para ambos os grupos experimentais). *: diferença estatisticamente significativa entre os grupos programados e o controle (P < 0,05).

hiperatividade simpática, hipótese que se apóia nas observações de Monteiro e colaboradores (2001) empregando uma dieta deficiente em proteínas como a utilizada em diferentes regiões do Nordeste do Brasil. No caso da desnutrição crônica, após o desmame, há um aumento precoce (14 semanas de vida) da pressão arterial (Costa-silva *et al.*, 2009; ver trabalho 1 anexo), dando suporte à idéia de que um aumento da atividade simpática (levando a uma hipertensão sistólica tardia) poderia constituir um denominador comum na desnutrição protéica, associada ou não à outras carências (Silva, 2008). Com esta alteração neuro-hormonal e com as alterações cinéticas e regulatórias dos transportadores renais de Na^+ descrita nessa dissertação estariam estabelecidas as marcas da desnutrição protéica, durante a lactação, capazes de programar para o estabelecimento de quadros de expansão de volumes e hipertensão arterial. Avaliar como se encadeiam esses processos, constituirá um dos objetivos de minha tese de Doutorado.

5. Conclusões

- 1) A desnutrição materna durante a lactação programa alterações no consumo alimentar, na trajetória de crescimento corporal e desenvolvimento renal de sua prole, e que repercutem nos transportadores ativos de Na^+ aumentando a sua atividade.
- 2) Em relação à $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, a programação, através de uma influencia dual, (i) estimula a expressão e (ii) acelera um dos passos lentos da catálise (a defosforilação dependente de K^+), levando a um aumento de mais de 100% na atividade da bomba. Além disso, níveis plasmáticos aumentados do hormônio tireoideano observados na

programação metabólica por desnutrição protéica na lactação, poderiam constituir uma das bases hormonais para o aumento da atividade e expressão da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ de túbulos proximais renais.

- 3) Em relação à Na^+ -ATPase, a falta de resposta a Ang II, na presença de uma expressão aumentada de receptores AT_1 , revela um passado de hiperatividade compensada pelo desacoplamento da via de sinalização que persiste no rato adulto jovem (diminuição de proteína $\text{Gq}\alpha$ e PKC).
- 4) O acentuado aumento (também mais de 100%) na atividade Na^+ -ATPásica, na ausência de Ang II, poderia ocorrer em decorrência da programação através das quatro hipóteses apresentadas na discussão da presente dissertação,
- 5) As alterações na expressão, na catálise e na regulação dos transportadores proximais de Na^+ constituem alterações precoces no manuseio renal de Na^+ , escondidas por trás de pressão arterial ainda preservada no rato adulto jovem (60 dias de vida), que programariam, junto com a hiperatividade simpática para o estabelecimento progressivo de quadros de hipertensão em períodos posteriores de vida.

6. Referências

Ahima, R. S.; Prabakaran, D.; Mantzoros, C.; Qu, D.; Lowell, B.; Maratos-Flier, E.; Flier, J. S. (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382, 250-252.

Allen, A. M.; Zhuo, J.; Mendelson, F. A. (2000) Localization and function of angiotensin AT₁ receptors. *Am. J. Hypertens.*, 13, 31-38.

Aperia, A.; Holtback, U.; Syren, M. L.; Svensson, L. B.; Fryckstedt, J.; Greengard, P. (1994) Activation/deactivation of renal Na⁺,K⁺-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *The FASEB Journal*, 8, 436-439.

Asano, K.; Dutcher, D. L.; Port, J. D.; Minobe, W. A.; Tremmel, K. D.; Roden, R. L.; Bohlmeyer, T. J.; Bush, E. W.; Jenkin, M. J.; Abraham, W. T.; Raynolds, M. V.; Zisman, L. S.; Perryman, M. B.; Bristow, M. R. (1997) Selective downregulation of the angiotensin II AT₂ receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circ.*, 95, 1193-1200.

Aurell, M. (1998) The renin-angiotensin system: the centenary jubilee. *Blood Press.*, 7, 71-75.

Axelband, F.; Assunção-Miranda, I.; de Paula, I. R.; Ferrão, F. M.; Dias, J.; Miranda, A.; Miranda, F.; Lara, L. da S.; Vieyra, A. (2009) Ang-(3-4) suppresses inhibition of renal plasma membrane calcium pump by Ang II. *Regulatory Peptides*, 155, 81-90.

Balbi, A. P. C.; Costa, R. S.; Coimbra, T. M. (2004) Postnatal renal development of rats from mothers that received increased sodium intake. *Pediatr. Nephrol.*, 19, 1212-1218.

Barker, D. J. (1993) Maternal nutrition and cardiovascular disease. *Nutr. Health*, 9, 99-106.

Barker, D. J. (1994) *Monthers, Babies, and Disease in Later Life*. London: BMJ Publishing Group.

Barker, D. J. (1997) Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *British Med. Bulletin*, 53, 96-108.

Barker, D. J. (2002) Fetal programming of coronary heart disease. *Endocrinology & Metabolism*, 13, 364-368.

Beach, R. S.; Gershwin, M. E.; Hurley, L. S. (1982) Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. *Science*, 218, 469-471.

Bennis-Taleb, N.; Remacle, C.; Hoet, J. J.; Reusens, B. (1999) A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J. Nutr.*, 129, 1613-1619.

Berney, D. M.; Desai, M.; Palmer, D. J; Greenwald, S.; Brown, A.; Hales, C. N.; Berry, C. L. (1997) The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J. Pathol.*, 183, 109-115.

Bernstein, K. E. & Berk, B. C. (1993) The biology of angiotensin II receptors. *Am. Kidney. Dis.*, 22, 745-754.

Bertram, C.; Trowern, A. R.; Copin, N.; Jackson, A. A.; Whorwood, C. B. (2001) The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase: Potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in Utero. *Endocrinology*, 142, 2841-2853.

Beltowski, J.; Borkowska, E.; Wojcicka, G.; Marciniak, A. (2007) Regulation of Renal Ouabain-Resistant Na⁺-ATPase by Leptin, Nitric Oxide, Reactive Oxygen Species, and

Cyclic Nucleotides: Implications for Obesity-Associated Hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.*, 29, 189-207.

Berry, C.; Touyz, R.; Dominiczak, A. F.; Webb, R. C.; Johns, D. G. (2001) Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 281, 2337-2365.

Blair, E. (2004) Fome mata uma criança a cada cinco segundos. Fundação Grupo Esquel Brasil. Disponível em: <http://www.esquel.org.br/modules>. Acesso em 14 nov. 2008.

Blanco, G. & Mercer, R. W. (1998) Isozymes of the Na⁺+K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.*, 275, 633-650.

Bogdarina, I.; Welham, S.; King, P. J.; Burns, S. P.; Clark, A. J. (2007) Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ. Res.*, 100, 520–526.

Borgatti, A. R.; Trigari, G.; Pagliarani, A.; Ventrella, V. (1985) Ouabain-insensitive Na⁺ stimulation of a microsomal Mg²⁺ -ATPase in gills of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81, 127-135.

Borrego-Díaz, E.; Rosales, J.; Proverbio, T.; Teppa-Garrán, A.; Andaluz, R.; Abad, C.; Marín, R.; Proverbio, F. (2008) Effect of Placental Hypoxia on the Plasma Membrane Ca-ATPase (PMCA) Activity and the Level of Lipid Peroxidation of Syncytiotrophoblast and Red Blood Cell Ghosts. *Placenta*, 29, 44-50.

Boumendil-Povedin, E. F. & Podevin, R. A. (1983) Isolation of basolateral and brush-border membranes from the rabbit kidney cortex. Vesicle integrity and membrane sidedness of the basolateral fraction. *Biochem. Biophys. Acta.*, 728, 39-49.

Braam, B., Mitchell, K.D., Fox, J., Navar, L.G. (1993) Proximal tubular secretion of angiotensina II in rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 264, 891-898.

Brenner, B. M.; Garcia, D. L.; Anderson, S. (1988) Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am. J. Hypertens.*, 1, 335–347.

Bumps, F. M.; Catt, K. J.; Chiu, A. T.; Degasparo, M.; Goodfriend, T.; Hussain, A.; Peach, M. J.; Taylor, D. G. Jr.; Timmermans, P. B. (1991) Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*, 17, 720-721.

Burns, S. P.; Desai, M.; Cohen, R. D.; Hales, C. N.; Iles, R. A.; Germain, J. P.; Going, T. C. H.; Bailey, R. A. (1997) Gluconeogenesis, Glucose Handling, and Structural Changes in Livers of the Adult Offspring of Rats Partially Deprived of Protein During Pregnancy and Lactation. *J. Clin. Invest.*, 100, 1768-1774.

Cabral, L. M. P. (2006) Modulação da Ca^{2+} -ATPase de túbulos proximais renais por ceramidas. Dissertação de mestrado - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Cann, M. (2007) A subset of GAF domains are evolutionarily conserved sodium sensors. *Molecular Microbiology*, 64, 461-472.

Carey, R. M. & Siragy, H. M. (2003) Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev.*, 24, 261-271.

Caruso-Neves, C.; Francisco-Pedro, L. G.; Pantozzi, L. P.; Chagas, C.; Lopes, A. G. (1997) Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta*, 1329, 336-344.

Caruso-Neves, C.; Siqueira, A. S. E.; Iso-Cohen; G.; Lopes, A. G. (1999) Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity from membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta*, 1431, 483-491.

Caruso-Neves, C.; Lara, L. S.; Rangel, L. B. A.; Grossi, A. L.; Lopes, A. G. (2000) Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta*, 1467, 189-197.

Celsi, G.; Kistner, A.; Aizman, R.; Eklof, A. C.; Ceccatelli, S.; de Santiago, A.; Jacobson, S. H. (1998) Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr. Res.*, 44, 317-322.

Chakravarthy, B. R.; Whitfield, J. F. & Durkin, J. P. (1994) Inactive membrane protein kinase Cs: a possible target for receptor signalling. *Biochem. J.*, 304, 809-816.

Corstius, H.B.; Zimanyi, M. A.; Maka, N.; Herath, T.; Thomas, W.; Van der Laarse, A.; Wreford, N.G.; Black, M.J. (2005). Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr. Res.*, 57,796-800.

Costa-Silva, J. H.; Silva P. A.; Pedi, N.; Luzardo, R.; Einicker-Lamas, M.; Lara, L. S.; Bezerra, A. M.; Castro-Chaves, C.; Vieyra, A. (2009) Chronic undernutrition alters renal active Na(+) transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood?. *Eur. J. Nutr.*, 48, 1-9.

Cravo, C, O.; Teixeira C. V.; Passos, M. C. F.; Dutra, S. C. P.; Moura, E. G.; Ramas C. (2002) Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Hormone and metabolic research*, 34, 400-405.

De Ferrari, G.; Italian Society of Nephrology. (2003) Guidelines for diagnosis and therapy of diabetic nephropathy. *G. Ital. Nefrol.*, 24, 96-S108.

De Gasparo, M.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.*, 52, 415-472.

De Jairala, S. W.; Vieyra, A.; Maclaughlin, M. (1972) Influence of ethacrynic acid and ouabain on the oxygen consumption and Na and K content of kidney external medulla slices of the dog. *Biochim. Biophys. Acta*, 279, 320-330.

De Souza, A. M.; Carvalho, T. L. G.; Fontes, C. F. L.; Lopes, A. G.; Caruso-Neves, C. (2003) Isolamento e caracterização do intermediário fosforilado da segunda bomba de sódio. Reunião Anual da FESBE, 18, Curitiba, PR. Resumos, Divulgação por meio digital (CD-ROM).

De Souza, A. M.; Carvalho, T. L. G.; Sabino, P. M.; Vives, D.; Fontes, C. F. L.; Lopes, A. G.; Caruso-Neves, C. (2007) Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in MDCK I cells. *Biochimie.*, 89, 1425-1432.

Declaração do Milênio das Nações Unidas. Disponível em: http://www.ence.ibge.gov.br/pos_graduacao/mestrado/Declaracao_do_milenio.pdf. Acesso em 14 nov. 2008.

De Souza, A. M.; Lopes A. G.; Pizzino, C. P.; Fossari, R. N.; Miguel, N. C. O.; Cardozo, F. P.; Abi-Abib, R.; Fernandes M. S.; Santos D. P. A.; Caruso-Neves, C. (2004) Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na⁺-ATPase activity through AT₂ receptor. *Regul. Pept.*, 120, 167– 175.

Del Castillo, J. R.; Marín, R.; Proverbio, T.; Proverbio, F. (1982) Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 692, 61-68.

Del Castillo, J. R. & Robinson, J. W. L. (1985) Na⁺-stimulated ATPase activities in basolateral plasma membranes from guinea-pig small intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 812, 413-422.

Desnutrição (2006). Disponível em: <http://www.desnutricao.org.br>. Acesso em: Dez. de 2008.

Díaz, M. E. (2002) Hypertension and obesity. *Journal of Human Hypertension*, 16, 18–22.

Dibona, G. F. (2002) Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 11, 179-200.

Dinh, D. T.; Frauman, A. G.; Johnston, C. I.; Fabiani, M. E. (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin. Sci. (Lond)*, 100, 481-492.

Douglas, J. G. & Hopfer, U. (1994) Novel aspects of angiotensin receptors and signal transduction in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.*, 56, 649-669.

Duran, M. J.; Pierre, S. V.; Carr, D. L.; Pressley, T. A. (2004) The Isoform-Specific Region of the Na,K-ATPase Catalytic Subunit: Role in Enzyme Kinetics and Regulation by Protein Kinase C. *Biochemistry*, 43, 16174-16183.

Dzau, V. J. (1988) Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circ.*, 77, 4-13.

Edwards C, R.; Benediktsson, R.; Lindsay, R. S.; Seckl, J. R. (1993) Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet*, 341, 355–357.

Efendiev, R.; Budu, C. E.; Cinelli, A. R.; Bertorello, A. M.; Pedemonte, C. H. (2003) Intracellular Na^+ regulates dopamine and angiotensin II receptors availability at the plasma membrane and their cellular responses in renal epithelia. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 28719-28726.

Eisen, E. J. (1976) Results of growth curve analyses in mice and rats. *J. Anim. Sci.*, 42, 1008-1023.

Ewart, H. S. & Klip, A. (1995) Hormonal regulation of the $(Na^+,K^+)ATPase$: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.*, 269, 295-311.

Férraille, E. & Doucet, A. (2001). Sodium-potassium-Adenosinetriphosphatase-Dependent Sodium Transport in the Kidney: Hormonal Control. *Physiol. Rev.*, 81, 345–418.

Fernandez-Twinn, D. S.; Ekizoglou, S.; Wayman, A.; Petry, C. J.; Ozanne, S. E. (2006) Maternal low-protein diet programs cardiac beta-adrenergic response and signaling in 3-mo-old male offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291, 429-436.

Forsen, T.; Eriksson, J. G.; Tuomilehto, J.; Osmond, C.; Barker, D. J. P. (1999) Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ.*, 319, 1403-1407.

Fowden, A. L.; Li, J.; Forhead, A. J. (1998) Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance. *Proc. Nutr. Soc.*, 57, 113–122.

Fowden, A. L.; Giussani, D. A.; Forhead, A. J. (2006) Intrauterine programming of physiological systems: Causes and consequences. *Physiology*, 21, 29–37.

Gluckman, P. D.; Hanson, M. A. (2008) Developmental and epigenetic pathways to obesity: an evolutionary-developmental perspective. *Int. J. Obes.*, 32, 62-71.

Grisk, O. & Rettig, R. (2001) Renal transplantation studies in genetic hypertension. *News Physiol. Sci.*, 16, 262-265.

Goodfriend, T. L. (2000) Angiotensin receptors: history and mysteries. *Am. J. Hypertens.*, 13, 442-449.

Guron, G. & Friberg, P. (2000) An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J. Hypertens.*, 18, 123–137.

Haithcock, D.; Jiao, H.; Cui, X. L.; Hopfer, U.; Douglas, J. G. (1999) Renal proximal tubular AT2 receptor: signaling and transport. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 69-74.

Hakam, A. C.; Hussain, T. (2006) Angiotensin II type receptor agonist directly inhibits proximal tubule sodium pump activity in obese but not in lean Zucker rats. *Hypertension*, 47, 1117-1124.

Hall, J. E.; Hildebrandt, D. A.; Kuo, J. (2001) Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am. J. Hypertens.*, 14, 103-115.

Haller, H.; Lindschau, C.; Luft, L. C. (1994) Role of protein kinase C in intracellular signaling. *Ann. NY Acad. Sci.*, 733, 313-324.

Hansen, J. L.; Servant, G.; Baranski, T. J.; Fujita, T.; Iiri, T.; Sheikh S. P. (2000) Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circ. Res.*, 87, 753-759.

Harding, J. E. & Johnson, B. (1995) Nutrition and fetal growth. *Reprod. Fertil.*, 7, 538-547.

Harris, J. M. & Gomez, R. A. (1997) Renin-angiotensin system genes in kidney development. *Microscopy Res. Tec.*, 39, 211-221.

Hoppe, C. C.; Evans, R. G.; Moritz, K. M.; Cullen-McEwen, L. A.; Fitzgerald, S. M.; Dowling, J.; Bertram, J. F. (2007) Combined prenatal and postnatal protein restriction influences adult kidney structure, function, and arterial pressure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292, 462-469.

Horisberger, D. J. (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology*, 19, 377-387.

Hostetter, T. H.; Olson, J. H.; Rennke, H. G.; Venkatachalam, M. A.; Brenner, B. M. (1981) Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am. J. Physiol.*, 241, 85-93.

Hoy, W. E.; Hughson, M. D.; Bertram, J. F.; Douglas-Denton, R.; Amann, K. (2005) Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 2557–2564.

Hsueh, W. A.; Do, Y. S.; Wang, P. H. (1991) Observations on the renal processing and sorting of prorenin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 69, 1327-1330.

Huang B.; Blanco,G.; Mercer, W. R.; Fleming,T.; Pepose,S. J.(2003) Human corneal endothelial cell expression of Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase isoforms. *Arch. Ophthalmol.*, 121, 840-845.

Hughson, M.; Farris, A. B.; Douglas-Denton, R.; Hoy, W. E.; Bertram, J. F. (2003) Glomerular number and size in autopsy kidneys: The relationship to birth weight. *Kidney Int.*, 63, 2113–2122.

Hunyady, L.; Balla, T.; Catt, K. J. (1996) The ligand binding site of the angiotensin AT₁ receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 135-140.

Jagadeesh, G. (1998) Angiotensin II receptors-antagonists, molecular biology, and signal transduction. *Indian J. Exp. Biol.*, 36, 1171-1194.

Jaisser, F.; Jaunin, P.; Geering, K.; Rossier, B. C.; Horisberger, J. D. (1994) Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. *The Journal of General Physiology*, 103, 605-623.

Jorgensen, L. P. & Pedersen, A. P. (2001) Structure–function relationships of Na⁺, K⁺-ATP, or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1505, 57-74.

Jorgensen, L. P.; Håkansson, O. K.; Karlsh, D. J. S. (2003) Structure and mechanism of (Na⁺,K⁺)ATPASE: Functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.*, 65, 817-849.

Kakar, S. S.; Sellers, J. C.; Devor, D. C.; Musgrove, L. C.; Neil, J. D. (1992) Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: Differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185, 1090-1096.

Kaplan, J. K (2002). Biochemistry of (Na⁺,K⁺)ATPase. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 511-535.

Katyare, S. S.; Modi, H. R.; Patel, S. P.; Patel, M. A. (2007) Thyroid Hormone-Induced Alterations in Membrane Structure-Function Relationships: Studies on Kinetic Properties of Rat Kidney Microsomal Na⁺,K⁺-ATPase and Lipid/Phospholipid Profiles. *J. Membr. Biol.*, 219, 71-81.

Kleinzeller, A.; & Janacek, K. (1962). A simple method of measuring steady-state ion compartments and rate constants of ion fluxes in tissue slices. *Biochim. biophys. Acta*, 59, 239-241.

Kobori, H.; Harrison-Bernard, L. M.; Navar L. G. (2001) Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, 37, 1329-1335.

Kumar, A. M.; Spitzer, A.; Gupta, R. K. (1986) Na NMR spectroscopy of proximal tubule suspensions. *Kidney International*, 29, 747-751.

Kumarasamy, V.; Mitchell, M. D.; Bloomfield, F. H.; Oliver, M. T.; Campbell, M. E.; Challis, J. R. G. (2005) Effects of periconceptual undernutrition on the initiation of parturition in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 288, 67-72.

Langley-Evans, S. C.; Phillips, G. J.; Benediktsson, R.; Gardner, D. S.; Edwards, C. R. W.; Jackson, A. A.; Seckl, J. R. (1996) Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension. *Placenta*, 17, 169-72.

Langley-Evans, S. C. (1997) Hypertension induced by fetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J. Hypertens.*, 15, 537-544.

Langley-Evans, S. C.; Dunn, R.; Jackson, A. (1998) Blood pressure changes programmed by exposure to maternal protein restriction are transmitted to a second generation through the germ line. *Proc. Nutr. Soc.*, 115, 57-78.

Langley-Evans, S. (2001) Fetal growth markers may show nutritionally mediated effect. *BMJ.*, 17, 323-352.

Langley-Evans, S. C.; Welham, S. J. M.; Jackson, A. A. (1999) Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sciences*, 64, 965-974.

Lara, L. C.; Cavalcante, F.; Axelband, F.; De Souza, A. M.; Gil Lopes, A.; Caruso-Neves, C. (2006) Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT₂-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na⁺-ATPase by Ang-(1-7). *Biochem. J.*, 395, 183-190.

Latorraca, M. Q.; Reis, M. A.; Carneiro, E. M.; Mello, M. A.; Velloso, L. A.; Saad, M. J.; Boschero, A. C. (1998) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J. Nutr.*, 128, 1643-1649.

Lindsay, R. S.; Lindsay, R. M.; Edwards, C. R. W.; Seckl, J. R. (1996) Inhibition of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in offspring. *Hypertension*, 27, 1200-1204.

Lingrel, J. B & Kuntzweiler, T. (1994) (Na⁺,K⁺)ATPase. *J. Biol. Chem.*, 269, 19659-19662.

Lisboa, P. C.; Passos, M. C.; Dutra, S. C.; Bonomo, I. T.; Denolato, A. T.; Reis, A. M.; Moura, E. G. (2005) Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm. Metab. Res.*, 38, 295-299.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Far, A. L.; Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Lucas, A. (1994) Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch. Dis. Child . Nutr.*, 71, 288-290.

Lucas, A. (1998) Programming by early nutrition: an experimental approach *J. Nutr.*, 128, 401-406.

Maia, J. C. C.; Gomes S. L.; Juliani, M. H. (1983) Preparation of (γ - ^{32}P)- and (α - ^{32}P)-nucleoside triphosphates with high specific activity, in: C. Morel (Ed.), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual Proceedings*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 146-167.

Malik, N.; Canfield, A. V.; Beckers, C. M.; Gros, P.; Levenson, R. (1996) Identification of the Mammalian Na,K-ATPase β 3 Subunit. *J. Biol. Chem.*, 271, 22754-22758.

Malnic, G.; Enokibara, H.; Aires, M. M.; Vieira, F.L. (1969) Effect of furosemid and NaCl-loading on chloride excretion in single nephrons of rat kidneys. *Pflugers. Arch.*, 309, 21-37

Manning, J.; Kathleen, B.; Mark, A. K.; Vehaskari, V. M. (2002) Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 283, 202–206.

Marín, R.; Obando, M. A.; Proverbio, T.; Proverbio, F. (1986) Effect of a high NaCl diet on the active mechanisms of a Na^+ extrusion in rat kidney. *Kidney Int.*, 30, 518-523.

Martin-Vasallo, P.; Dackowski, W.; Emanuel, J. R.; Levenson, R. (1989) Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.*, 264, 4613-4618.

Matos, A. C.; Ladeia, A. M. (2003) Assessment of cardiovascular risk factors in a rural community in the Brazilian state of Bahia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, Brasil, 81, 297-302.

Mc Donough, A. A.; Brownt, T. A.; Horowitz, B.; Chiu, R.; Schlotterbek.; Bowen, J.; Schimitt, C. A.; (1988) Thyroid hormone coordinately regulates Na⁺-K⁺-ATPase α - and β -subunit mRNA levels in kidney. *American journal of physiology*, 23, 323-329.

McEvoy, T. G.; Robinson, J. J.; Sinclair, K. D. (2001) Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction*, 122, 507–518.

McMullen, S.; Gardner, D. S.; Langley-Evans, S. C. (2003) Prenatal programming of Angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *Brit. J. Nutr.*, 91, 133–140

McMullen, S.; Gardner, D. S.; Langley-Evans, S. C. (2004) Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *Br. J. Nutr.*, 91, 133-140.

Mello-Aires, M. (1999) Visão morfofuncional do rim - IN *Fisiologia*. 2 ed. Mello-Aires, Capítulo 53, Rio de Janeiro, 561-573, Guanabara Koogan.

Monteiro, F. M. F.; Lahlou, S.; Albuquerque, J. A.; Cabral, A. M. S. (2001) Influence of a multideficient diet from northeastern Brazil on resting blood pressure and baroflex sensitivity in conscious, freely moving rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34, 271-280.

Moura, A. S.; Carpinelli, A. R.; Barbosa, F. B.; Gravena, C; Mathias, P. C.; de Sa, C. C. (1997) Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 96, 179-182

Moura, E. G.; Lisboa, P. C.; Passos, M. C. F. (2008) Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*, 15, 176–188.

Ministério da Saúde. Anuário Estatístico do Ministério da Saúde 2001. Indicadores de Saúde [monografia na internet]. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/aplicações/anuario/2001> Acesso em 04 jan. 2009.

Monk, M. (1995) Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev. Genet.*, 17, 188-197.

Monteiro, C. A. (2003) A dimensão da pobreza , da fome e da desnutrição no brasil. 24, 195-207.

Moura, E. G.; Lisboa, P. C.; Custódio, C. M.; Nunes, M. T.; Souza, K. P.; Passos, M. C. F. (2007) Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 134-139.

Mukherjea, R.; Castonguay, T. W.; Douglass, L. W.; Moser-Veillon, P. (1999) Elevated leptin concentrations in pregnancy and lactation: possible role as a modulator of substrate utilization. *Life Sci.*, 65, 1183-1193.

Muller, M. & Kersten, S. (2003) Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 315-322.

Mullins, J. J.; Peters, J.; Ganten, D. (1990) Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*, 344, 541-544.

Mullins, L. J.; Bailey, M. A.; Mullins, J. J. (2006) Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiol. Rev.*, 86, 709-746.

Neri, C. M. & Carvalhaes, L. (2008) Miséria e a nova classe média na década da igualdade. Disponível em: <http://www.fgv.br/cps/desigualdade>. Acesso em 24 nov. 2008.

Nejad, K. Z.; Luyckx, V. A.; Brenner, B. M. (2006) Adult hypertension and kidney disease – The role of fetal programming. *Hypertension.*, 47, 502-508.

Nishimura, H.; Walker, O. E.; Patton, C. M.; Madison, A. B.; Chiu, A. T.; Keiser, J. (1994) Novel angiotensin receptor subtypes in fowl. *Am. J. Physiol.*, 267, 1174-1181.

Nishiyama, A.; Seth, D. M.; Navar, L. G. (2002) Renal interstitial fluid angiotensin I and angiotensin II concentrations during local angiotensin-converting enzyme inhibition. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13, 2207-2212.

Nuyt, A. M.; Szyf, M. (2008) Developmental programming through epigenetic changes. *Cir. Res.*, 100, 452-455.

Nyrienda, M. J.; Lindsay, R. S.; Kenyon, C. J.; Burchell, A.; Seckl, J. R. (1998) 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.*, 101, 2174–2181.

Nyrienda, M. J.; Welberg, L. A.; Seckl, J. R. (2001) Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence? *J. Endocrinol.* 170, 653-660.

Oliver, J. D.; Simons, J. L.; Troy, J. L.; Provoost, A. P.; Brenner, B. M.; Deen, W. M. (1994) Proteinuria and impaired glomerular permselectivity in uninephrectomized fawn-hooded rats. *Am. J. Physiol.*, 267, 917-925.

OMS. (2007) Manejo da desnutrição grave: um manual para profissionais de saúde de nível superior (médicos, enfermeiros, nutricionistas e outros) e seus auxiliares. Genebra/Brasília: Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 24 nov. 2008.

Opolski, G. & Filipiak, K. J. (2000) Drugs blocking renin-angiotensin-aldosteron system. Wroclaw, Urban & Partner.

Or, R. G.; Shainskaya, A.; Karlsh, S. J. D (1998) Specific cross-link between fragments of proteolyzed (Na⁺,K⁺)ATPase induced by o-phthalaldehyde. *Biochem.*, 37, 8197-8207.

Ozono, R.; Wang, Z. Q.; Moore, A. F.; Inagami, T.; Siragy, H. M.; Carey, R. M. (1997) Expression of the subtype-2 angiotensin II (AT₂) receptor protein in rat heart. *Hypertension*, 30, 1238-1246.

Paixão, A. D.; Maciel C. R.; Teles, M. B.; Figueiredo-Silva, J. (2001) Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biol. Neonate.*, 80, 239-246.

Park, J. H.; Stoffers, D. A.; Nicholls, R. D.; Simmons, R. A. (2008) Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest.*, 118, 2316-2324.

Passos, M. C. F.; Ramos, C. F.; Moura, E. G. (2000) Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research*, 20, 1603-1612.

Passos, M. C. F.; Ramos, C. F.; Dutra, S. C. P.; Mouco, T.; Moura, E. G. (2002) Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Hormone Metabolic, Research*, 34, 40-43.

Passos, M. C. F.; Vicente, L. L.; Lisboa, P. C.; Moura, E. G. (2004) Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult animals whose mothers were malnourished during lactation. *Horm. Metabolic Research*, 36, 625-629.

Patel, M.S.; Srinivasan, M.; Laychock, S.G.; (2009) Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 32, 218-28.

Paul, M.; Poyan, M. A.; Kreutz R. (2006). *Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems* *Physiol. Rev.*, 86, 747-803.

Peach, M. J. (1977) Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol. Rev.*, 57, 313-370.

Pham, T. D.; MacLennan, N. K.; Chiu, C. T.; Laksana, G. S.; Hsu, J. L.; Lane, R. H. (2003) Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285, 962–970.

Pitts, R. F. (1968) *Physiology of the Kidney and Body Fluids*, 2nd. edn., p. 97, Year Book Medical Publishers, Chicago.

Porteous, S.; Torban, E.; Cho, N. P.; Cunliffe, H.; Chua, L.; McNoe, L.; Ward, T.; Souza, C.; Gus, P.; Giugliani, R.; Sato, T.; Yun, K.; Favor, J.; Sicotte, M.; Goodyer, P.; Eccles, M. (2000) Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2 (1Neu) $_/_$ mutant mice. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1–11.

Pratt, R. E.; Zuo, W. M.; Naftilan, A.; Ingelfinger, J. R.; Dzau, V. J. (1989) Altered sodium regulation of renal angiotensinogen mRNA in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol.*, 256, 469–474.

Proverbio, F.; Condrescu-Guidi, M.; Whittembury, G. (1975) Ouabain-insensitive Na^+ stimulation of Na^+ Mg^{+2} -dependent ATPase in kidney tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 394, 281-292.

Proverbio, F. & Del Castillo, J. R. (1981) Na^+ -stimulated ATPase activities in kidney basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 646, 99-108.

Proverbio, F.; Proverbio, T.; Matteo, R. G.; Perrone, T. M.; Marín, R. (1988a) Na-pump activity in rat activity in rat kidney cortex cells and its relationship with the cell volume. *FEBS Lett.*, 236, 318-320.

Proverbio, F.; Duque, J. A.; Proverbio, T. & Marín, R. (1988b) Cell volume-sensitive Na^+ -ATPase activity in rat kidney cortex cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 941, 107-110.

Proverbio, F.; Marín, F.; Proverbio, T. (1989) The “second” sodium pump and cell volume. *Curr. Topics Membr. Transp.*, 34, 105-120.

Rangel, L. B. A.; Caruso-Neves, C.; Lara, L. S.; Brasil, F. L.; Lopes, A. G. (1999) Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1416, 309-319.

Rangel, L. B. A.; Caruso-Neves, C.; Lara, L. S.; Lopes, A. G. (2002) Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na^+ -ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1564, 310-316.

Rangel, L. B.; Lopes, A. G.; Lara, L. S.; Carvalho, T. L.; Silva, I. V.; Oliveira, M. M.; Einicker-Lamas, M.; Vieyra, A.; Nogaroli, L. & Caruso-Neves, C. (2005) PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na^+ -ATPase by angiotensin II. *Regul. Pept.*, 127, 177-182.

Re, R. N. (2003) Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension*, 42, 117-122.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. Jr. (1993) AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 123, 1939-1951.

Rheinisch, J. M.; Simon, N. G.; Karow, W. G.; Gandelman, R. (1978) Prenatal exposure to prednisolone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science*, 202, 436–438.

Rich-Edwards, J. W.; Stampfer, M. J.; Manson, J.; Rosner, B.; Hankinson, S. E.; Colditz, G. A.; Willet, W. C.; Hennekens, C. (1997) Birth weight and risk of

cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *Brit. Med. J.*, 315, 396-400.

Riordan, J. F. (1995) Angiotensin II, biosynthesis, molecular recognition, and signal transduction. *Cell. Molec. Neurobiol.*, 15, 637- 651.

Rivard, C. J.; Almeida, N. E.; Berl, T. & Capasso J. M. (2005). The gamma subunit of Na/K-ATPase: an exceptional, small transmembrane protein. *Front. Biosci.*, 10, 2604-2610.

Sahajpal, V. & Ashton, N. (2003) Renal function and angiotensin AT₁ receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. *Clinical Science*, 104, 607–614.

Sahajpal, V. & Ashton, N. (2005). Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J. Physiol.*, 563, 193-201.

Salamanca, D. A. & Khalil, R. A. (2005) Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem. Pharmacol.*, 70, 1537-1547.

Schnermann, J. B. & Sayegh, S. I. (eds). *Kidney Physiology*, 1 ed. Lippincott: Raven Press, 1998.

Sealey, J. E.; Blumenfeld, J. D.; Bell, G. M.; Pecker, M. S.; Sommers, S. C.; Laragh, J. H. (1988) On the renal basis for essential hypertension: nephron heterogeneity with discordant renin secretion and sodium excretion causing a hypertensive vasoconstriction-volume relationship. *J. Hypertens.*, 6, 763-777.

Segall, L.; Daly, E. S.; Blostein, R. (2001) Mechanistic basis for kinetic differences between the Rat α_1 , α_2 , and α_3 Isoforms of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 276, 31535-31541.

Seldin, D. W. & Giebisch, G. (1992) eds. *The Kidney: physiology and Pathophysiology*, 2nd ed. New York: Raven Press.

Shamraj, O. I. & Lingrel, J. B. (1994). A putative fourth (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 12952-12956.

Sherman, R. C. & Langley-Evans S. C. (2000) Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clinical Science*, 98, 269-275.

Shyjan, A. W.; Ceña, V.; Klein, D. C.; Levenson, R. (1990) Differential expression and enzymatic properties of the (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha 3 isoenzyme in rat pineal glands. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1178–1182.

Singhal, A.; Farooqi, S. I.; O'Rahilly, S.; Cole, T. J.; Fewtrell, M.; Lucas, A. (2002) Early nutrition and leptin concentrations in later life. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 993-999.

Skou, J. C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 394-401.

Solomon, S. (1977) Developmental change in nephron number, proximal tubular length and superficial nephron glomerular filtration rate of rats. *J. Physiol.*, 272, 573-589.

Sorenson, C. M.; Rogers, S. A., Korsmeyer, S. J.; Hammerman, M. R. (1995) Fulminant metanephric apoptosis and abnormal kidney development in bcl-2-deficient mice. *Am. J. Physiol.*, 268, 73–81.

Soubrier, F.; Wei, L.; Hubert, C.; Clauser, E.; Alhenc-Gelas, F.; Corvol, P. (1993) Molecular biology of angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J. Hypertens.*, 11, 599-604.

Staessen, J. A.; Wang, J.; Bianchi, G.; Birkenhager, W. H. (2003) Essential hypertension. *Lancet*, 361, 1629 –1641.

Stepp, D. W.; Boesen, E. I.; Sullivan, J. C.; Mintz, J. D.; Hair, C. D.; Pollock, D. M. (2007) Obesity augments vasoconstrictor reactivity to angiotensin II in the renal circulation of the Zucker rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 293, 2537-2542.

Taussky, H. H.; Shorr, E. (1952) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 202, 675-682.

Teixeira, C. V.; Passos, M. C. F.; Ramos, C. F.; Dutra, S. C. P.; Moura, E. G. (2002) Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 493-498.

The State of The World's Children. (2007). Disponível em: <http://www.unicef.org>. Acesso em 20 nov.2008.

Therien, A. G. & Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 279, 541-566.

Thomas, W. G. & Mendelsohn, F. A. (2003) Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35, 774-779.

Thorvaldsen, J. L. & Bartolomei, M. S. (2000) Molecular biology. Mothers setting boundaries. *Science*, 288, 2145-2146.

Tonkiss, J.; Trzcinska, M.; Galler, J. R.; Ruiz-Opazo, N. (1998) Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry. *Hypertension*, 32, 108-114.

Toyoshima, C & Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430, 529-535.

Tsutsumi, K. & Saavedra, J. M. (1991) Angiotensin-II receptor subtypes in median eminence and basal forebrain areas involved in regulation of pituitary function. *Endocrinol.*, 129, 3001-3008.

Tubino, J. (2007) Porque investir na redução da fome e da miséria. (2007). Disponível em: <http://www.fomezero.gov.br/artigo>. Acesso em 9 nov. 2008.

United Nations World Food Programme. (2006). Disponível em: <http://www.wfp.org>. Acesso em: 20 nov. 2008.

Ullrich, K. J. (1979) Sugar, Amino Acid, and Na^+ Cotransport in the Proximal Tubule. *Annual Review of Physiology*, 41, 181-195.

Vehaskari, V. M.; Aviles, D. H.; Manning, J. (2001) Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int.*, 59, 238–245.

Vehaskari, V. M.; Stewart, T.; Lafont, D.; Soyez, C.; Seth, D.; Manning, J. (2004) Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 287, 262–267.

Vicente, L. L.; Moura, E. G.; Lisboa, P. C.; Costa, A. M. A.; Amadeu, T.; Mandarim-de-Lacerda, C. A.; Passos, M. C. F. (2004). Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of Adult offspring. *Nutrition*, 20, 924–928.

Vieira-Filho, L. D.; Lara, L. S.; Silva, P. A.; Luzardo, R.; Einicker-Lamas, M.; Cardoso, H. D.; Paixão, A. D.; Vieyra, A. (2009) Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in the offspring. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*

Vieyra, A.; Nachbin, L.; De Dios-Abad, E.; Goldfeld, M.; Meyer-Fernandes, J.R.; De Moraes, L. (1986) Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J. Biol. Chem.*, 9, 4247-4255.

Vieyra, A. (1996) Catalytic and structural modifications of sarcoplasmic reticulum and plasma membrane (Ca(2+) + Mg(2+)) ATPases induced by organic solutes that accumulate in living systems. *Biosci. Rep.*, 16, 115-27.

Vignery, A.; Wang, F.; Qian, H. Y.; Benz, E. J.; Gilmore-Hebert, M. (1990) Detection of the Na(+)-K(+)-ATPase alpha 3-isoform in multinucleated macrophages. *Am. J. Physiol.*, 260, 704-709.

Xésus, C.; Veronica, P.; Maria, A. T.; Roberto, P.; Carlos, D.; Felipe, F. C. (1997) Presence of Leptin in Colostrum and/or Breast Milk from Lactating Mothers: A Potential Role in the Regulation of Neonatal Food Intake. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 4270-4273.

Wang, Z. Q.; Moore, A. F.; Ozono, R.; Siragy, H. M.; Carey, R. M. (1998) Immunolocalization of subtype 2 angiotensin II (AT₂) receptor protein in the rat kidney. *Hypertension*, 32, 78-83.

Waterland, R. A. & Garza, C. (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 128, 179-197.

Weaver, I. C.; Cervoni, N.; Champagne, F. A.; D'Alessio, A. C.; Sharma, S.; Seckl, J. R.; Dymov, S.; Szyf, M.; Meaney, M. J. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.*, 7, 847-854.

Welham, S. J.; Wade, A.; Woolf, A. S. (2002) Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int.*, 61, 1231-1242.

Wharton, J.; Morgan, K.; Rutherford, R. A. D.; Catravas, J. D.; Chester, A.; Whitebread, B. F.; de Leval, M. R.; Yacoub, M. H. & Polak, J. M. (1998) Differential

distribution of angiotensin AT₂ receptors in the normal and failure human heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284, 323-336.

Whittembury, G. & Fishman, J. (1969) Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused toad kidney: the effect of K, ouabain and ethacrynic acid. *Pflügers Arch.*, 307, 138-153.

Whittembury, G. & Proverbio, F. (1970) Two models of Na extrusion in cells from guinea-pig kidney cortex slices. *Pflügers Arch.*, 316, 1-25.

WHO. (1995) *The world health report: Bridging the Gaps*. Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 20 nov. 2008.

Whorwood, C. B.; Firth, K. M.; Budge, H.; Symonds, M. E. (2001) Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin II receptor in neonatal sheep. *Endocrinol.*, 142, 2854–2864.

Woods, L. L. & Rasch, R. (1998) Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *Am. J. Physiol.*, 275, 1593–1599.

Woods, L. L.; Ingelfinger, J. R.; Nyengaard, J. R.; Rasch, R. (2001) Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr. Res.*, 49, 460–467.

Zhou, J.; Ernsberger, P.; Douglas, J. G. (1993) A novel angiotensin receptor subtype on rat mesangium coupling to adenylyl cyclase. *Hypertension*, 21, 1035-1038.

**CO-AUTORIA DE TRABALHOS COMPLETOS RESULTANTES DA
COLABORAÇÃO ENTRE O DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO E O
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
(PROCAD/CAPES 008052)**

CEPP-09-0014.R3

Original Article - Kidney

Submitted: 09-Jan-2009

Revision Submitted: 18-Apr-2009

Accepted: 20-Apr-2009

Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in the offspring

Leucio D. Vieira-Filho^a, Lucienne S. Lara^{b,d}, Paulo A. Silva^{c,d}, Ricardo Luzardo^{c,d}, Marcelo Einicker-Lamas^{c,d}, Henriqueta D. Cardoso^a, Ana D. O. Paixão^{a,*}, Adalberto Vieyra^{c,d}

*Corresponding Author. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50760-901 Recife, PE, Brazil; ^bInstituto de Ciências Biomédicas and ^cInstituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ^dInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Short title: Sodium ATPases in prenatally malnourished rats

This is an Accepted Article that has been peer-reviewed and approved for publication in the *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, but has yet to undergo copy-editing and proof correction. Please cite this article as an “Accepted Article”; doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05212.x

Summary

- 1) Intrauterine malnutrition has been linked to the development of adult cardiovascular and renal diseases, which are related to altered Na^+ balance. Here we investigated whether maternal malnutrition increases placental oxidative stress with subsequent impact on renal ATP-dependent Na^+ transporters in the offspring.
- 2) Maternal malnutrition was induced in rats during pregnancy by using a basic regional diet available in Northeastern Brazil. Placental oxidative stress was evaluated by measuring thiobarbituric acid-reactive substances, which were 35-40% higher in malnourished dams (MaIN). Na^+ pumps were evaluated in control and prenatally malnourished rats (25 and 90 days old).
- 3) $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity was identical in both groups at 25 days ($\sim 150 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$); it increased 40% with growth in control rats but remained constant in pups from MaIN.
- 4) In contrast, in juvenile rats, the ouabain-insensitive $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ was higher in MaIN than in controls (70 vs 25 $\text{nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Nevertheless, it did not accompany kidney and body growth: at 90 days it was 50% lower in MaIN than in controls. The maximal stimulation of the $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ by angiotensin II was 35% lower in MaIN than in control rats and was attained only with a much higher concentration of the peptide (10^{-10} M) than in controls (10^{-14} M).
- 5) Protein kinase C activity, which mediates the effects of angiotensin II on $\text{Na}^+-\text{ATPase}$, reached one third of the normal value.
- 6) These results indicate that the placental oxidative stress may contribute to fetal undernutrition, which leads to later disturbances in Na^+ pumps from proximal tubule cells.

Key-words: undernutrition, fetal development, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, ouabain-insensitive $\text{Na}^+-\text{ATPase}$

Introduction

Intrauterine malnutrition has been linked to growth retardation and increased risk of developing cardiovascular^{1,2}, renal³ and metabolic diseases⁴ in adult life. Increased maternal oxidative stress, specifically in the plasma and erythrocytes, has been seen in adverse conditions, such as diabetes⁵. It has been hypothesized that oxidative stress, through increase of thromboxane and decrease of nitric oxide levels, influences the placenta-fetus relationship^{6,7} compromising fetal nutrition. Furthermore, oxidative stress may impair the structure and function of cellular proteins involved in regulating signal transduction pathways and gene expression⁸. Recently, Proverbio and coworkers showed that placental hypoxia led to increased formation of reactive oxygen species, which can affect active ion transporters⁹. Kidneys of offspring from malnourished rat mothers also show elevated production of reactive oxygen species¹⁰ and, in addition, they can develop oligonephroenia¹¹⁻¹³, increased renin activity¹⁴, increased angiotensin II AT₁ receptor expression¹⁵ and up-regulation of Na⁺ transporters¹⁶. All these alterations may induce a positive Na⁺ balance and lead to hypertension and its consequences in adult life^{1,2}.

Even though the final control of renal Na⁺ reabsorption does not occur in the proximal tubule, there is evidence of increased proximal tubule sodium reabsorption in hypertensive subjects¹⁷ and also in spontaneously hypertensive rats¹⁸. In the basolateral membranes of tubule cells, (Na⁺+K⁺)ATPase is the molecular machinery that couples energy derived from ATP hydrolysis to bulk active Na⁺ fluxes across the epithelium¹⁹. A second Na⁺ pump, the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase, has been associated with the fine tuning of proximal Na⁺ reabsorption²⁰⁻²² and it is strongly stimulated by administration of a superoxide-generating mixture²¹. This second Na⁺ pump is regulated by a complex membrane-bound signaling cascade in which the renin-angiotensin system (RAS) and protein kinase C (PKC) play a crucial role^{20,22}. This kinase is also considered an important biological sensor of oxidative stress in different tissues^{23,24}.

The aim of this study was threefold: (i) to investigate whether maternal malnutrition increases placental oxidative stress, (ii) to investigate whether possible changes in the formation of reactive oxygen species at a placental level are accompanied by changes in (Na⁺+K⁺)ATPase, Na⁺-ATPase and PKC activities in

the proximal tubule cells of offspring, (iii) to evaluate whether maternal undernutrition affects the response of the Na⁺-ATPase to angiotensin II (Ang II).

Materials and methods

Ethical considerations

All experimental procedures involving the animals were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal Universities of Pernambuco and Rio de Janeiro, and they were carried out in accordance with the Committee's guidelines.

Experimental animals

Female Wistar rats weighing 200-250 g were randomly mated and the presence of spermatozooids in their vaginal plugs designated the first day of gestation. Dams were given standard pellet chow (control group, n = 10), or a deficient diet that mimics that one widely used in Northeast Brazil (prenatally malnourished group, MaIN group, n = 11), throughout mating and pregnancy. In some dams in each group (Control, n = 6; MaIN, n = 7) gestation was interrupted at the 20th day to evaluate placental and hepatic oxidative stress. Fetal body weight and kidney weight were recorded and the dams were killed under anesthesia by lesion of the diaphragm. Four dams of each group (Control and MaIN) carried to term and at the day of birth, each litter was culled to 8 pups and the males were weighed (13 in Control and 16 in MaIN). Therefore the further studies represent programming of 4 dams. At 25 days of age, the male offspring were weaned on standard diet. To study Na⁺ transporters, they were sacrificed by cervical rupture at 25 days (Control, n = 5; MaIN, n = 4) or 90 days (Control, n = 8; MaIN, n = 12).

Diet

Malnutrition was induced through a deficient diet as previously described^{10,25}. The ingredients of the diet (g/g%) comprised beans (18.3), manioc flour (64.8), jerked meat (3.7) and sweet potato (12.8), which were cooked, dehydrated at 60°C and pulverized. All components were mixed with water. Meat fat (0.35%) was then

added and the mixture was shaped into balls that were dehydrated at 60°C for 24 h. The content of main dietary nutrients is shown in Table 1.

Evaluation of placental oxidative stress

On day 20 of gestation, dams were anesthetized with sodium pentobarbitone (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos), 60 mg/kg ip, to remove the placentas and liver. Placental and hepatic oxidative stress was evaluated using levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Buege and Aust²⁶. The tissue was macerated in 5 ml of 1.15% KCl per gram in an ice bath. Subsequently, 1 ml of 0.375% (w/v) thiobarbituric acid (Sigma-Aldrich) in 75% (w/v) trichloroacetic acid (Vetec Química Fina Ltda.) was added to each milliliter of tissue homogenate. The tubes were sealed and heated in a water bath at 100°C for 15 min. After cooling, the protein precipitate was centrifuged for 10 min, the supernatant separated and the absorbance measured at 535 nm.

Preparation of isolated membranes

Isolated membranes were used to measure the two Na⁺-stimulated ATPase activities and the PKC activity. The membranes were prepared as previously described²⁷ from the outer cortex (*cortex corticis*) of kidneys of animals aged 25 and 90 days. In this region of renal tissue, more than 90% of the cell population corresponds to proximal tubules^{28,29}. The kidneys were collected after sacrifice and maintained in a cold isotonic buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES-Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA and 0.15 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich; type II-S). Thin transverse slices of the *cortex corticis* (0.5 mm thick) were removed using a Stadie-Riggs microtome and carefully dissected using iridectomy scissors to avoid contamination with the rest of the tissue. The suspension of fragments was homogenized in the same cold solution (4 ml/g) using a Teflon/glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 10,000×g for 15 min at 4°C in a Sorvall RC-5B centrifuge using a SS-34 rotor, and the resulting supernatant was centrifuged at 15,000×g for 20 min. Finally, another centrifugation was performed in a Beckman L5-50B ultracentrifuge at 35000×g for 45 min using a 70 Ti rotor; the pellet was resuspended in 250 mM sucrose to a final concentration of 15-30 mg protein/ml, aliquoted into tubes and stored at -20°C. Protein concentration was determined by

the Folin phenol method³⁰ using bovine serum albumin as a standard; 2.5% (w/v) SDS was added to solubilize the integral membrane proteins.

Measurement of ATPase activities

Activities of the (Na⁺+K⁺)ATPase and ouabain-insensitive Na⁺-ATPase were measured colorimetrically using unlabelled ATP³¹ or [γ -³²P]ATP³², respectively. In (Na⁺+K⁺)ATPase assays the membranes (0.1 mg/ml final concentration) were preincubated at 37°C for 20 min with or without 2 mM ouabain (Sigma-Aldrich). Except when the effects of varying Na⁺ and K⁺ concentrations were examined (Fig. 2B), the assay mixtures were then supplemented with 50 mM Bis-Tris-propane (pH 7.4), 0.2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ and 120 mM NaCl. The hydrolysis reaction was started by adding ATP (5 mM) and KCl (24 mM) and stopped after 10 min by adding two vol of 0.1 M HCl-activated charcoal. The (Na⁺+K⁺)ATPase activity was calculated as the difference between the P_i released in the absence and presence of ouabain. The released P_i was spectrophotometrically measured in an aliquot of 0.2 ml of the supernatant obtained after centrifugation of the charcoal suspension at 1500×g for 5 min.

The ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity was calculated from the difference between the [³²P]P_i released in the absence and the presence of 2 mM furosemide (Sigma-Aldrich). The hydrolysis reaction was started by adding [γ -³²P]ATP (5 mM, specific activity ~1.7×10⁶ cpm/nmol) to the membranes (0.2 mg/ml) preincubated with 2 mM ouabain, as described above, in the presence of 20 mM Hepes-Tris (pH 7.0), 10 mM MgCl₂ and 120 mM NaCl. After 10 min the reaction was stopped by adding two vol 0.1 M HCl-activated charcoal. The released [³²P]P_i was measured by liquid scintillation counting (Packard) in an aliquot of 0.2 ml of the supernatant obtained after centrifugation of the charcoal suspension (1500×g for 5 min).

PKC activity

The PKC activity was analyzed by measuring the incorporation of the γ -phosphoryl group of [γ -³²P]ATP (specific activity ~6.6×10⁷ cpm/nmol) into histone in the absence and presence of 10 nM calphostin C (Sigma-Aldrich), an inhibitor of diacylglycerol-activated PKCs. The reaction was started by adding [γ -³²P]ATP (10

μM) to a reaction medium (0.1 ml) containing 20 mM Hepes-Tris (pH 7.0), 4 mM MgCl_2 , 1.5 mg/ml histone and 0.7 mg/ml membrane protein. After 10 min, the reaction was stopped with 0.1 ml 40% (w/v) TCA and the sample was immediately placed on ice. An aliquot (0.1 ml) was removed immediately after vigorous stirring, filtered through a Millipore filter (0.45 μm pore size) and washed with ice-cold 20% (w/v) TCA and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). The radioactivity was quantified in a liquid scintillation counter (Packard).

Statistical analysis

The data are presented as means \pm S.E.M. Differences between groups were analyzed using an unpaired Student's *t*-test, while one-way ANOVA, followed by Tukey post-test, was used to verify differences among experimental groups. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

General data on dams and offspring

Maternal data are shown in Table 2. The total weight gain and dietary intake during 20 days of pregnancy were lower ($p < 0.01$) in MaIN than in control dams, although the energy intake was similar in the two groups because the deficient diet is hypercaloric. MaIN dams also showed lower placental weight and poorer reproductive outcome than control dams. On the other hand, TBARS levels in the placenta were significantly higher in the MaIN group than the controls (Fig. 1); this difference was also found in liver, the control organ for induced oxidative stress (inset to Fig. 1). The fetuses from MaIN had lower body weights than those from controls. Fetal kidney weight was also lower in the MaIN than the control group but the kidney weight/body weight ratio was similar in the two groups. The lower body weight of the MaIN group fetuses persisted at birth and also at weaning, but recovered to a normal value at 90 days after birth, presumably because of the normal diet. MaIN animals presented birth weight lower than that shown by control group, either those designated for the protocol at age of 25 days (5.98 ± 0.11 vs. 6.82 ± 0.06 , respectively, $p < 0.05$) or those designated for the protocol at age of 90

days (5.21 ± 0.23 vs. 6.06 ± 0.15 g, respectively, $p < 0.05$). Irrespective of age, the kidney weight/body weight ratio remained similar in the two groups (Table 3).

Proximal tubule ($\text{Na}^+\text{+K}^+$)ATPase and Na^+ -ATPase activities

($\text{Na}^+\text{+K}^+$)ATPase activity was the same in the control and MalN groups at 25 days after birth. It increased by 35-40% in the control group but not in the MalN group at 90 days after birth (Fig. 2A). Thus, at 90 days ($\text{Na}^+\text{+K}^+$)ATPase activity was lower in the MalN than in the control group, even over a broad range of Na^+ and K^+ concentrations (sum constant and equal to 150 mM; Fig. 2B). For the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase, the abnormal growth trajectory gave the opposite picture: the activity of this enzyme increased rapidly to a value well above of the control at 25 days and then stopped (Fig. 3A), so it did not follow body growth, which showed normal mass at 90 days (Table 3). In contrast, the activity of this second Na^+ pump increased more than four times between 25 and 90 days in the control group, in parallel with body weight (Table 3). Thus, at 90 days, the Na^+ -ATPase activity in MalN was significantly lower than that in controls, despite the initial burst at 25 days.

Effects of angiotensin II on proximal tubule Na^+ -ATPase activity

At the age of 90 days, the Na^+ -ATPase activity in the control group responded biphasically to a range of angiotensin II (Ang II) concentrations (Fig. 3B): (i) between 10^{-14} and 10^{-12} M Ang II it increased by 50%; (ii) at higher concentrations it returned to baseline values. In contrast, the Ang II dependence of Na^+ -ATPase activity in MalN showed a flattened bell-like curve with maximum stimulation at 10^{-10} M, though the activity under these conditions was only about the same as the unstimulated activity in the control group.

PKC activity in membranes from proximal tubule cells

Since membrane-associated PKC is a key mediator of the Ang II effects on the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase in kidney cells²², its activity was measured at 90 days after birth, when the pump was inhibited in the MalN group (Fig. 3). Figure 4 shows that PKC activity, like Na^+ -ATPase activity, was lower in MalN than in the control group.

Discussion

In the present work we studied the influence of maternal undernutrition on placental oxidative stress and its consequences for renal active Na^+ transport. Na^+ fluxes across the tubular epithelium account for much of the metabolic expenditure in kidney tissue and are responsible for water and salt conservation in mammals in both early and adult life¹⁹. Here, maternal malnutrition was induced by using a diet that mimics a basic regional diet widely consumed in an area of sugarcane cultivation along the coast of Pernambuco State, Brazil^{10,25}. This diet has been linked with both lower weight gain and maternal dietary intake, probably because of its low protein content and hypercaloric features, respectively. MalN mothers had fewer fetuses than controls, and the nodular and cystic formations found during placenta withdrawal (not shown) indicate fetal reabsorption, which could be a consequence of the very low calcium content of the diet (Table 1). Deficiency of calcium as well as other micronutrients has been implicated in different pregnancy complications, including fetal wastage³³. It is important to mention that, depending on the region and on the season, the mineral composition of the deficient Northeastern Brazilian diet can vary, as in other regions worldwide³⁴.

The MalN body weight at the 20th day of fetal life and at birth indicates intrauterine growth retardation, which persisted at weaning but was completely recovered during the growth trajectory between 25 and 90 days. The metabolic acceleration that supports the more rapid growth observed in this study may be pertinent to the fact that prenatal undernutrition often leads to overweight offspring³⁵. The lowered fetal weight in the MalN group coexists with lowered placental weight, as has been shown in other intrauterine growth retardation studies³⁶. More importantly, the MalN dams showed elevated placental oxidative stress, probably because of undernutrition-associated hypoxia^{9,37}, thus explaining the reduced body weight at birth and in the early stages of growth (Table 2).

It may be considered, therefore, the possibility that placental production of reactive oxygen species in MalN rats (Fig. 1) are correlated with the huge increase in ouabain-insensitive Na^+ -ATPase in young (25 day old) rats (Fig. 3A) as well as in the abnormal response to Ang II (Fig. 3B) and in the down-regulation of PKC (Fig. 4). In a recent paper, Beltowski and coworkers²¹ demonstrated that elevation of renal ouabain-insensitive Na^+ -ATPase is related to an increase in reactive oxygen species.

These peroxide intermediates lead to high Na^+ -ATPase activities by scavenging NO and limiting its inhibition of the pump. The view above is supported by the recent observation from our laboratory that production of TBARS is increased in prenatally malnourished juvenile rats¹⁰. Other factors such as circulating cortisol³⁸ and altered RAS^{14,15,39} can also contribute to the production of reactive oxygen species. Altogether, these stressful conditions that affect the maternal intrauterine environment and fetal organs, including the kidney and its Na^+ transporters, may lead to renal and cardiovascular alterations in the adult offspring¹⁻³.

Comparison of Figs. 2A and 3A indicates, however, that the two active Na^+ transporters in the proximal tubules of the offspring are affected by maternal undernutrition in opposite ways during the growth trajectory from 25 to 90 days, *i.e.* during the period of kidney maturation⁴⁰. The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity is identical in both groups at 25 days, but does not increase concomitantly with body weight in MalN. Since this pump is considered to be responsible for most Na^+ (and water) reabsorption¹⁹ in both infants and adults, its decreased activity in adulthood might indicate a global impairment of kidney development. At the end of this period, the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activity, which is strongly stimulated in early life (probably as a consequence of the placental oxidative stress²¹, shows no further change, also reflecting compromised renal growth and fewer tubules¹¹⁻¹³ despite the recovery of normal kidney and body weight (Table 3).

Hypertension in weaning rats from undernourished mothers has been associated with RAS¹⁴. Although the possible link between enhanced Na^+ -ATPase activity in MalN offspring and Ang II levels has not yet been studied, other models of prenatal malnutrition have shown increased plasma angiotensin converting enzyme (ACE)¹⁴ and increased plasma renin activity⁴¹ in juvenile animals. However at an early age of four weeks, prenatal malnourished rats have not developed hypertension⁴², despite these enzyme modifications. Thus, the early activation of Na^+ -ATPase at 25 days, provides the hypothesis that the fine-tuned Na^+ reabsorption is inappropriately elevated in these rats before development of hypertension. Current experiments in a model of perinatal undernutrition show an early increase in Na^+ -ATPase which is not accompanied by altered blood pressure (unpublished data from our laboratory). These observations and those from Vehaskari and coworkers⁴² add support to the view that an early disturbed Na^+ handling precedes late arterial pressure alterations.

It has been proposed that the post-weaning period could be a critical window for changing blood pressures during adulthood by modulating RAS activity when animals are submitted to prenatal undernutrition⁴¹. A question emerges from this reasoning. Maternal malnutrition has been related to increased Na^+ and fluid reabsorption during the early stages of hypertension⁴¹, so how can this fact be reconciled with the reduced $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ and $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$ activities in the proximal tubules of adult MalN rats? (Figs. 2 and 3). If RAS, and therefore aldosterone production, is activated in young rats from undernourished mothers⁴³ and this stimulation persists as a programmed effect, a compensatory augment in Na^+ may occur in aldosterone-responsive distal nephron segments such as the convoluted distal tubule⁴⁴. This view is supported by the observation of Bertram and coworkers⁴⁵ that increased mRNA for the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ α -subunit, which is responsive to adrenal hormones, is found in the kidneys of prenatally undernourished rats. Furthermore, it has been shown that GFR is increased at age of 90 days, however Na^+ excretion has not been increased¹³, suggesting that increased delivery of Na^+ to distal nephron occurs followed by increased Na^+ reabsorption in this nephron segment¹⁶.

The smaller number of nephrons, the reduced capacity to reabsorb Na^+ and the increased intrarenal vascular resistance in the pups may elicit abnormal RAS responses at the macula densa level; ultimately, these could lead to the onset of hypertension^{11-13,46}. At an adult age when they show increased blood pressure⁴⁶, the reduced capacity to reabsorb Na^+ in the proximal tubule due to pressoric natriuresis⁴⁷ may also elicit abnormal responses at the macula densa level. Ultimately, these responses could lead to an increased intrarenal vascular resistance¹³ and to a decrease in plasma renin activity⁴¹.

An early alteration in RAS could also explain the abnormal response of the ouabain-insensitive $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$ to Ang II in adult MalN (Fig. 3), since increased RAS activity has been observed in prenatally malnourished adult rat kidneys⁴⁸. Whereas the control group exhibited the well-documented biphasic behavior with 40-50% stimulation at physiological Ang II concentrations followed by a progressive decrease, the weaker stimulation in MalN animals was additionally shifted to right (Fig. 3B). Clearly, this response indicates that MalN rats are hyporesponsive to Ang II in vitro. It can be hypothesized that if higher Ang II concentrations are required for adequate modulation of fluid reabsorption in the proximal tubules and body fluid

balance in the whole animal, this might lead to the development of a long-term hypertensive response.

The cellular signaling event related to the hyporesponsiveness of Na⁺-ATPase to Ang II appears to be down-regulation of PKC (Fig. 4), which participates in the signaling cascade that links Ang II, AT₁R and the Na⁺-ATPase²⁰. It can be proposed that the accentuated decrease in PKC activity results from reactive oxygen species¹⁰, since this enzyme is sensitive to alterations in cellular redox state²⁴. Moderate oxidant concentrations can activate PKC, whereas intense and persistent production of reactive oxygen species, as found in the kidneys from pups¹⁰ after maternal undernutrition, probably promotes inactivation of the kinase rather than activation, as shown in liver²⁴. Furthermore, decrease in PKC activity may result from RAS programming.

In conclusion, the present findings suggest a correlation between maternal malnutrition, increased placental oxidative stress, abnormal activity of renal Na⁺ transporters and disrupted Ang II signaling, which could contribute to programming⁴⁹ late disturbances in renal Na⁺ handling and arterial pressure control as specific consequences of impaired intrauterine growth.

Acknowledgments

The authors would like to thank Glória Costa-Sarmento for technical support. This research was supported by grants from the Brazilian Research Council (CNPq 620248), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Procad 008052), the Rio de Janeiro State Research Foundation (E-26/152.897) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE 006/2003). This work is dedicated to Jorge Almeida-Guimarães on his 70th birthday.

References

- [1] Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA & Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993; 341: 938–941.
- [2] Falkner B. Birth weight as a predictor of future hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15: 43S–45S.
- [3] Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD & Wang Z. A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int* 1999; 56: 1072–1077.
- [4] 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–E87.
- [5] Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, Leng JJ & Gin H. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004; 37: 293–298.
- [6] Kay HH, Grindle KM & Magness RR. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 682–688.
- [7] Walsh SW. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70: 223–232.
- [8] Barford D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 679–686.
- [9] Borrego-Díaz E, Rosales JC, Proverbio T, Teppa-Garrán A, Andaluz R, Abad C, Marín R & Proverbio F. Effect of placental hypoxia on the plasma membrane Ca-ATPase (PMCA) activity and the level of lipid peroxidation of syncytiotrophoblast and red blood cell ghosts. *Placenta* 2008; 29: 44–50.
- [10] Magalhães JC, da Silveira AB, Mota DL & Paixão AD. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp Physiol* 2006; 91: 611–619.
- [11] Lucas SR, Costa Silva VL, Miraglia SM & Zaladek-Gil F. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. *Pediatr Nephrol* 1997; 11, 719–723.

- [12] 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.
- [13] Paixão AD, Maciel CR, Teles MB & Figueiredo-Silva J. Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biol Neonate* 2001; 80: 239–246.
- [14] Langley-Evans SC & Jackson AA. Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1995; 110: 223–228.
- [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 (London)* 2003; 104: 607-614.
- [16] Manning J, Beutler K, Knepper MA & Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F202–F206.
- [17] Burnier M, Biollaz J, Magnin JL, Bidlingmeyer M & Brunner HR. Renal sodium handling in patients with untreated hypertension and white coat hypertension. *Hypertension* 1994; 23: 496–502.
- [18] Biollaz J, Waeber B, Diezi J, Burnier M & Brunner HR. Lithium infusion to study sodium handling in unanesthetized hypertensive rats. *Hypertension* 1986; 8: 117–121.
- [19] Féraille E & Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* 2001; 81: 345–418.
- [20] Rangel LB, Lopes AG, Lara LS, Carvalho TL, Silva IV, Oliveira MM, Einicker-Lamas M, Vieyra A, Nogaroli L & Caruso-Neves C. PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. *Regul Pept* 2005; 127: 177–182.
- [21] Bełtowski J, Borkowska E, Wójcicka G & Marciniak A. Regulation of renal ouabain-insensitive Na⁺-ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2007; 29: 189–207.
- [22] Lara LS, Correa JS, Lavelle AB, Lopes AG & Caruso-Neves C. The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidylinositol phospholipase C β -

protein kinase C pathway is involved in activation of proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1-7) in pig kidneys. *Exp Physiol* 2008; 93: 639–647.

[23] Sugden PH & Clerk A. Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 2111–2124.

[24] Nitti M, Pronzato MA, Marinari UM & Domenicotti C. PKC signaling in oxidative hepatic damage. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 36–42.

[25] Teodósio NR, Lago ES, Romani SA & Guedes RC. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1990; 40: 533-547.

[26] Buege JA & Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302–310.

[27] Vieyra A, Nachbin L, de Dios-Abad E, Goldfeld M, Meyer-Fernandes JR & de Moraes L. Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 1986; 261: 4247–4255.

[28] Whittembury G & Proverbio F. Two modes of Na extrusion in cells guinea pig kidney cortex slices. *Pflugers Arch* 1970; 316: 1-25.

[29] Proverbio F & Del Castillo JR. Na⁺-stimulated ATPase activities in kidney basl-lateral plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1981; 646: 99-108.

[30] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.

[31] Tausky HH & Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 1953; 202: 675–685.

[32] Grubmeyer C & Penefsky HS. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1981; 256: 3718–3727.

[33] Black RE. Micronutrients in pregnancy. *Br J Nutr* 2001; 85: S193–S197.

[34] Ereifej KI & Haddad SG. Chemical composition of selected Jordanian cereals and legumes as compared with the FAO, Moroccan, East Asian and Latin American tables for use in the Middle East. *Trends Food Sci Technol* 2000; 11: 374–378.

[35] Thompson NM, Norman AM, Donkin SS, Shankar RR, Vickers MH, Miles JL & Breier BH. Prenatal and postnatal pathways to obesity: different underlying mechanisms, different metabolic outcomes. *Endocrinology* 2007; 148: 2345–2354.

[36] Hafner E, Metzenbauer M, Höfingler D, Munkel M, Gassner R, Schuchter K, Dillinger-Paller B & Philipp K. Placental growth from the first to the second trimester

of pregnancy in SGA-foetuses and pre-eclamptic pregnancies compared to normal foetuses. *Placenta* 2003; 24: 336–342.

[37] de Grauw TJ, Myers RE & Scott WJ. Fetal growth retardation in rats from different levels of hypoxia. *Biol Neonate* 1986; 49: 85–89.

[38] Orzechowski A, Ostaszewski P, Brodnicka A, Wilczak J, Jank M, Balasińska B, Grzelkowska K, Ploszaj T, Olczak J & Mrówczyńska A. Excess of glucocorticoids impairs whole-body antioxidant status in young rats. Relation to the effect of dexamethasone in soleus muscle and spleen. *Horm Metab Res* 2000; 32: 174–180.

[39] Franco M do C, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RC, Carvalho MH & Nigro D. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 767–775.

[40] Eisen EJ. Results of growth curve analyses in mice and rats. *J Anim Sci* 1976; 42:1008–1023.

[41] Manning J & Vehaskari VM. Postnatal modulation of prenatally programmed hypertension by dietary Na and ACE inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R80–R84.

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

[43] Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC & Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci* 1996; 91: 607–615.

[44] Palmer LG & Frindt G. Na⁺ and K⁺ transport by the renal connecting tubule. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007; 16: 477–483.

[45] Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA & Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology* 2001; 142: 2841–2853.

[46] Manning J & Vehaskari VM. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* 2001; 16: 417–422.

- [47] McDonough AA, Leong PK, Yang LE. Mechanisms of pressure natriuresis: how blood pressure regulates renal sodium transport. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986: 669–677.
- [48] Chou HC, Wang LF, Lu KS & Chen CM. Effects of maternal undernutrition on renal angiotensin II and chymase in hypertensive offspring. *Acta Histochem* 2008; 110: 497–504.
- [49] Fowden AL, Giussani DA & Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology* 2006; 21: 29–37.

Figure Legends

Figure 1. Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the placenta of control (**empty** bar; n = 6) and malnourished (**filled** bar; n = 7) dams at the 20th day of gestation. MDA = malondialdehyde. Results are mean \pm SEM. Statistical difference (* P < 0.05) with respect to Control group. Inset: TBARS in liver. **Bars**, number of experiments and statistical difference are the same as for the placenta data.

Figure 2. (Na⁺+K⁺)ATPase activity in kidney proximal tubules of control (**empty** bars) and prenatally malnourished (**filled** bars) rats at 25 (Control, n = 5; MalN, n = 4) and 90 (Control, n = 8; MalN, n = 12) days measured with 120 mM Na⁺ and 24 mM K⁺. *: P < 0.05 vs. Control; #: P < 0.05 vs. 25 days (A). (Na⁺+K⁺)ATPase activity in proximal tubules of control (**empty** circles, n = 8) and prenatally malnourished (**filled** circles, n = 12) rats measured at 90 days, using the concentrations of Na⁺ and K⁺ shown on the abscissa. P_i = inorganic phosphate released from ATP in the medium. Results are mean \pm SEM from at least four assays. *: P < 0.05 vs. Control (B).

Figure 3. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in kidney proximal tubules of control (**empty** bar) and prenatally malnourished (**filled** bars) rats at 25 (Control, n = 5; MalN, n = 4) and 90 (Control, n = 8; MalN, n = 12) days. *: P < 0.01 vs. the corresponding **age-matched** Control; †: P < 0.01 vs. 25 days in Control (A). Na⁺-ATPase activity in proximal tubules of control (**empty** circles, n = 8) and malnourished (**filled** circles, n = 12) rats at age of 90 days, measured in the absence and presence of the Ang II concentrations shown on the abscissa. P_i = inorganic phosphate released from ATP in the medium. Results are mean \pm SEM from at least four assays (B). *: P < 0.01 vs. Control at the same Ang II concentration; ‡: P < 0.05 vs. the corresponding diet-matched value without Ang II.

Figure 4. Protein kinase C activity in proximal tubules of control (**empty** bar) and prenatally malnourished (**filled** bar) rats at age of 90 days (Control, n = 8; MalN, n = 12). ~P = esterified phosphate. Results are mean \pm SEM. *: P < 0.01 vs. Control.

Table 1. Diet composition (g/g%)

	Control ¹	Deficient ²
Protein	23	8
Carbohydrates	41	78
Ether extract	2.5	1.7
Vitamin supplement	Yes	No
Sodium	0.28	0.16
Potassium	0.9	0.3
Calcium	1.8	0.04
Iron	0.018	0.007
Moisture	13	11
kcal/100 g	278	356

¹ As indicated by the manufacturer (Purina Agriband, Paulínia, SP, Brazil). ²

According to the Laboratory of Experimentation and Analysis of Food (LEEAL), Nutrition Department, Federal University of Pernambuco.

Table 2. Maternal data.

	Control (n = 6)	MalN (n = 7)
Body weight at 20 th gestation day (g)	347 ± 9	242 ± 9 *
Total weight gain (g)	112 ± 5.5	4.9 ± 10.8 *
Total dietary intake during gestation (g)	394 ± 15	302 ± 6.5 *
Total energy intake (kcal)	1096 ± 41	1136 ± 25
Number of fetuses	12.8 ± 0.8	8.14 ± 1.1 *
Placenta weight (g)	0.40 ± 0.01	0.34 ± 0.02 *

Maternal data were obtained at 20th day of gestation in dams fed with standard (control) or deficient (MalN) diet during pregnancy. Results are mean ± SEM. *: p < 0.001 vs. control.

Table 3. Fetuses, newborn and offspring: general data.

	Control	MalN
<i>Fetuses and newborn pups</i>		
Fetal BW (g) at 20 days	2.27 ± 0.04 (7)	2.02 ± 0.05 *(8)
Fetal KW (mg)	15.3 ± 0.9 (7)	12.2 ± 0.6 *(8)
KW/BW at 20 th day of fetal life (%)	0.66 ± 0.05 (7)	0.60 ± 0.03 (8)
<i>25-90 day pups</i>		
BW at birth (g)	6.4 ± 0.14 (13)	5.4 ± 0.19 *(16)
BW at weaning (g)	66.2 ± 1.6 (5)	56.9 ± 1.2 *(4)
KW at weaning (g)	0.70 ± 0.02 (5)	0.64 ± 0.01 (4)
KW/BW at weaning (%)	1.06 ± 0.02 (5)	1.12 ± 0.03 (4)
BW at age of 90 days (g)	332 ± 9 (8)	323 ± 7 (12)
KW at age of 90 days (g)	2.5 ± 0.1 (8)	2.5 ± 0.01 (12)
KW/BW at age of 90 days (%)	0.75 ± 0.02 (8)	0.77 ± 0.01 (12)

Male fetuses and offspring of dams were fed with standard (Control) or deficient (MalN) diet during pregnancy. BW, body weight; KW, kidney weight. Results are mean ± SEM. *: p < 0.05 vs. control. Kidney weights representative of pups weaned at 25 days were obtained from 4-5 randomly selected pups that were sacrificed the same day for ATPase studies (n = 5 pups from Control dams; n = 4 pups from MalN dams). The number of animals is indicated in parentheses. The results therefore represent programming from 4 MalN dams and 4 control dams studied in parallel.

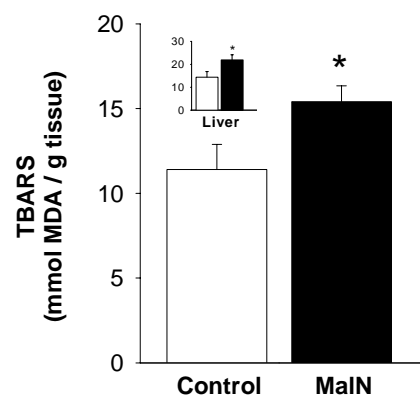


Fig. 1. Vieira-Filho *et al.*

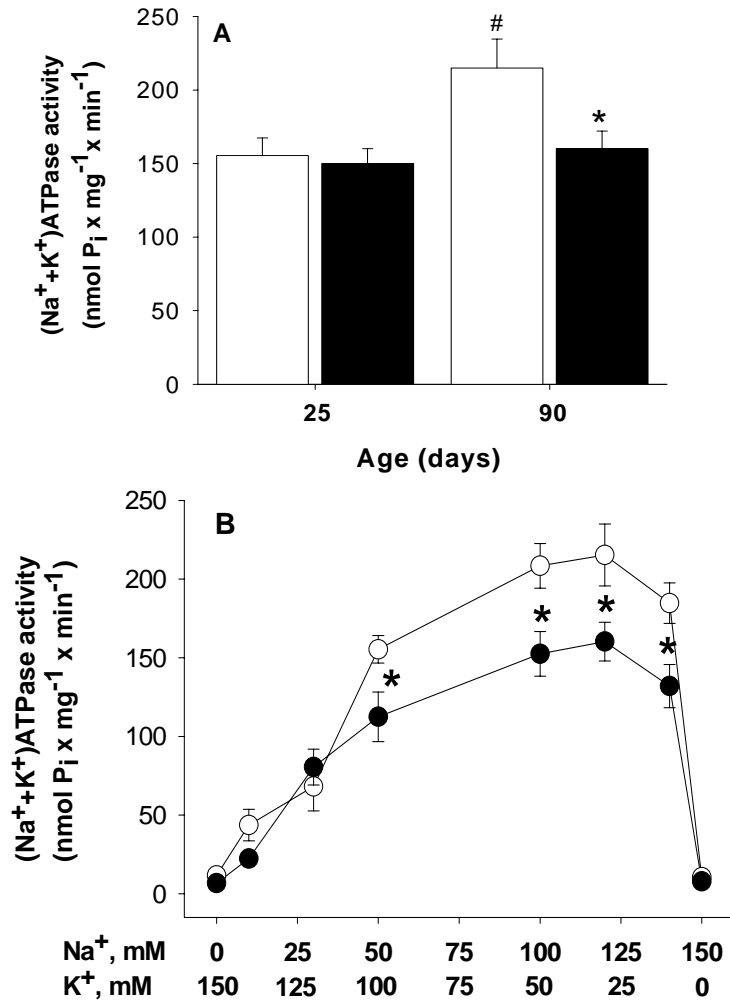


Fig. 2. Vieira-Filho *et al.*

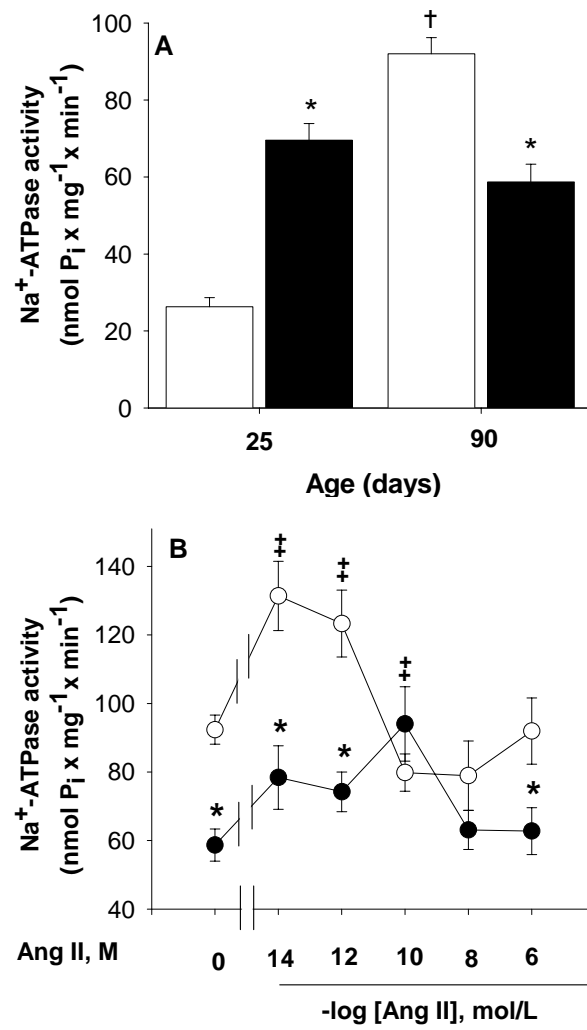


Fig. 3. Vieira-Filho *et al.*

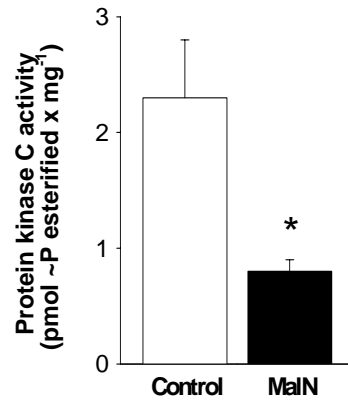


Fig. 4. Vieira-Filho *et al.*

Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood?

João H. Costa-Silva · Paulo A. Silva · Nadir Pedi · Ricardo Luzardo · Marcelo Einicker-Lamas · Lucienne S. Lara · Amélia M. Bezerra · Carmen Castro-Chaves · Adalberto Vieyra

Received: 3 December 2008 / Accepted: 27 April 2009 / Published online: 12 May 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract

Background Epidemiological studies in the northeastern region of Brazil show an association between hypertension and malnutrition, especially in areas where protein-deficient diets are combined with high salt intake.

Aims of study We studied the consequences of a widely consumed deficient diet (basic regional diet, BRD),

combined with high NaCl, on growth, renal Na⁺ and water handling and activities of ATP-dependent Na⁺ transporters in kidney proximal tubules.

Methods Young rats were fed after weaning with a low-protein and high-salt diet, which mimics that used in a vast region of Brazil. Body mass was evaluated from weaning up to the 19th week of age. Glomerular filtration rate, proximal Na⁺ reabsorption, distal Na⁺ delivery, urinary excretion of Na⁺ and water, and urine concentration capacity were evaluated from serum and urine concentrations of creatinine, Na⁺ and Li⁺, and by measurement of urinary volume and density. The (Na⁺ + K⁺)ATPase and the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase were studied in vitro by measuring ATP hydrolysis. Expression of (Na⁺ + K⁺)ATPase was evaluated by immunodetection with the use of a specific antibody anti α 1-catalytic subunit isoform.

Results Undernourished rats reached early adulthood (14 weeks) with body and renal masses that were 2.3 times lower than controls. These rats became hypertensive (mean arterial pressure 18.7 ± 0.6 kPa vs 15.5 ± 0.9 kPa in control group) and showed augmented fractional proximal Na⁺ reabsorption (61.0 ± 0.3% vs 81.8 ± 2.2%) with a concomitant decrease in distal Na⁺ delivery (9.5 ± 0.5 μmol/min vs 14.0 ± 0.2 μmol/min per 100 g body weight). Urinary Na⁺ excretion was higher in BRD rats, (juvenile and adult) being however twice the increase in Na⁺ intake. The ATP-dependent Na⁺ transporters were affected in opposite ways. The (Na⁺ + K⁺)ATPase activity from undernourished rats fell by 30%, in parallel with a 20% decrease in its immunodetection, whereas the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase, which is responsible for the fine-tune control of Na⁺ reabsorption, increased three-fold.

Conclusions We conclude that early alterations in proximal tubule Na⁺ pumps, together with an abnormally augmented

J. H. Costa-Silva and P. A. Silva have contributed equally to this study.

J. H. Costa-Silva · N. Pedi · C. Castro-Chaves (✉)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil
e-mail: cchaves@ufpe.br

P. A. Silva · R. Luzardo · M. Einicker-Lamas · A. Vieyra
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil

P. A. Silva · R. Luzardo · M. Einicker-Lamas ·
L. S. Lara · A. Vieyra (✉)
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
de Biologia Estrutural e Bioimagem,
Rio de Janeiro, RJ 2194-902, Brazil
e-mail: avieyra@biof.ufrj.br

L. S. Lara
Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

A. M. Bezerra
Laboratório Paulo Loureiro,
Recife, Pernambuco 50070-230, Brazil

urinary Na^+ excretion, might be the link between undernutrition and late renal dysfunction.

Keywords Chronic undernutrition · $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ · $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ · Renal sodium handling · Alterations in renal transporters

Introduction

During the past decade, it has become apparent that the risk of disease in adult life is closely related to environmental factors that impair fetal growth. The most significant factor is malnutrition, a serious public health problem worldwide, principally in underdeveloped countries [2]. Human epidemiological studies have demonstrated a relationship between undernutrition and the risk of developing hypertension [10], coronary heart disease [25] and renal disease [15]; for a recent general review see Ref. [11]. These studies are supported by a broad range of experimental animal models showing that the renal system in the offspring is extremely sensitive to mild shifts in maternal nutrition [5].

In Brazil, especially in the northeast, many epidemiological studies have shown moderate to severe malnutrition [30, 35]. In contrast to intrauterine undernutrition, few if any studies have been performed on animal models to identify the cellular and molecular mechanisms that may be involved in the cardiovascular and renal alterations in chronic undernutrition associated with high salt intake. In this study, we induced malnutrition using a diet derived from the basic regional diet (BRD) available in the vast sugarcane cultivation areas in northeastern Brazil. This diet induces a high incidence of malnutrition of different degrees in the population of this region [30]. Essentially, BRD is deficient in proteins, and depending on the subregion of the Brazilian northeast, on the season and on cultural food preparation habits, the salt content of the diet is high [20] and so BRD could be rich in NaCl . This is the reason why we combined the protein-deficient diet with high NaCl content to promote undernutrition in the experimental group. The human epidemiological trends mentioned above strongly support the hypothesis that it could have led to metabolic and physiological changes in local children and young people. These modifications may have evolved to culminate in the establishment of cardiovascular and renal diseases in the adult population, in which the underlying cellular and molecular mechanisms are poorly understood [21].

Impaired global Na^+ and water handling in undernutrition, as well as metabolic alterations, were also described several years ago (for review see Ref. [4]). However, possible molecular alterations in the energy-driven renal

Na^+ transporters, which could underlie the modifications described so far, have not been studied. The present work was undertaken to investigate the impact of undernutrition associated with chronic intake of a NaCl -enriched BRD on functional parameters in proximal tubules and, at a molecular level, on the two ATP-dependent Na^+ -pumping activities found in the kidney [3, 7, 37].

Materials and methods

All the reagents used were of the highest purity available. Goat polyclonal antibody against the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ $\alpha 1$ -catalytic subunit ($\alpha 1[\text{N}-15]$) was from Sigma Chemical Co. and the anti-goat secondary antibody was from Santa Cruz Biotechnology.

Ethical considerations

All procedures used were performed in accordance with “The guide for care and use of laboratory animals” [DHHS Publication No. (NIH) 85-23] and also approved by the Committee for Experimental and Animal Ethics at the Federal University of Pernambuco and the Federal University of Rio de Janeiro.

Animals

Male Wistar rats were weaned at the end of the 3rd week and reared four per cage and, except when otherwise indicated, had free access to food and water in a room maintained at 25 ± 1 °C with a 12-h light–dark cycle. For the study of renal function parameters, the rats were kept in individual metabolic cages only during the experimental procedures (3 h) in order to avoid chronic social isolation and adrenal-dependent elevation of blood pressure. The four age-matched groups of control and undernourished rats were separated randomly for independent determinations, at 8, 14, 17 and 19 weeks after birth, of renal physiological parameters and *in vitro* $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ and ouabain-insensitive $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ activities, as well as for Western blotting analysis of the first protein in the membranes of proximal tubule cells.

Diets and induction of undernutrition

A balanced commercial rodent chow purchased from Purina-Agribands was given to the control groups (CD), while BRD was supplied to the experimental rats. The protein-deficient BRD was prepared according to Ref. [30] with augmented NaCl content to allow the study of the influence of combined low protein/high salt on renal function. It had the following ingredients (in g%): manioc

flour (64.8), beans (18.3), sweet potatoes (12.8) and cured meat (3.7). The meat was partially desalted; each component was cooked, dehydrated at 60 °C, pulverized and mixed with water to obtain a consistent mass. Meat fat (0.3 g%) was then added and the mixture was shaped into squares that were dehydrated at 60 °C for 24 h. The components (in g%, wet weight) of CD and BRD diets were, respectively: protein 23.0 and 7.9, carbohydrates 44.5 and 69.2, fat 2.5 and 0.8, fiber 7.2 and 8, mineral mix (except NaCl) 7.8 and 5.3, NaCl 0.16 and 0.33. The NaCl content was assessed at the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. The other values for BRD were as in Ref. [30]. The total kcal/100 g was 290 and 314 for CD and BRD, respectively. The rats were weighed weekly to obtain growth curves. Food and water intake were recorded at the last day of the corresponding week and Na⁺ intake was estimated by the product of food consumption and dietary Na⁺ content. Data correspond to the end of the linear and faster phase of growth (8th week of age, 5th week after weaning) and to the end of the growth trajectory (17th week of age, 14th week after weaning). At the 17th week of age, the proximal tubule physiological parameters were also measured.

Study of renal function in growing and adult rats

The renal index (left plus right kidney weight/body weight) was measured at the early adult stage (14th week) when one age-matched group was killed and the organs removed to study the two Na⁺ pumps. Renal function parameters were investigated during growth (8th week) and in adult rats (17th week). These stages were also used for measuring total plasma protein concentration by refractometry. Glomerular filtration rate (GFR) was measured by creatinine clearance [18]. Values for Li⁺ clearance (Cl_{Li}) were obtained as follows. At 12 h prior to urine collection, rats were given 0.06 mmol LiCl orally/100 g body weight, which was enough to achieve plasma Li⁺ concentrations of 0.23 ± 0.07 (CD group) and 0.23 ± 0.02 μmol/ml (BRD group). This Li⁺ administration is well below nephrotoxic levels and therefore does not promote alterations in GFR as observed in chronic treatments in humans [23]. Overnight, the rats were allowed water ad libitum, but not food. In order to suppress the effects of antidiuretic hormone on urinary volume, the rats received water by gavage, 3 ml/100 g of body weight 90 min before and 2 ml/100 g 30 min before being placed in the cages. Blood was collected in non-heparinized tubes. Urinary density was assessed by refractometry (Atago); Na⁺, Li⁺ and creatinine concentrations in serum and urine were measured with a Cobas Mira analyzer (Roche). Renal concentration capacity was assessed by the response to 12 h of water deprivation at two different times in the same group of rats.

Urine density was measured in rats before (at the 17th week) and after a dietary supplement of 0.1 g urea/100 g of body weight for 7 days, as previously done in humans [13].

Blood pressure determinations

Arterial pressure was assessed in adult rats by the tail-cuff method using a Letica LE 5000 apparatus, which allows repeated and reliable measurements in a short period in conscious animals [12]. For this purpose, the rats were kept at 30–32 °C for 30 min and three successive determinations were performed on each animal. This procedure was repeated on 3 consecutive days during the 14th week of life.

Preparation of membrane-enriched fraction

The microsomal fraction was obtained using a previous method, with several and random controls for contamination of intracellular structures in the cell membrane fraction [36]. The membranes were prepared from the outermost cortex (*cortex corticis*), a region of the renal tissue in which more than 90% of the cell population correspond to proximal tubules [37]. The kidneys were collected and placed in a cold solution containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES-Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA and 0.15 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich; type II-S). Thin transverse slices of the *cortex corticis* were removed using a Stadie-Riggs microtome and carefully dissected using iridectomy scissors to avoid contamination with the rest of the tissue. The suspension of fragments was homogenized in the same cold solution (4 ml/g) using a Teflon/glass homogenizer. The homogenate was processed as described in Ref. [36] and the final pellet was resuspended in 250 mmol/l sucrose at a final concentration of 5–15 mg protein/ml and stored at –4 °C. Protein determination was as described in Ref. [17].

(Na⁺ + K⁺)ATPase and ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in proximal tubule cells

(Na⁺ + K⁺)ATPase activity was measured using a colorimetric method [29]. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase was measured by the difference in P_i release in the absence and presence of 2 mM furosemide [16]. The reaction conditions are described in Fig. 3.

SDS-PAGE and immunoblotting

Electrophoresis of membrane proteins, followed by immunodetection of proximal tubule (Na⁺ + K⁺)ATPase, was carried out as described elsewhere [34], using goat polyclonal antibody against the (Na⁺ + K⁺)ATPase α1-subunit (α1[N-15]). Each gel was stained with Ponceau

Red to evaluate the amount of protein loaded on each lane and to normalize the levels of expression to the total protein loaded. The protein band at 104 kDa detected by immunoblotting was quantified using Scion Image software.

Results

Figure 1 shows the growth curves for CD (filled circles) and BRD (open circles) rats. The latter attained a maximum adult body weight (BW_{max}), the asymptotic endpoint of growth, which was only 30% of the CD group (146 ± 4.3 g vs 481 ± 20.6 g). However, the BRD group grew significantly faster: its growth rate constant was higher and its half-time ($T_{1/2}$) for maximal growth decreased significantly when compared with the CD group. The renal index (inset to Fig. 1) was similar in both groups, indicating that malnutrition affects the trajectories of both body and kidney growth to the same extent.

Figure 2 shows urinary Na^+ and water excretion and urine density in CD and BRD rats at 8 and 17 weeks after birth. These stages of development were chosen because kidney development in rats (organ growth associated with both hyperplasia and hypertrophy) is considered complete just before 8 weeks [6, 28], while body weight approaches the asymptotical B_{max} value (Fig. 1) at 14 weeks after weaning (17 weeks of age). The evolution of the ability to retain water in BRD rats does not parallel the development of Na^+ retention (Fig. 2a), since the water excretion rate is the same at 8 and 17 weeks (Fig. 2b). These latter results match those shown in Fig. 2c: while urine density increases in the CD group when the rats reach adulthood, the urine remains dilute in the BRD rats despite the higher dietary Na^+ content and even when they are challenged by water deprivation (Fig. 2d). Table 1 presents the data of food and water intake at the end of the 8th and 17th weeks of age when the determinations of Na^+ and water excretion were carried out. When the dietary Na^+ intake is compared with the urinary Na^+ excretion (Fig. 2), it becomes clear that the rise in urinary Na^+ loss in the BRD group is twice the increase in its Na^+ ingestion.

Table 2 shows the BRD-induced modifications in physiological parameters concerning Na^+ and water handling by the proximal tubules. The GFR increases in BRD rats, probably because of the hypoproteinemia (5.7 ± 0.3 g% vs 7.2 ± 0.5 g% in the CD group), which decreases the resistance to ultrafiltration [26]. Table 2 also demonstrates an increase in fractional proximal tubule Na^+ reabsorption in the BRD group. This rise cannot be taken as a physiological response to an increased GFR because the hypoproteinemia in BRD rats must disrupt the normal glomerulo-tubular balance [27]. Accordingly, the distal

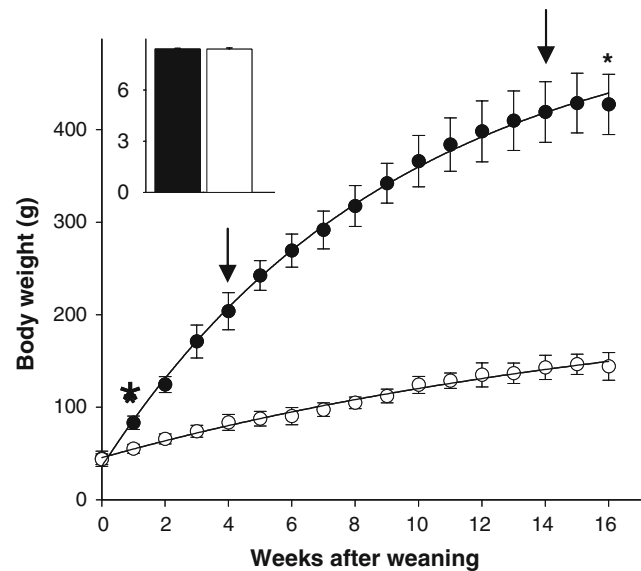


Fig. 1 Time course of body weight (BW) gain. After weaning (end of the 3rd week of age), rats fed with the control diet (CD, filled circles) or basic regional diet (BRD, empty circles) were weighed regularly until the 16th week (19th after birth). In the chronic undernutrition group, the end point of growth was significantly different from that in the normal diet controls. Therefore, a simplified equation that fitted adequately to the experimental points was obtained (body weight BW_t was used to obtain a rate constant (k) that describes the growth trajectories along the time after weaning (t), as well as the adult body weight (BW_{max}): $BW_t = BW_o + BW_{max} (1 - e^{-kt})$ where BW_o is the weight at the moment of weaning. * $P < 0.001$ (t test; only two symbols are included for simplicity); values are mean \pm SEM, $n = 11$ (each diet-matched group). The rate constants of growth were: $k = 0.15 \pm 0.01$ and 0.21 ± 0.01 /week ($P < 0.001$, t -test) for CD and BRD groups, respectively. The half-times for maximal growth were $T_{1/2} = 7.9 \pm 0.3$ and 6.5 ± 0.2 week after birth ($P < 0.01$, t -test) for CD and BRD, respectively. To calculate $T_{1/2}$ $\ln 2$ was divided by each k value and 3 weeks (weaning time) was added. Inset: renal index measured by the ratio between the total kidney weight (in mg) and the body weight (in g) for CD (filled bar) and BRD (open bar). Arrows indicate the weeks chosen for measurements of renal functional parameters. Food, Na^+ and water intake were also registered in these weeks

delivery of Na^+ in BRD rats is lower by a similar amount than that in normal animals. Li^+ clearance also decreases in the undernourished rats, thus confirming that fractional reabsorption of Na^+ in proximal tubules is enhanced.

The following experiments were performed to investigate whether modifications in the ATP-dependent Na^+ transporters of the proximal tubule could explain the increased fractional Na^+ reabsorption demonstrated in Table 2. Figure 3 shows that the $(Na^+ + K^+)ATPase$ activity is significantly decreased in membranes from BRD rats. Since the pumping activities in whole cell homogenates of CD and BRD rats are identical (Fig. 3a), it is clear that undernutrition leads to misrouting of the ouabain-sensitive Na^+ pumps and lower-than-normal insertion into the basolateral membranes. Western blotting for the $\alpha 1$ -catalytic subunit of $(Na^+ + K^+)ATPase$ (Fig. 3b) in

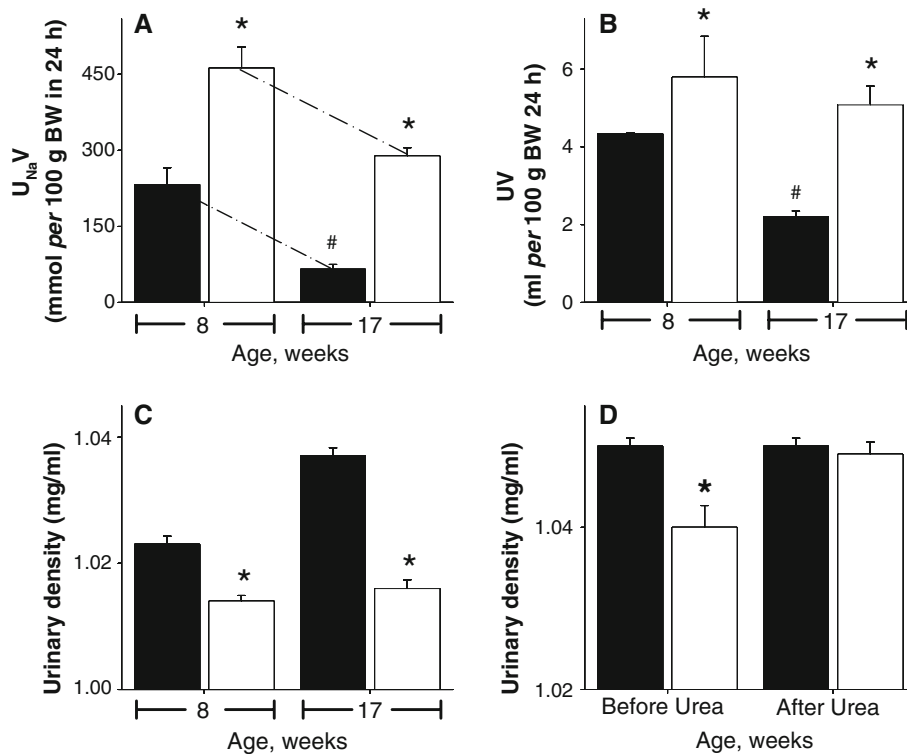


Fig. 2 Alterations of urinary parameters and distal water handling in chronic undernutrition. **a** Na⁺ excretion, **b** urine volume and, **c** urinary density in CD (filled bars) and BRD rats (open bars). The renal parameters shown were determined at the ages indicated on the *abscissa*, as described under “Materials and methods”. **P* < 0.001 with respect to the diet-matched group; #*P* < 0.001 with respect to the age-matched group; values are mean ± SEM, *n* = 11 (each group).

The dotted–dashed lines indicate that the trajectories of the evolution of Na⁺ excretion are parallel between 8th and 17th weeks in the age-matched groups. **d** Urine density was measured in rats fed with CD (filled bars) or BRD (empty bars) before (at the 17th week) and after a 7-day dietary urea supplementation, as indicated on the *abscissa*. **P* < 0.05 with respect to the other three groups; *n* = 8 (each group)

Table 1 Food, Na⁺ and water intake in BRD rats at the juvenile (8th week) and adult (17th week) phases of growth

Intake (per 100 g BW)	8th Week		17th Week	
	CD rats	BRD rats	CD rats	BRD rats
Food (g)	6.2 ± 0.1 (8)	4.5 ± 0.3 (8)*	5.2 ± 0.2 (12)	7.6 ± 0.1 (12)*
Na ⁺ (mg)	9.9 ± 0.2 (8)	14.8 ± 0.9 (8)*	8.2 ± 0.3 (12)	25.2 ± 0.3 (12)*
Water (ml)	9.0 ± 0.5 (11)	5.9 ± 0.6 (9)*	2.6 ± 0.1 (10)	4.9 ± 0.3 (11)*

Food, Na⁺ and water ingestion were recorded on the last day of the corresponding week. The weeks chosen for the register of food, Na⁺ and water ingestion correspond to those in which renal function parameters were measured (Fig. 2). Data collections correspond to the end of the linear and faster phase of growth (8th week of age, 5th week after weaning) and to the end of the growth trajectory (17th week of age, 14th week after weaning; arrows in Fig. 1). Values are mean ± SEM

n Numbers in parentheses

**P* < 0.001 with respect to CD group

the basolateral membrane-enriched fraction also shows a significant decrease in the specific signal. This agrees quantitatively well with the diminished activity shown in Fig. 3a, confirming that chronic administration of BRD affects the targeting of this pump to the membranes. In contrast, the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity is increased in young adult (14 weeks old) BRD rats (Fig. 3c)

and a further relative increase over the control value becomes apparent when this activity is corrected for the renal weight (Fig. 3d), indicating that the smaller the kidney, the higher the specific activity of this Na⁺ pump. Successive (3 days) measurements of mean arterial pressure at the same age reveal a significant increase from 15.5 ± 0.9 (CD rats) to 18.7 ± 0.6 kPa (BRD rats).

Table 2 Alterations in proximal tubule physiological parameters in BRD rats (17th week)

Parameters	CD rats	BRD rats
Cl_{cr} ($\mu\text{l}/\text{min}/100$ g BW)	259.3 ± 22.7	$380.9 \pm 43.6^*$
P_{Na} ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)	140.8 ± 2.1	139.2 ± 1.6 (NS)
FL_{Na} ($\mu\text{mol}/\text{min}/100$ g BW)	36.3 ± 3.0	$52.6 \pm 6.0^*$
Cl_{Li} ($\mu\text{l}/\text{min}/100$ g BW)	99.3 ± 15.3	$75.1 \pm 8.8^*$
DD_{Na} ($\mu\text{mol}/\text{min}/100$ g BW)	14.0 ± 0.2	$9.5 \pm 0.5^*$
FPT_{NaR} (%)	61.0 ± 0.3	$81.8 \pm 2.2^*$

Values are mean \pm SEM, $n = 8$ (each group). The following expressions were employed to calculate the renal physiological parameters. Glomerular filtration rate from the clearance of endogenous creatinine: $Cl_{cr} = U_{cr} \times V/P_{cr}$, where V is the urinary volume (in ml/24 h) and U_{cr} and P_{cr} are the urinary and plasma creatinine concentrations, respectively (in $\mu\text{mol}/\text{ml}$); urinary Na^+ excretion (in $\mu\text{mol}/24$ h) = $U_{Na} \times V$, where U_{Na} is the urine concentration of Na^+ (in $\mu\text{mol}/\text{ml}$) and V is the urinary volume (in ml/24 h); Na^+ filtered load (FL_{Na} , in $\mu\text{mol}/\text{min}$) = GFR (in $\mu\text{l}/\text{min}$) $\times P_{Na}$ (Na^+ plasma concentration in $\mu\text{mol}/\text{ml}$); Li^+ clearance (Cl_{Li} , in $\mu\text{l}/\text{min}$) = $U_{Li} \times V/P_{Li}$, where V is the urinary volume and U_{Li} and P_{Li} are the urinary and plasma Li^+ concentrations, respectively (in $\mu\text{mol}/\text{ml}$); Na^+ distal delivery (in $\mu\text{mol}/\text{min}$) estimated by: $DD_{Na} = Cl_{Li} \times P_{Na}$, because Cl_{Li} reflects the delivery of fluid from the proximal tubules to the distal regions and P_{Na} is considered to be similar to luminal Na^+ concentration (adapted from Ref. [27, 31]); fractional proximal tubule Na^+ reabsorption: FPT_{NaR} (%) = $[(FL_{Na} - DD_{Na})/FL_{Na}] \times 100$. The physiological parameters were normalized to 100 g of body weight (BW) when appropriate

NS not significant

* $P < 0.001$ (t -test) in all cases

Discussion

In this study, we investigated the effects of simultaneous low protein and high sodium intake in rats in a combined model diet that mimics the diet of an impoverished regional Brazilian population. The aim was to study its impact on active Na^+ transporters in rat proximal tubule cells at a molecular level. Epidemiological data show a high prevalence of arterial hypertension in individuals with history of undernutrition [9], especially with high dietary Na^+ [20]. This suggests the possibility that alterations in renal Na^+ handling could be a key point in the establishment of hypertension associated with undernutrition in these Brazilian populations together with other environmental and genetic factors. For this reason, the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase and the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activities were investigated in the middle of the growth trajectory (14 weeks) when the onset of hypertension was detected.

It is noteworthy that young rats exposed to a low-protein diet in the uterus display a 36% lower ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity than controls 4 weeks after birth [1], indicating that the lower ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity could be a consequence of protein deprivation at different stages of

renal development. In contrast, in young rats from undernourished dams, several Na^+ transporters are highly expressed in luminal membranes [19], so apical Na^+ fluxes are augmented and more Na^+ reaches the pumps located in the opposite side of the cells. Recent results obtained with a normosodic hypoproteic diet (8–9% protein) also show a 100% increase in Na^+ -ATPase, as in the case of BRD (unpublished observations). The results from Ref. [19] and ours, especially the contrasting observations presented in Fig. 3a–d, clearly indicate that undernutrition before and after birth can selectively alter different Na^+ transporters in opposing ways.

This selectivity clearly emerges when the results concerning ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase and Na^+ -ATPase are compared. One of the main findings is the huge increase in the Na^+ -ATPase activity despite the higher dietary Na^+ content, which correlates with the observed increase in Na^+ proximal reabsorption. The augmented turnover of this pump, which is considered to be the molecular machinery responsible for the fine-tune control of Na^+ fluxes across the proximal tubule cells [3, 16, 24], reveals an unexpected response toward a higher salt intake that, if sustained in adult life, will lead to altered and worsening renal and cardiovascular responses [2, 15]. Absolute proximal tubule Na^+ reabsorption increases in rats fed with high Na^+ and this was associated with changes in local Ang II formation [22]. Increased local Ang II under conditions of high Na^+ intake can alter the complex proximal balance involved in Na^+ homeostasis. We demonstrated that Ang II is one of the most important activators of the ouabain-insensitive Na^+ pump in a process in which AT_1 receptors are involved [24], so local modifications in Ang II content may also be associated with stimulation of both the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase (Fig. 3c, d) and the macula densa responses to a diluted distal fluid under low-protein diet [8].

The volume of luminal fluid leaving the proximal tubule is lower in BRD than in CD rats as indicated by the reduced Cl_{Li} (Table 2). Despite the moderate decrease in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase, this may be due to the enormously increased proximal Na^+ reabsorption mediated by the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase followed by passive water fluxes. After delivery of the fluid to the descending branch of Henle's loop, it is reasonable that water reabsorption is compromised. Urea concentration in the internal medullar interstitium diminishes in a protein-deficient diet, while urea supplementation in the diet restores the capacity to concentrate the urine [22], as also found in BRD rats. Urine density increased significantly in the CD rats during the trajectory to adulthood, whereas in the BRD group, despite the greater loss of Na^+ (Fig. 2a), it remained lower and constant, indicating that the countercurrent system had failed.

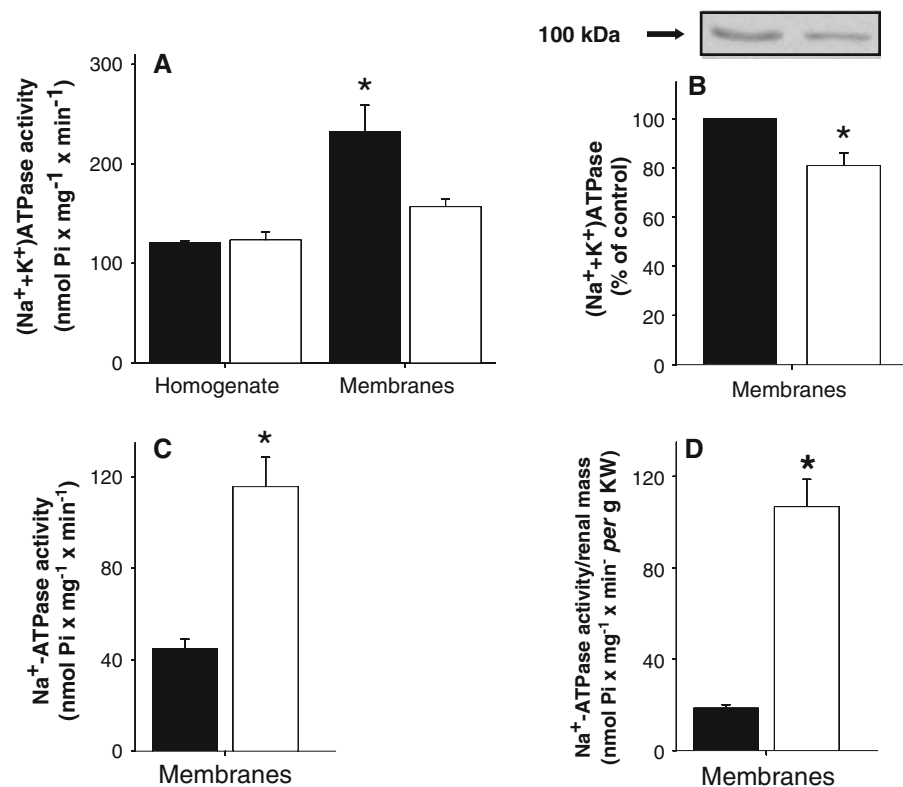


Fig. 3 Undernutrition decreases activity and targeting of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase to the basolateral membranes in kidney proximal tubule cells and increases the activity of the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase. **a** ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase was measured in the whole homogenate and in the membrane-enriched fractions of CD (filled bars) and BRD rats (empty bars), as indicated on the abscissa. The reaction medium was (in mmol/l) 5 MgCl_2 , 50 bis-Tris-propane (pH 7.4), 120 NaCl and 0.2 mg protein/ml (final concentration). The fractions were preincubated at 37 °C in the above medium in the absence or presence of 1 mmol/l ouabain for 10 min. Reactions (0.5 ml) were started by adding ATP and KCl (5 and 24 mmol/l, respectively, final concentrations) and stopped 10 min later by adding 1.5 ml activated charcoal in 0.1 mol/l HCl. After centrifugation (600 × g), aliquots of the supernatants (0.5 ml) were collected to measure the amount of P_i released. The ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase activity was calculated as the difference between P_i released in the absence and the presence of ouabain. Values are mean ± SEM, $n = 10$; * $P < 0.001$ (t -test) with respect to the corresponding membrane preparation from diet-matched rats (**a**). **b** Representative immunodetection of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase $\alpha 1$ -catalytic subunit (arrow at 110 kDa)

in the membrane fractions from the experimental groups shown in **a** and densitometric analysis of the immunodetection patterns, calculated by the ratio between the luminescence intensity (western blotting) and the staining intensity of the corresponding protein band. Values are mean ± SEM, $n = 3$; * $P < 0.05$ (t test) with respect to the corresponding diet-matched membrane preparation. **c** Absolute activity values of ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activity measured in the membrane-enriched fraction from CD (filled bars) and BRD (empty bars) rats. The membranes were preincubated with 2 mmol/l ouabain at 37 °C for 10 min and then added to the assay medium (0.5 ml; 0.2 mg protein/ml, final concentration) containing (in mmol/l) 10 MgCl_2 , 20 HEPES-Tris (pH 7.0), 120 NaCl and 5 ATP (3–5 Bq/nmol). The reaction was stopped after 15 min by adding 1.5 ml of 0.1 mol/l HCl-activated charcoal. After centrifugation (600 × g), aliquots of the supernatants (0.5 ml) were counted in a liquid scintillation counter to measure the $^{32}\text{P}_i$ released. The Na^+ -ATPase activity was calculated from the difference between the $^{32}\text{P}_i$ released in the absence and in the presence of 2 mmol/l furosemide. **d** Na^+ -ATPase activity normalized for renal weight (KW). Values are mean ± SEM, $n = 13$; * $P < 0.001$ (t test) with respect to the corresponding diet-matched group

If removal of water along the descending portion of Henle's loop is compromised, passive NaCl efflux along the thin ascending limb is also decreased because the intraluminal fluid remains dilute. So, more water and Na^+ (in dilute solution) will reach the final segments of the nephron than under normal conditions [14]. In the collecting duct, the increased tubular fluid flow rate will impair Na^+ (and water) reabsorption, even in the case of increased Ang II and aldosterone plasma levels. BRD rats develop hypertension from 14 weeks of age, a clear signal

that cardiovascular alterations occur in young rats and this could be associated with hyperactivity of the systemic renin/Ang II/aldosterone axis. The impaired distal handling of fluid would be aggravated by the lower interstitial osmolality [22], finally leading to increased excretion of a diluted urine, as shown in Fig. 2c, d, despite the increased loss of Na^+ (Fig. 2a). In addition, arrival of a more diluted fluid than usual at the macula densa region will evoke renin release and consequently activate the renin-angiotensin system and aldosterone release, further increasing the

blood pressure, as found in BRD rats. Impaired distal Na^+ handling is confirmed by the observation that besides the huge increase in proximal Na^+ reabsorption, the Na^+ excretion in BRD rats is augmented by 100 and 350% at 8 and 17 weeks of age, respectively, with respect to CD animals (Fig. 2a). Whereas, at the same ages, the dietary Na^+ intake in the malnourished group was 50 and 200% higher than that for the CD group.

Glomerular filtration rate increases in normal rats fed with a high-salt diet [32], whereas the opposite was found in diabetic animals in association with disturbed tubuloglomerular feedback [33], an indication that renal handling of water and salt is affected by metabolic imbalances. These alterations may later contribute to rendering the kidney more susceptible to prolonged injury. This proposal also emerged in a recent paper [38] on the effects of intrauterine growth restriction: altered nephrogenesis with normal behavior of the renin–angiotensin system would evolve toward impaired renal responses in postnatal life.

From the results described in the present work, we conclude that the alterations in proximal Na^+ pumps and in distal Na^+ handling may constitute the molecular link between undernutrition and adult metabolic, renal and cardiovascular dysfunctions.

Acknowledgments The skillful technical assistance of Glória Costa-Sarmento, José Paulo Soares and Gilsandro J. Barbosa da Silva is acknowledged. This research was supported by grants from the Brazilian Research Council (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Rio de Janeiro State Research Foundation (to Marcelo Einicker-Lamas and Adalberto Vieyra) and the José Bonifácio Foundation (to Lucienne S. Lara). João H. Costa-Silva and Nadir Pedi were recipients of a fellowship from CNPq; Paulo A. Silva and Ricardo Luzardo were recipients of a fellowship from CAPES.

Conflict of interest None of the authors have any conflict of interest.

References

- Ashton N, Al-Wasil SH, Bond H, Berry JL, Denton J, Freemont AJ (2007) The effect of a low-protein diet in pregnancy on offspring renal calcium handling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R759–R765
- Barker DJP (1997) Mothers, babies and disease in later life. BMJ Publishing Group, London
- Bełtowski J, Borkowska E, Wójcicka G, Marciniak A (2007) Regulation of renal ouabain-resistant Na^+ -ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. *Clin Exp Hypertens* 29:189–207
- Benabe JE, Martínez-Maldonado M (1998) The impact of malnutrition on kidney function. *Miner Electrolyte Metab* 24:20–26
- Cleal JK, Poore KR, Boullin JP, Khan O, Chau R, Hambidge O, Torrens C, Newman JP, Poston L, Noakes DE, Hanson MA, Green LR (2007) Mismatched pre- and postnatal nutrition leads to cardiovascular dysfunction and altered renal function in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9529–9533
- Eisen EJ (1976) Results of growth curve analyses in mice and rats. *J Anim Sci* 42:1008–1023
- Féraille E, Doucet A (2001) Sodium–potassium–adenosine-triphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* 81:345–418
- Fernández-Repollet E, Tapia E, Martínez-Maldonado M (1987) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on altered renal hemodynamics induced by low-protein diet in the rat. *J Clin Invest* 80:1045–1049
- Florêncio TT, Ferreira HS, Cavalcante JC, Sawaya AL (2004) Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. *Nutr Rev* 62:S127–S133
- Forsen T, Eriksson JG, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ (1999) Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 319:1403–1407
- Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ (2006) Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology* 21:29–37
- Ikeda K, Nara Y, Yamori Y (1991) Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. *Lab Anim* 25:26–29
- Klahr S, Tripathy K, Garcia FT, Mayoral LG, Ghitis J, Bolaños O (1967) On the nature of the renal concentrating defect in malnutrition. *Am J Med* 43:84–96
- Kokko JP, Rector FC Jr (1972) Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla. *Kidney Int* 2:214–223
- Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA (1999) Fetal exposure to a maternal low-protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* 64:965–974
- Lara LS, Cavalcante F, Axelband F, De Souza AM, Lopes AG, Caruso-Neves C (2006) Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT2-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na^+ -ATPase by Ang-(1–7). *Biochem J* 395:183–190
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Magalhães JCG, Silveira AB, Mota DL, Paixão ADO (2006) Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp Physiol* 9:611–619
- Manning J, Beutler K, Knepper KA, Vehaskari VM (2002) Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F202–F206
- Matos AC, Ladeia AM (2003) Assessment of cardiovascular risk factors in a rural community in the Brazilian state of Bahia. *Arq Bras Cardiol* 81:297–302
- Paixão AD, Maciel CR, Teles MB, Figueiredo-Silva J (2001) Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biol Neonate* 80:239–246
- Pennell JP, Sanjana V, Frey NR, Jamison RL (1975) The effect of urea infusion on the urinary concentrating mechanism in protein-depleted rats. *J Clin Invest* 55:399–409
- Raedler TJ, Wiedemann K (2007) Lithium-induced nephropathies. *Psychopharmacol Bull* 40:134–149
- Rangel LB, Lopes AG, Lara LS, Carvalho TL, Silva IV, Oliveira MM, Einicker-Lamas M, Vieyra A, Nogaroli L, Caruso-Neves C (2005) PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na^+ -ATPase by angiotensin II. *Regul Pept* 127:177–182
- Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC, Hennekens CH (1997) Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 315:396–400

26. Schmidt-Nielsen B, Barrett JM, Graves B, Crossley B (1985) Physiological and morphological responses of the rat kidney to reduced dietary protein. *Am J Physiol* 248:F31–F42
27. Seldin DW, Giebisch G (1985) Glomerular–tubular balance and proximal regulation. In: *The kidney: physiology and pathophysiology*. Raven Press, New York, pp 985–1012
28. Solomon S (1977) Developmental changes in nephron number, proximal tubular length and superficial nephron glomerular filtration rate of rats. *J Physiol* 272:573–589
29. Taussky HH, Shorr E (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 202:675–685
30. Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC (1990) A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 40:533–547
31. Thomsen K, Olesen OV (1984) Renal lithium clearance as a measure of the delivery of water and sodium from the proximal tubule in humans. *Am J Med Sci* 288:158–161
32. Thomson SC, Deng A, Wead L, Richter K, Blantz RC, Vallon V (2006) An unexpected role for angiotensin II in the link between dietary salt and proximal reabsorption. *J Clin Invest* 116:1110–1116
33. Vallon V, Huang D-Y, Deng A, Richter K, Blantz RC, Thomson SC (2002) Salt-sensitivity of proximal reabsorption alters macula densa salt and explains the paradoxical effect of dietary salt on glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 13:1865–1871
34. Valverde RH, Tortelote GG, Lemos T, Mintz E, Vieyra A (2005) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca^{2+} -ATPase by calmodulin and protein kinase A. *J Biol Chem* 280:30611–30618
35. Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, Sachdev HS (2008) Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 371:340–357
36. Vieyra A, Nachbin L, Dios-Abad E, Goldfeld M, Meyer-Fernandes JR, Moraes L (1986) Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 261:4247–4255
37. Whittembury G, Proverbio F (1970) Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflugers Arch* 316:1–25
38. Zohdi V, Moritz KM, Bubb KJ, Cock ML, Wreford N, Harding R, Black MJ (2007) Nephrogenesis and the renal renin–angiotensin system in fetal sheep: effects of intrauterine growth restriction during late gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1267–R1273

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](#)