

FLAVIA GOMES MACHADO

**Mecanismos de lesão renal progressiva
decorrente do tratamento com losartan durante a
lactação**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Dra. Clarice Kazue Fujihara

São Paulo

2008

Dedicatória

Aos meus pais, Maria Antonia e Marco Aurélio, pessoas fundamentais na minha vida, quem tanto amo e tanto tenho a agradecer. Sou imensamente feliz por tê-los ao meu lado comemorando nas vitórias e apoiando nos momentos difíceis. Agradeço muito todo o apoio, incentivo, amor, carinho e dedicação. Amo muitíssimo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Clarice Kazue Fujihara, uma pesquisadora séria e rigorosa. Sinto-me honrada por trabalhar ao lado de uma profissional de tamanha competência. Agradeço com muito carinho por sua paciência e dedicação no desenvolvimento deste trabalho e também no meu desenvolvimento profissional. Valorizo imensamente tudo que aprendi ao seu lado e com certeza ainda tenho muito que aprender. Minha professora e amiga, muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Roberto Zatz, um grande professor e amigo, um exemplo de dedicação à pesquisa científica. Agradeço com muito carinho todos seus ensinamentos, por sua paciência e a colaboração inestimável e imprescindível na minha trajetória.

À Dra. Denise Avancini Costa Malheiros pela análise histomorfométrica, pelos ensinamentos e pela paciência em me orientar nas análises de imunohistoquímica.

Ao Dr. José Mauro Vieira Jr. pelos ensinamentos e pelas discussões e conselhos para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Joel Heimman que disponibilizou seu laboratório e aparelhos para a realização dos experimentos de SDS-PAGE.

Ao LIM12 que disponibilizou a utilização do fotômetro de chama, osmômetro, espectrofotômetro e contador de cintilação líquida.

À Bianca Ventura, Camilla Fanelli, Cláudia Sena e Luciana Faria pelo indispensável apoio técnico, ajuda e colaboração durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por tudo, vocês foram fundamentais.

À Elizabete Poppi, minha colega de pós-graduação e co-autora desse projeto, pelo trabalho de iniciação científica que permitiu o desenvolvimento deste estudo.

A todos os demais colegas do Grupo de Nefropatias Progressivas do LIM16: Cristiene Okabe, Daniele Canale, Flavio Teles, Luiza Furlan, Renata Souza, Silvia Titan e Simone Ribeiro, pelas colaborações e apoio. Muito obrigada a todos.

À Karen e ao Wagner por toda a orientação na realização do SDS-PAGE, e ao Humberto pela ajuda nos primeiros passos da padronização da técnica de contagem de glomérulos.

À Bila, Janice e Walter por todo o suporte técnico e manutenção do biotério.

Às secretárias Neide, Denise e Eliana por toda ajuda nos assuntos administrativos.

A todos os demais do LIM16.

Ao meu irmão César e sua esposa Carla por estarem sempre ao meu lado. Obrigada pelo incentivo, pela força e pelo carinho. Agradeço aos meus amores Matheus e Caio pelos momentos de descontração. Certamente não posso deixar de agradecer à Conceição, uma pessoa muito especial. Muito obrigada por todo o carinho e incentivo. Amo todos vocês.

Ao Rodrigo, meu melhor amigo e grande companheiro, pela paciência e compreensão durante todos os momentos difíceis. Agradeço com muito amor e carinho o apoio e o incentivo. Obrigada por acreditar, amo você!

À Mariliza, Leonardo, Mirian e Viviane, meus amigos queridos, agradeço muito o carinho, a compreensão, a paciência e a amizade. Amo muito vocês.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	5
2. MÉTODOS	6
2.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS	7
2.2. ESQUEMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	7
2.3. CONTAGEM DO NÚMERO DE GLOMÉRULOS	9
2.4. ESTUDOS FUNCIONAIS	10
2.5. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS URINÁRIAS	12
2.6. HISTOLOGIA	14
2.7. ANÁLISE DO TAMANHO DO TUFO GLOMERULAR	15
2.8. IMUNO-HISTOQUÍMICA	15
2.9. DOSAGENS BIOQUÍMICAS	19
2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
3. RESULTADOS	20
3.1. NÚMERO DE NÉFRONS	20
3.2. ESTUDOS FUNCIONAIS	20
3.3. ESTUDOS DE LONGO PRAZO	21
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	34
6. ANEXOS	35
6.1. TABELAS	36
6.2. FIGURAS	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
All	Angiotensina II
A _G	Área glomerular
AT1	Receptor da angiotensina II do tipo 1
AT2	Receptor da angiotensina II do tipo 2
bRAT	Bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II
C	Controle
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FPR	Fluxo plasmático renal
GS	Glomerulosclerose segmentar e focal
%INT	Área intersticial fracional
iECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IEG	Índice de esclerose glomerular
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
ISG	Índice de seletividade glomerular
LRN	Losartan administrado no período neonatal
MØ	Macrófagos
MCP-1	Proteína quimioatratadora de monócitos 1
NF-κB	Fator nuclear– kappa B
Nx	Ablação renal de 5/6

PGC	Pressa hidráulica do capilar glomerular
PAM	Pressão arterial média
PAS	Ácido periódico de Shiff
PC	Pressão caudal
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Peso corpóreo
P_K	Concentração de potássio plasmático
P_{Na}	Concentração de sódio plasmático
RANTES	“Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RVR	Resistência vascular renal
Scr	Concentração de creatinina sérica
SDS-PAGE	Eletroforese de gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato
SRA	Sistema renina-angiotensina
TGF- β	Fator de crescimento de transformação beta
V_G	Volume glomerular
V_{U24h}	Fluxo urinário de 24 horas
U_{albV}	Concentração de albumina na urina de 24 horas
U_{osm}	Osmolalidade urinária
ZO-1	“Zonula occludens-1”

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Estudos da função renal aos 3 meses de idade	37
Tabela 02.	Estudos de longo prazo (3, 6 e 10 meses de idade)	37
Tabela 03.	Parâmetros analisados aos 3 e 10 meses de idade	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Glomérulos corados com nanquim observados em lupa	39
Figura 02.	Gráfico do número de glomérulos por rim	39
Figura 03.	Gráfico do peso corpóreo	40
Figura 04.	Gráfico da pressão caudal	41
Figura 05.	Gráfico da albuminúria de 24 horas	42
Figura 06.	Eletroforese de proteínas urinárias (SDS-PAGE)	43
Figura 07.	Gráfico do índice de seletividade glomerular	43
Figura 08.	Tecido renal com marcação para zonula occludens-1	44
Figura 09.	Gráfico da zonula occludens-1 glomerular	44
Figura 10.	Microfotografias representativas do volume glomerular	45
Figura 11.	Gráfico da distribuição da área glomerular do Grupo C3m	46
Figura 12.	Gráfico da distribuição da área glomerular do Grupo L _{RN} 3m	46
Figura 13.	Gráfico da distribuição da área glomerular do Grupo C10m	47
Figura 14.	Gráfico da distribuição da área glomerular do Grupo L _{RN} 10m	47
Figura 15.	Microfotografia representativa da esclerose glomerular	48
Figura 16.	Gráfico do índice de esclerose glomerular	48
Figura 17.	Gráfico da concentração sérica de creatinina	49
Figura 18.	Gráfico do volume urinário	50
Figura 19.	Gráfico da osmolalidade urinária	51
Figura 20.	Microfotografias representativas do interstício renal	52
Figura 21.	Gráfico da área intersticial fracional	52

Figura 22.	Tecido renal com marcação para macrófagos	53
Figura 23.	Gráfico de macrófagos no interstício renal	53
Figura 24.	Tecido renal com marcação para angiotensina II	54
Figura 25.	Gráfico da angiotensina II intersticial	54

RESUMO

Machado FG. *Mecanismos de lesão renal progressiva decorrente do tratamento com losartan durante a lactação*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 64p.

A inibição do sistema renina-angiotensina durante a lactação acarreta alterações estruturais renais irreversíveis. No presente estudo investigamos a evolução e os mecanismos envolvidos na doença renal crônica causada pela administração de losartan (L) durante a lactação. Ratos Munich-Wistar machos recém-nascidos foram divididos em dois Grupos: C, cujas mães receberam água; e L_{RN}, cujas mães receberam L 250mg/kg/dia durante a lactação. Após 3 meses de vida, os animais L_{RN} apresentaram redução no número de néfrons e no ritmo de filtração glomerular. Embora fossem normotensos, esses animais apresentaram hipertensão glomerular e disfunção podocitária, em consistência com a presença de albuminúria. Os estudos morfológicos mostraram que os ratos L_{RN} apresentaram glomérulos com volumes variados, com lesões glomerulares discretas e lesões intersticiais acompanhadas de inflamação. Aos 10 meses de vida, os animais L_{RN} apresentaram albuminúria maciça, hipertensão sistêmica, inflamação renal e progressão das lesões glomerulares e intersticiais. No presente estudo concluímos que: 1) O bloqueio do receptor AT1 durante a lactação constitui um modelo simples e reprodutível de nefropatia progressiva, que evolui sem hipertensão arterial até fases avançadas; 2) Os mecanismos envolvidos na progressão da lesão renal no modelo de L_{RN} são semelhantes aos de outros modelos de doença renal crônica.

SUMMARY

Machado FG. *Mechanisms of progressive renal injury in adult rats treated with losartan during lactation*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 64p.

Inhibition of the renin-angiotensin system during lactation causes irreversible renal structural changes. In this study we investigated the evolution and the mechanisms underlying the chronic kidney disease caused by losartan (L) administration during lactation. Male Munich-Wistar pups were divided into two Groups: C, whose dams received pure water; and L_{RN}, whose dams received L 250 mg/kg/day. At three months of life, L_{RN} rats showed reduced nephron number and glomerular filtration rate. Though normotensive, these animals exhibited glomerular hypertension and podocyte dysfunction, in consistency with the presence of albuminuria. Morphologic studies revealed that L_{RN} rats exhibit a wide variation of glomerular volumes, with modest glomerular injury and interstitial lesions accompanied by renal inflammation. At 10 months of age, L_{RN} rats exhibited heavy albuminuria, systemic hypertension, renal inflammation and progression of the glomerular and interstitial lesions. Conclusions: 1) AT1 receptor blockade during lactation constitutes a simple and reproductive model of progressive nephropathy, which develops until advanced stages without arterial hypertension; 2) The mechanisms involved in the progression of renal injury in this model are similar to those implicated in other models of chronic renal disease.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica terminal e a necessidade de terapia renal de substituição representam um grave problema de saúde pública [1]. Assim sendo, há necessidade de desenvolver modelos experimentais que sejam capazes de reproduzir a patologia humana para buscar novas terapias que retardem ou mesmo revertam as doenças renais progressivas.

Nas nefropatias progressivas a angiotensina II (AII) é um dos principais mediadores envolvidos na perda contínua do número de néfrons e na progressão para a insuficiência renal crônica [2-4]. A atividade biológica da AII é mediada pela sua alta afinidade a receptores específicos de membrana, que foram identificados até o presente momento como os receptores AT1 e AT2. Os efeitos biológicos mais estudados em animais adultos são aqueles mediados pelo receptor AT1, tais como a vasoconstrição que leva à hipertensão sistêmica e glomerular e a retenção de sódio, por ação direta nos túbulos renais ou através de estímulo à produção de aldosterona. Além desses efeitos, tem sido descrita em anos recentes a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) na resposta imunológica e inflamatória. A AII está envolvida, provavelmente através do receptor AT1, em vários aspectos do processo inflamatório [5, 6], regulando a expressão de várias substâncias bioativas, tais como fatores de crescimento [7] e citocinas [2, 8]. O tratamento com antagonistas do receptor

AT1 (bRAT), e com inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), apresentou um efeito anti-hipertensivo, anti-proteinúrico e renoprotetor em pacientes com nefropatia diabética, protegendo contra a progressão da nefropatia, adiando a necessidade de diálise ou transplante [3, 9-11].

Um dos modelos experimentais que mais tem sido utilizado para estudar a nefropatia progressiva é o da ablação renal de 5/6 (Nx). A redução no número de néfrons leva a uma sobrecarga nos néfrons remanescentes o que acarreta hipertensão e hipertrofia glomerular. Com a perpetuação do insulto, a inflamação, a esclerose glomerular e a fibrose do tecido renal progridem até que haja perda total da função renal. Há ainda outras alterações observadas nesse modelo como expansão da matriz extracelular [6], esclerose glomerular intensa e grande infiltração de macrófagos (MØ) (13,14). De maneira semelhante a outras nefropatias, a participação da AII é também descrita nas alterações hemodinâmicas e inflamatórias características do modelo Nx [12, 13]. Essas alterações são sensivelmente alteradas com o uso de bRAT ou iECA [12, 14, 15] que evitam a rápida progressão da nefropatia.

Na nefrogênese, a AII exerce um importante efeito fisiológico [16], sendo a integridade do SRA necessária para que ocorra um desenvolvimento normal do rim [17-21]. Sabe-se que, durante o período neonatal, a atividade da ECA (enzima conversora de angiotensina) [17] e a própria AII [22] estão aumentadas no tecido renal, assim como a dos receptores AT1 e AT2 [23, 24]. Os componentes do SRA desempenham papéis importantes tanto na maturação renal quanto na formação dos ureteres. Durante a embriogênese, o epitélio

derivado do ramo ureteral expressa angiotensinogênio e receptores AT1 [25]. Outras estruturas do parênquima renal expressam quantidades ainda maiores de angiotensinogênio, como os túbulos proximais, onde essa expressão é mais precoce e se mantém durante todo o período fetal [23]. Os feixes vasculares e as células mesangiais também apresentam altos níveis de angiotensinogênio durante a nefrogênese [26], e seu padrão de expressão e atividade é semelhante ao da ECA, que apresenta um pico por volta das duas semanas de idade e diminui por volta de um mês após o nascimento [23]. Além disso, a expressão da renina durante a embriogênese renal sugere que esse peptídeo tenha um importante papel na maturação vascular, uma vez que se expressa nas células do aparelho justaglomerular e na vasculatura intra-renal [23]. Quanto aos receptores para Ang II, tanto o receptor AT1 quanto o AT2 são expressos durante a nefrogênese. O receptor AT2 tem sua densidade diminuída após o nascimento, apresentando-se em quantidades muito baixas no indivíduo adulto, de modo exatamente inverso ao que ocorre com os receptores AT1 [23].

Vários Grupos de pesquisadores demonstraram que a inibição do SRA durante a etapa final da nefrogênese acarreta alterações estruturais irreversíveis, que se reflete em grave limitação da função renal na fase adulta [16, 27-29]. O uso de iECA durante essa fase resulta em um desenvolvimento tubular anormal [29] somado a uma diminuição da capacidade de concentrar a urina, fibrose intersticial, atrofia papilar, inflamação e dilatação tubular [21, 29-31]. Efeitos semelhantes são observados quando o SRA é deprimido farmacologicamente através da administração de uma droga antagonista do

receptor AT1 [21], sugerindo uma importância específica desse receptor. A utilização de losartan, um inibidor competitivo do receptor AT1, apenas durante a fase neonatal, levou a um aumento da pressão arterial, queda na função renal e na capacidade de concentrar a urina, fibrose intersticial, esclerose glomerular e diminuição do número de néfrons por rim em animais adultos [21]. Esses efeitos marcantes da inibição do SRA durante o período neonatal estão relacionados com o fato dos roedores completarem a nefrogênese após o nascimento, enquanto que em humano a formação renal é intra-uterina [32]. No entanto, é válido ressaltar que o tratamento com iECA/bRAT protege da progressão das lesões nas diferentes nefropatias em indivíduos adultos, mas promove lesões renais irreversíveis nos recém-nascidos. Em outras palavras, a Ang II é necessária durante a embriogênese para o desenvolvimento renal normal e ao mesmo tempo é mediadora de fenômenos inflamatórios altamente lesivos na doença renal progressiva.

1.1 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi verificar a evolução e os mecanismos envolvidos na doença renal crônica causada pelo bloqueio do receptor AT1 da All durante a lactação.

2. MÉTODOS

No presente estudo utilizamos ratos da cepa Munich-Wistar obtidos de uma colônia dessa linhagem de ratos estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela CAPPesq (protocolo nº 0166/07).

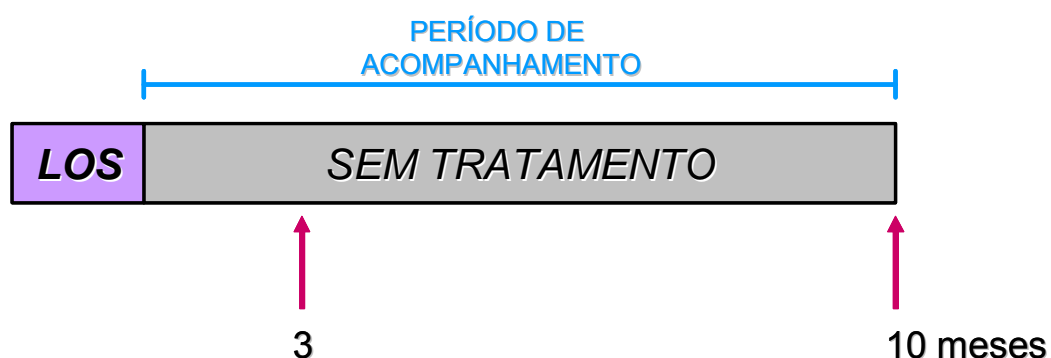
Utilizamos ratas fêmeas com suas respectivas proles compostas de 6 filhotes (machos e fêmeas). Durante os primeiros 20 dias de lactação, as mães receberam uma droga bloqueadora dos receptores AT1 da AII (losartan) na dose de 250 mg/Kg/dia diluído na água do bebedouro e protegida da luz. Spence *et al* mostraram que cerca de 50% do losartan administrado às ratas lactantes é secretado no leite [33], assim, a prole recebeu o losartan através do leite materno. A dose foi baseada em testes prévios realizados nesse laboratório, sendo essa dose a maior possível para que não houvesse morte precoce dos animais ou grande perda de peso. Após os desmames, 25 dias de vida (5 dias após a interrupção da administração de losartan), os filhotes machos foram distribuídos em gaiolas onde receberam água e ração. Todos os

animais foram mantidos em dieta obtida comercialmente (Nuvilab, Curitiba, PR), acrescida de 15% de caseína e com livre acesso à água e alimentação.

2.1. Grupos experimentais

- **C:** 23 ratos cujas mães receberam água no bebedouro durante a amamentação.
- **L_{RN}:** 23 ratos cujas mães receberam losartan na dose de 250 mg/Kg/dia diluído na água do bebedouro durante a amamentação.

2.2. Esquema do Protocolo Experimental



Protocolos experimentais

1) Aos 3 meses de idade avaliamos:

- o número de glomérulos por rim através da técnica de infusão de nanquim e digestão ácida tecidual [34-36];
- estudo funcional: medida de “clearance” de inulina e pressão hidráulica glomerular (P_{GC});

- a pressão sistólica caudal (PC), a albuminúria de 24 horas ($U_{alb}V$) e a concentração de creatinina sérica (Scr);
- a dosagem da concentração plasmática de sódio (P_{Na}) e potássio (P_K) por fotômetro de chama;
- a osmolalidade urinária (U_{osm}) por osmômetro;
- a lesão glomerular, a expansão intersticial e a área e volume glomerular;
- a infiltração de MØ, o número de células positivas para All e a expressão glomerular de ZO-1 (“zonula occludens-1”) através do método imuno-histoquímico;
- a seletividade glomerular através de SDS-PAGE com urina de 24 horas.

2) Aos 10 meses de idade avaliamos:

- a PC, a $U_{alb}V$ e a Scr;
- a dosagem da concentração de P_{Na} e P_K por fotômetro de chama;
- a U_{osm} por osmômetro;
- a lesão glomerular, a expansão intersticial, a área e o volume glomerular;
- a infiltração de MØ, o número de células positivas para All e a expressão glomerular de ZO-1 através do método imuno-histoquímica;

- a seletividade glomerular através de SDS-PAGE com urina de 24 horas.

Após o desmame, o crescimento dos animais dos Grupos C e L_{RN} foi acompanhado ao longo do estudo. Aos 3, 6 e 10 meses de vida realizamos as coletas das urinas de 24 horas (V_{U24h}) para a medida de $U_{alb}V$ através da técnica de imuno-difusão radial [37] e determinamos a PC dos animais. Aos 3 e 10 meses de vida os animais foram anestesiados com solução de ketamina (Cristália, 50 mg/kg) e rompun (Bayer, 10 mg/kg) e em seguida os tecidos renais foram perfundidos *in situ* com soro fisiológico e em seguida com uma solução de Duboscq-Brazil. Após a perfusão o rim foi pesado e preparado para o estudo histológico e imuno-histoquímico. A reação do ácido periódico de Shiff (PAS) foi utilizada para a avaliação de lesões glomerulares e a coloração de Tricrômio de Masson para quantificar a lesão intersticial do tecido renal. Os tecidos corados com PAS foram também utilizados para a análise da área glomerular (A_G) e do volume glomerular (V_G). A reação de imuno-histoquímica foi utilizada para avaliar a infiltração de MØ, células positivas para AII e porcentagem do tufo glomerular positiva para ZO-1.

2.3. Contagem do número de glomérulos

A quantificação do número de glomérulos por rim foi realizada através da adaptação da técnica de infusão de nanquim e digestão do tecido renal com ácido clorídrico (HCl). [34-36]. Após 3 meses de vida, os animais foram

anestesiados com solução de ketamina (Cristália, 50 mg/kg) e rompun (Bayer, 10 mg/kg) e submetidos à laparotomia mediana. O tecido renal direito foi perfundido com solução fisiológica e em seguida com solução de nanquim (0,50 Fl.Oz., Acrilex), aproximadamente 10 ml diluído 1:5 em soro fisiológico. Após a excisão do rim direito, a cápsula renal foi retirada e o córtex isolado da região medular. O tecido cortical renal foi fragmentado com o auxílio de uma navalha e levados à solução de HCl 50% a 37°C em banho-maria por 1 hora. Para que a reação de digestão do tecido fosse interrompida, a solução de HCl foi substituída pela solução fisiológica gelada (10 ml) e mantida refrigerada até o dia seguinte. Após 24 horas, o material foi submetido à agitação em vórtex, sob alta velocidade, até que a aparência do tecido renal ficasse semelhante à areia fina. O volume foi completado para 15 ml com solução fisiológica e em seguida retirado 1 ml para a contagem do número de glomérulo. A solução foi colocada em uma placa de Petri de vidro e a contagem realizada com o auxílio de uma lupa e uma grade para direcionar o observador. A contagem foi realizada por 2 observadores e em duplicata. O número de glomérulos obtido em 1 ml da solução foi multiplicado pelo volume total, assim sendo o valor obtido corresponde ao número estimado de glomérulos por rim

2.4. Estudos funcionais

Após 3 meses de vida, os animais foram anestesiados com inactina (100 mg/Kg de peso corpóreo i.p.) e a temperatura corpórea do animal foi mantida a $37\pm 0,5$ °C. A artéria femoral foi canulada com tubo de polietileno PE-50 para

coleta de amostras de sangue durante o experimento e para monitorização contínua da pressão arterial sistêmica através de um transdutor de pressão do tipo P23Db, acoplado a um sistema computadorizado de aquisição de dados (Windaq). Após a traqueotomia, a veia jugular direita foi canulada com um tubo de polietileno PE-50 para a infusão de inulina marcada radioativamente com carbono 14 (^{14}C) diluída em soro fisiológico (0,3 $\mu\text{Ci/ml}$), infundido à taxa de 0,03 ml/min durante todo o experimento. A jugular esquerda foi também canulada para receber uma infusão contínua de soro homólogo com o objetivo de repor a perda de volume em consequência ao procedimento cirúrgico, conforme descrito por Maddox *et al* [38]. O rim esquerdo foi exposto por uma incisão subcostal e imobilizado com o auxílio de pequenas pás de acrílico e bastões de vidro. Durante todo o experimento a superfície renal foi banhada continuamente com soro fisiológico através de gotejamento. O ureter foi canulado com um tubo de polietileno PE-10 e as coletas de urina foram iniciadas após 2½ horas de anestesia. A determinação do fluxo urinário (V_U) e da concentração urinária de inulina (U_{IN}) foi realizada em 2 períodos consecutivos de 30 minutos. No meio de cada período foi obtida uma amostra de sangue da artéria femoral (A_{IN}) para medida de “clearance” de inulina (C_{IN}), equivalente ao ritmo de filtração glomerular (RFG): $\text{RFG} = C_{IN} = (U_{IN}/A_{IN})V_U$. A atividade de ^{14}C no plasma e na urina foi determinada em um contador de cintilação líquida (Packard Instruments, Massachusetts, USA). Simultaneamente à coleta de sangue arterial, foi realizada a coleta de sangue da veia renal (V_{IN}), através de micropipetas afiadas de 40-45 μm de diâmetro,

para a medida da extração renal de inulina radioativa. A fração de filtração (FF) renal total foi considerada idêntica à extração renal de inulina radioativa (E_{IN}), determinada através da expressão $(E_{IN})= FF= (A_{IN}-V_{IN})/A_{IN}$. A partir desses dados foi possível calcular o fluxo plasmático renal (FPR), calculado como $FPR=RFG/FF$ e a resistência vascular renal (RVR), descrita pela expressão $RVR=PAM(1-Ht)/FPR$ (pressão arterial média, PAM e hematócrito arterial, Ht). As medidas de pressão hidráulica nos túbulos proximais (P_T), nas arteríolas eferentes (P_E) e nos glomérulos superficiais (P_{GC}) foram obtidas utilizando micropipetas de vidro com biséis de 1-3 μm de diâmetro. As micropipetas foram preenchidas com cloreto de sódio 2 M e acopladas a um sistema servo-anulador de medida de pressão (modelo V, Instruments for Physiology and Medicine, Califórnia, USA). Esse sistema foi conectado a um transdutor de pressão que por sua vez ligado a um segundo canal do sistema de aquisição de dados (DATAQ Instruments, Ohio, USA).

2.5. Análise das proteínas urinárias

Método de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta da V_U 24h. As amostras de urina foram utilizadas para a análise de sua composição protéica que foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de sódio dodecil sulfato (SDS), utilizando uma adaptação do sistema descontínuo descrito por Laemmli *et al* [39]. O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de solução de acrilamida/bisacrilamida

30%, solução tampão Tris/HCl (1 M de pH 8,8), água destilada, SDS 10%, persulfato de amônio e TEMED (Tetrametiletenodiamina). A solução foi transferida para um aparato contendo 2 placas de vidro com 1 mm entre elas. Após a polimerização foi acrescentado o gel de empilhamento que foi preparado com solução de acrilamida/bisacrilamida 30%, solução tampão Tris/HCl (0,5 M de pH 6,8), água destilada, SDS 10%, persulfato de amônio e TEMED. O volume de cada amostra de urina ou solução padrão foi individualmente ajustado para que a quantidade de proteína fosse sempre igual a 25 µg. A cada amostra foi adicionado solução tampão composta de tris-HCl (0,5 M de pH 6,8), SDS 10%, glicerol, solução de azul de bromofenol 0,5% e água destilada e em seguida aplicadas nas canaletas da superfície do gel de empilhamento. Para a identificação do peso molecular das proteínas das amostras, um padrão de proteínas de peso molecular conhecido (Invitrogen™, de 4 a 250 kDa) e um padrão de imunoglobulina purificada de rato (IgG) (Sigma Aldrich®) foram também aplicadas no gel. A eletroforese ocorreu a uma voltagem de 220V com corrente variando de 20 a 70 mA. Após a corrida o gel de empilhamento foi desprezado e o gel de separação foi corado com solução contendo azul de Comassie R-250, metanol e ácido acético glacial. O gel resultante foi colocado em plástico transparente e fotografado para análise densitométrica das bandas utilizando o programa Scion Image® for Windows (Scion Corp, USA). Foram quantificadas as bandas equivalentes ao peso molecular da IgG (180kDa), da albumina (68kDa) e da corrida total. A partir dos valores das proteinúrias de 24

horas obtidos pela reação de Bradford, foi possível calcular a excreção de proteínas de peso molecular semelhante ao da IgG (180kDa) e o da albumina (68kDa) em 24 horas. A relação entre essas proteínas excretadas (180 kDa/68 kDa) indica o índice de seletividade glomerular (ISG). O ISG próximo de zero indica que a barreira glomerular é extremamente seletiva quanto ao tamanho e próximo de 1 indica que a barreira glomerular é mais permeável.

2.6. Histologia

Após 3 e 10 meses de vida, os tecidos renais foram perfundidos, pesados e fatiados em 2-3 segmentos coronais, de 4-5 mm de espessura e pós-fixados em formaldeído a 10% em tampão fosfato. Os tecidos renais foram incluídos em parafina e cortados em espessura de 4 μ m e corados positivamente pela reação de PAS para quantificar as lesões glomerulares e tricrômio de Masson para quantificar a fração do córtex renal ocupada por tecido intersticial (%INT). O grau de lesão glomerular de cada rato foi avaliado examinando-se sucessivamente um número de glomérulos nunca inferior a 150, atribuindo-se a cada glomérulo uma “nota” correspondente à extensão da lesão: 0, para glomérulos intactos; 1, para lesões acometendo 10% ou menos da superfície glomerular; 2, para lesões afetando entre 10-20% do glomérulo; 3, para lesões compreendendo entre 20-30 % do glomérulo e assim por diante até a “nota” 10, correspondente à esclerose global do glomérulo. O índice de esclerose glomerular (IEG) foi calculado para cada rato como média ponderada de todas as “notas” atribuídas a glomérulos individuais. A extensão da %INT foi

quantificada por um método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 100x com uma ocular graticulada de 144 pontos [40].

2.7. Análise do tamanho do tufo glomerular

A A_G de cada glomérulo foi estimada em tecidos renais, corados pela reação de PAS, através do método de *Weibel* [41]. A A_G foi determinada através da contagem de pontos, foram avaliados 50 glomérulos consecutivos, através de um graticulado de 144 pontos que cobria uma área de $64900 \mu\text{m}^2$. O V_G médio foi calculado como $V_G = 1.25 \times (A_G)^{3/2}$ [42].

2.8. Imuno-histoquímica

Os métodos utilizados para o estudo imuno-histoquímico foram Kit NovoLink para Peroxidase, Streptavidin-Biotin-AP (Streptavidina-biotina-Fosfatase alcalina) e APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina).

Após 30 minutos em estufa a 60°C , os cortes de $4 \mu\text{m}$ foram submetidos à desparafinização em 3 banhos de xilol e re-hidratados em etanol (concentrações decrescentes) e água destilada. A exposição dos epítomos procedeu-se em solução de ácido cítrico 10mM de pH 6,0, a 98°C em panela a vapor por 30 minutos. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes.

Infiltração de macrófagos

A identificação de células positivas para MØ foi realizada pelo método de APAAP. Após a desparafinização e a recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de coelho (Dako, Dinamarca) em concentração 1:20 por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário desenvolvido em camundongo anti-ED-1 (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido) na diluição 1:200, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:50 à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após nova lavagem em TBS, os cortes foram incubados com o Complexo APAAP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:70 por 30 minutos. Ao final desses procedimentos, os tecidos estavam prontos para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Fast-Red. As células positivas para ED-1 são visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do Fast-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante um minuto e 20 segundos. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e devidamente etiquetados. A quantificação de MØ foi realizada pela contagem de células marcadas em córtex renal com aumento de 200X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção,

correspondendo a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado.

Expressão de All

A expressão de All foi avaliada pelo método de Estreptavidina-biotina-AP. Após a desparafinização e a recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Vector, Burlingame, CA, EUA) por 15 minutos cada. Após lavagem com TBS, foi realizado o bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de cavalo (Dako, Dinamarca), diluído 1:70 em solução 2% de leite desnatado em pó em TBS. Os tecidos renais foram incubados com o anticorpo primário de coelho anti-angiotensina II na diluição 1:400 (Peninsula Laboratories, Inc., EUA) à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso do anticorpo primário, o tecido foi lavado em TBS e incubado com o anticorpo secundário anti-coelho biotilado desenvolvido em cabra (Vector, Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:1000 à temperatura ambiente por 45 minutos. Após nova lavagem em TBS, os tecidos foram incubados com o Complexo Estreptavidina Biotina-AP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), na concentração 0,05M e então foram revelados com o mesmo substrato cromogênico utilizado para o método APAAP. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 1 minuto e 20 segundos. Os tecidos renais foram montados e etiquetados de maneira semelhante ao descrito no método de APAAP. A quantificação da angiotensina II foi realizada pela contagem de

células marcadas em córtex renal com aumento de 200x. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado.

Expressão de ZO-1

A expressão de ZO-1 foi avaliada pelo método do Kit NovoLink para Peroxidase. Após a desparafinização e a recuperação antigênica, o tecido foi incubado com a solução “Novocastra™ Peroxidase Block” durante 5 minutos. Após a incubação com a solução “Novocastra™ Protein Block” durante 5 minutos, os tecidos renais foram incubados com o anticorpo primário anti-ZO-1 desenvolvido em coelho (Zymed Laboratories, EUA) diluído 1:1000 à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Em seguida, as lâminas foram incubadas com solução “Novocastra™ Post Primary Block” durante 30 minutos e na seqüência com “NovoLink™ Polymer” também durante 30 minutos. A cada incubação, os tecidos foram lavados em solução tampão PBS. A revelação foi realizada com a solução “NovoLink™ DAB Chromogen” diluído em “NovoLink™ DAB Substrate Buffer” e a contracoloração foi realizada com “Novocastra™ Hematoxylin” durante 1 minuto e 25 segundos. Os tecidos renais foram montados e etiquetados de maneira semelhante ao descrito no método anterior. Foram examinados 50 glomérulos com aumento de 200X em um graticulado de 144 pontos, para cada seção. Os resultados estão expressos em porcentagem do tufo glomerular marcado.

2.9. Dosagens Bioquímicas

A dosagem da Scr foi realizada utilizando um sistema colorimétrico comercial (Kit Labtest Diagnóstica S.A.) que tem correlação com o método de reagente de Lloyd [43].

A dosagem de P_{Na} e P_K foi realizada através da utilização de fotômetro de chama [44].

2.10. Análise estatística

Os resultados deste estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores com comparações pareadas entre Grupos quanto ao tratamento e quanto ao tempo de vida. Foi utilizado o post-test pelo método de Bonferroni [40] para as comparações. Os resultados obtidos nos estudos hemodinâmicos e número de glomérulos foram analisados através de teste T não pareado. Todos os resultados estão representados em média±erro padrão (EP).

3. RESULTADOS

No presente estudo utilizamos 23 ratos que receberam losartan durante a lactação, dos quais 10 foram estudados aos 3 meses ($L_{RN}3m$) e 13 aos 10 meses de idade ($L_{RN}10m$). Utilizamos também 23 ratos controles, desses 10 foram estudados com 3 meses de idade ($C3m$) e 13 com 10 meses de idade ($C10m$). Não observamos nenhuma mortalidade nos Grupos estudados.

3.1. Número de Néfrons

Os resultados da contagem do número de glomérulos por rim estão apresentados na Figuras 1 e 2. A administração de losartan às ratas lactantes acarretou redução do número de néfrons na prole, sendo 26564 ± 1127 no Grupo C e 17830 ± 1284 no Grupo L_{RN} ($p < 0,05$), cerca de 35% menos néfrons no Grupo L_{RN} quando comparado ao Grupo C.

3.2. Estudos funcionais

Aos 3 meses de vida, as medidas de PAM, RFG, FPR, RVR e P_{GC} foram realizadas e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Nessa fase da vida, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram PAM semelhante quando comparado ao Grupo controle da mesma idade ($p > 0,05$). O RFG e o FPR dos animais L_{RN} estavam reduzidos comparados com o Grupo C ($p < 0,05$). A redução do FPR foi

proporcional à observada no RFG, sendo aproximadamente 67% do Grupo C. Os animais do Grupo $L_{RN}3m$ apresentaram RVR maior que o Grupo controle ($p < 0,05$), o que pode explicar o fluxo plasmático renal reduzido no Grupo que recebeu losartan durante a lactação. A P_{GC} dos ratos L_{RN} estava aumentada após 3 meses de vida ($p < 0,05$), ou seja, esses animais apresentam hipertensão glomerular apesar de serem normotensos sistemicamente.

3.3. Estudos de longo prazo

Na Tabela 2 e nas Figuras 3, 4 e 5 estão representados os resultados referentes às medidas de peso corpóreo (PE), PC e $U_{alb}V$ dos animais aos 3, 6 e 10 meses de vida.

A evolução do PE (Figura 3) dos animais dos Grupos C e L_{RN} indica que houve crescimento ao longo do estudo em ambos os Grupos ($p < 0,05$). Os resultados da PC estão representados graficamente na Figura 4. As medidas de PC indicam que ao longo de 6 meses, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram valores semelhantes aos seus respectivos controles ($p > 0,05$). Após 6 meses de vida, os animais que receberam losartan apresentaram um aumento progressivo na pressão sistêmica ($L_{RN}6m$ vs. $L_{RN}10m$, $p < 0,05$ e $C10m$ vs. $L_{RN}10m$, $p < 0,05$).

Na Figura 5 estão representados graficamente os resultados das medidas da $U_{alb}V$. Os animais do Grupo L_{RN} apresentaram albuminúria numericamente elevada desde o início do estudo (3 meses de vida) quando comparada com o Grupo C ($C3m$ vs. $L_{RN}3m$, $p > 0,05$). Após 10 meses, a

albuminúria era maciça no Grupo L_{RN} ($p < 0,05$ vs. C10 m e $L_{RN}3m$). O Grupo C apresentou aumento da $U_{alb}V$ de acordo com o envelhecimento ($p > 0,05$).

Na Tabela 3 e na Figura 18 está representado o resultado do V_{U24h} . Aos 3 meses de vida, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram um aumento discreto no V_{U24h} (C3m vs. $L_{RN}3m$, $p > 0,05$). Após 10 meses de idade a diferença entre os Grupos C e L_{RN} se acentua (C10m vs. $L_{RN}10m$, $p < 0,05$ e $L_{RN}3m$ vs. $L_{RN}10m$, $p < 0,05$). Uma vez que o V_{U24h} foi bastante elevado, realizamos a medida da U_{osm} , apresentada graficamente na Figura 19 e os valores estão na Tabela 3. Os animais L_{RN} apresentaram uma diferença significativa na U_{osm} aos 3 meses de vida, comparado ao Grupo C da mesma idade ($p < 0,05$). Aos 10 meses, a diferença entre os Grupos foi ainda maior ($p < 0,05$). Após 10 meses de vida, a U_{osm} no Grupo L_{RN} estava acentuadamente reduzida quando comparada com $L_{RN}3m$ ($p < 0,05$).

Após a anestesia, amostras de sangue foram coletadas para dosagens de Scr e concentração de P_{Na} e P_K , os resultados estão na Tabela 3. A Scr está representada graficamente na Figura 17. Aos 3 meses de vida, a Scr foi semelhante nos dois Grupos ($p > 0,05$). Aos 10 meses de vida a Scr aumentou significativamente no Grupo L_{RN} quando comparada ao controle ($p < 0,05$). A concentração de P_{Na} não foi diferente entre os Grupos aos 3 meses ($p > 0,05$) e aos 10 meses ($p > 0,05$). A concentração de P_K mostrou resultado semelhante, não havendo diferença entre os Grupos C e L_{RN} aos 3 meses ($p > 0,05$) e aos 10 meses ($p > 0,05$).

Estudos da barreira de filtração

Nas Figuras 6 e 7 e na Tabela 3 estão representados os resultados quanto ao estudo da seletividade da barreira de filtração glomerular. Os animais do Grupo L_{RN} apresentaram, desde os 3 meses de vida, um ISG estatisticamente maior que o respectivo controle (C3m vs. $L_{RN}3m$, $p < 0,05$). Aos 10 meses de vida essa diferença em relação ao respectivo controle se manteve, (C10m vs. $L_{RN}10m$, $p < 0,05$). Esses resultados indicam que a barreira de filtração glomerular dos animais L_{RN} é deficiente, permitindo a passagem de proteínas de alto peso molecular em maior quantidade que em ratos C.

Os resultados da imuno-histoquímica para ZO-1 glomerular estão representados nas Figuras 8 e 9 e na Tabela 3. Aos 3 meses de idade os animais do Grupo L_{RN} apresentaram uma diminuição significativa na expressão glomerular de ZO-1 (C3m vs. $L_{RN}3m$, $p < 0,05$) e aos 10 meses de idade essa diferença permaneceu (C10m vs. $L_{RN}10m$, $p < 0,05$).

Análise morfológica

Utilizando os tecidos renais corados através da técnica de PAS, avaliamos o tamanho dos glomérulos e o IEG. Os resultados da análise do tamanho do tufo glomerular estão representados nas Figuras 11, 12, 13, e 14 em gráficos de distribuição das A_G , sendo, respectivamente, dos Grupos C3m, $L_{RN}3m$, C10m e $L_{RN}10m$. No Grupo C3m (Figura 11) obtivemos um gráfico de frequência que se apresenta sob a forma de distribuição normal (curva de Gauss) e o V_G médio é $0,90 \pm 0,03 \times 10^6 \mu m^3$. No Grupo $L_{RN}3m$ (Figura 12) o V_G médio foi de $1,18 \pm 0,06 \times 10^6 \mu m^3$, estatisticamente diferente do Grupo C3m

($p < 0,05$). Além disso, o gráfico de distribuição de freqüências obtido mostra que no Grupo $L_{RN}3m$ a distribuição não é Gaussiana. Observamos uma alta freqüência de glomérulos com A_G entre 1501 e $3000 \mu m^2$, o que corresponde a cerca de 14% do total de glomérulos, enquanto no Grupo $C3m$ a freqüência de glomérulos desse tamanho foi cerca de 4%. Além da diferença na freqüência de glomérulos de tamanhos reduzidos, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram glomérulos hipertrofiados. Enquanto no Grupo $C3m$ a A_G máxima foi entre 18001 e $19500 \mu m^2$, no Grupo $L_{RN}3m$ os glomérulos maiores apresentaram A_G entre 22501 e $24000 \mu m^2$. Os animais do Grupo $C10m$ (Figura 13) apresentaram um gráfico de distribuição normal, porém deslocada para a direita quando comparada ao Grupo $C3m$, o que pode ser explicado pelo envelhecimento, seu V_G médio foi de $1,53 \pm 0,03 \times 10^6 \mu m^3$ ($p < 0,05$ vs. $C3m$). O Grupo $L_{RN}10m$ (Figura 14) apresentou, como aos 3 meses, uma distribuição de freqüência bastante variada dos glomérulos quanto ao tamanho e seu V_G médio foi de $1,58 \pm 0,05 \times 10^6 \mu m^3$ ($p > 0,05$ vs. $C10m$ e $p < 0,05$ vs. $L_{RN}3m$). Enquanto no Grupo $L_{RN}10m$ a freqüência de glomérulos com A_G entre 1501 e $3000 \mu m^2$ foi aproximadamente 13%, no Grupo $C10m$ foi cerca de 2%. A presença de glomérulos hipertrofiados também foi observada aos 10 meses de idade nos animais L_{RN} , uma vez que os maiores glomérulos desse Grupo apresentaram A_G entre 33001 e $34500 \mu m^2$ e no Grupo controle da mesma idade os maiores glomérulos apresentaram A_G entre 25501 e $27000 \mu m^2$.

Nas Figuras 15 e 16 e na Tabela 3 estão representados os resultados do IEG. Os animais do Grupo L_{RN} apresentaram IEG elevado quando comparados

ao Grupo C. Aos 3 meses de idade, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram valores numericamente maiores que seu respectivo controle (C3m vs. L_{RN}3m, $p > 0,05$). Essa diferença no IEG aumentou drasticamente após 10 meses de vida no Grupo L_{RN}, (C10m vs. L_{RN}10m, $p < 0,05$ e L_{RN}3m vs. L_{RN}10m, $p < 0,05$), mesmo período no qual os animais apresentaram hipertensão sistêmica.

Os resultados da quantificação da expansão intersticial estão representados nas Figuras 20 e 21 e na Tabela 3. Aos 3 meses de vida, a %INT dos animais do Grupo L_{RN} era maior que a do Grupo C ($p < 0,05$) e foi acentuada após os 10 meses. No último período do estudo, o Grupo L_{RN} apresentou uma grande área de interstício expandida, (C10m vs. L_{RN}10m, $p < 0,05$ e L_{RN}3m vs. L_{RN}10m, $p < 0,05$).

Foi realizada a análise imuno-histoquímica para a marcação do epítipo ED-1 dos MØ a fim de verificarmos o infiltrado inflamatório no tecido corado, os resultados estão representados nas Figuras 22 e 23 e na Tabela 3. A quantificação das células positivas no interstício renal revelou que os animais tratados com losartan no período neonatal apresentaram infiltrado intersticial macrofágico já aos 3 meses de vida (C3m vs. L_{RN}3m, $p < 0,05$). Aos 10 meses de vida a diferença entre os Grupos no número de células positivas para ED-1 foi ainda maior (C10m vs. L_{RN}10m, $p < 0,05$). A diferença entre os Grupos L_{RN}3m e L_{RN}10m foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando que houve progressão da inflamação no tecido renal.

A quantificação das células positivas para All no interstício renal está representada nas Figuras 24 e 25 e na Tabela 3. Os animais do Grupo L_{RN}

apresentaram um aumento no número de células positivas para AII no interstício renal aos 3 meses de vida (C3m vs. L_{RN}3m, $p>0,05$). Aos 10 meses, esse aumento foi acentuado sendo estatisticamente diferente do Grupo C (C10m vs. L_{RN}10m, $p<0,05$).

4. DISCUSSÃO

Dados obtidos previamente no nosso laboratório [45] e dados de literatura [21, 23, 26, 27] indicam a importância da integridade do SRA durante a nefrogênese. No presente estudo observamos que o bloqueio do AT1 no período neonatal resultou em alterações estruturais irreversíveis, o que em longo prazo levou ao desenvolvimento de hipertensão arterial, albuminúria intensa, lesões glomerulares e intersticiais associadas à inflamação renal.

Após 3 meses de vida, fase na qual as lesões renais ainda eram discretas, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram redução no número de néfrons e alterações hemodinâmicas importantes. A redução no número de néfrons foi de cerca de 30% em relação ao Grupo controle, corroborando os resultados de outros autores que utilizaram um método estereológico para realizar a medida do número de néfrons [20, 21]. Concomitantemente à redução no número de néfrons, os animais L_{RN} apresentaram queda na taxa de filtração glomerular e do fluxo plasmático renal associado a um aumento da resistência vascular renal total. Essas observações corroboram a hipótese de que a All está envolvida na maturação dos néfrons e que o seu bloqueio no período neonatal promove alterações estruturais e funcionais no rim. Dados de literatura indicam que a All aumenta a complexidade das ramificações do broto uretérico *in vivo* [25] e que o seu bloqueio no período neonatal acarreta uma redução no número de ramificações vasculares, comprometendo a maturação dos vasos

renais e promovendo espessamento da parede das arteríolas, além de encurtamento e redução nas ramificações da rede arteriolar glomerular [19]. É possível que essas alterações nas estruturas arteriolas tenham comprometido a sua capacidade de regular a pressão intraglomerular, levando ao aumento na pressão hidráulica glomerular observada nos nossos animais. Não podemos, no entanto, descartar a hipótese de que a hipertensão glomerular observada nos ratos L_{RN} seja resultado da adaptação hemodinâmica à redução no número de néfrons. Sabe-se que a hipertensão glomerular e a hiperfiltração são mecanismos compensatórios à perda do número de néfrons. A hipertensão e a hiperfiltração glomerular estão sempre presentes quando há redução no número de néfrons funcionais, tanto em modelos de retirada abrupta de massa renal quanto em modelos em que a perda de néfrons é gradativa. Curiosamente, nos ratos L_{RN} observamos que a redução no RFG foi proporcional à diminuição do número de néfrons (ambos os parâmetros reduziram-se a 70% do controle), o que sugere à primeira vista a ausência de hiperfiltração glomerular por néfron. Há, no entanto, alguns indícios de que nos ratos L_{RN} , pelo menos uma parte dos néfrons remanescentes está hiperfiltrando: 1) Constatamos que há populações de glomérulos de volumes diferentes, sendo que os de volume reduzido (glomérulos hipotróficos) podem ser vestígios de glomérulos imaturos ou malformados e são possivelmente não funcionais ou apresentam baixa taxa de filtração glomerular; 2) Nos ratos L_{RN} , há uma segunda população de glomérulos que são hipertrofiados; 3) Considerando que os glomérulos hipotróficos provavelmente contribuem pouco

ou nada para o RFG global, é possível que os glomérulos hipertrofiados sejam hipertensos e hiperfiltrantes. Assim sendo, há uma grande possibilidade de que mecanismos compensatórios à perda do número de néfrons estejam presentes também nos ratos L_{RN} .

Após 3 meses de vida, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram uma albuminúria numericamente maior que a do Grupo controle, possivelmente em consequência das alterações na hemodinâmica glomerular associadas às disfunções na barreira glomerular observadas nesses animais. Apesar de todas as alterações estruturais e funcionais, os ratos L_{RN} apresentaram lesões glomerulares apenas discretas após 3 meses de vida. Ao contrário, no compartimento intersticial observamos uma expansão associada à infiltração de células inflamatórias.

Aos 10 meses de vida, os animais do Grupo L_{RN} apresentaram hipertensão sistêmica, albuminúria maciça, aumento na concentração de creatinina sérica, progressão nas lesões glomerulares acompanhada de intensa inflamação intersticial, caracterizando assim um novo modelo de doença renal crônica progressiva. Essas características são semelhantes às observadas em outros modelos de doença renal crônica, como a ablação renal de 5/6 [46, 47] e a inibição crônica do óxido nítrico associada à sobrecarga salina [48, 49]. Como em outros modelos de nefropatias progressivas, a excreção de albumina foi-se acentuando ao longo do estudo, correlacionando-se com as alterações na seletividade da barreira glomerular. A alta excreção de proteínas de alto peso molecular indica que a barreira de filtração glomerular foi profundamente

alterada, perdendo seletividade quanto ao tamanho. Além disso, a redução na expressão de ZO-1 indica uma disfunção podocitária nos animais L_{RN} . Resultados semelhantes foram observados no modelo de ablação renal de 5/6: redução na expressão de ZO-1 [50] e lesões podocitárias importantes com o aparecimento de áreas desnudadas da membrana basal, que podem levar à formação de sinéquias com a cápsula de Bowman [51].

As lesões glomerulares observadas em animais L_{RN} eram do tipo glomerulosclerose segmentar e focal (GS), sendo que após 10 meses de vida as lesões eram intensas e progressivas. Em glomerulopatias de origem não imunológica, que é o caso desse modelo L_{RN} , o mecanismo mais conhecido de lesão renal progressiva é o da agressão mecânica às paredes glomerulares [52, 53]. O aumento na P_{GC} observado em ratos L_{RN} pode ter promovido o estiramento das células mesangiais que podem dar início à atividade celular relacionada a fenômenos inflamatórios, tais como o aumento do depósito da matriz extracelular [54] e da expressão de fibronectina [55] e TGF- β (fator de crescimento de transformação beta) [55, 56]. Além disso, a hipertensão glomerular pode provocar o estiramento das células podocitárias, que podem sofrer necrose ou apoptose, promovendo assim o desnudamento da membrana basal e a formação de sinéquias com o folheto parietal da cápsula de Bowman, dando início a um processo de esclerose glomerular [57, 58]. A hipertrofia glomerular, que tem sido considerada um dos fatores patogênicos da GS, especialmente quando associada à hipertensão intracapilar, está também

presente nesse modelo experimental e pode originar efeitos semelhantes aos da hipertensão glomerular ou acentuá-los.

Ao contrário dos modelos experimentais em que a hipertensão sistêmica está presente desde o início, os ratos L_{RN} tornaram-se hipertensos somente após 6 meses de vida. Um dos possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão arterial e GS é a redução no número de néfrons observados nesses animais. Em 1988 Brenner *et al* [32] sugeriram que recém-nascidos com baixo peso corpóreo apresentam redução no número de néfrons, o que levaria ao desenvolvimento de hipertensão na fase adulta, uma vez que essa redução causaria limitações na capacidade de excretar sódio e aumentaria a suscetibilidade ao desenvolvimento de insuficiência renal. Keller *et al* [59] mostraram que rins de pacientes hipertensos apresentam menor número de néfrons quando comparados aos obtidos em autópsias de indivíduos sadios mortos por trauma. Portanto, é possível que a redução no número de néfrons nos animais do Grupo L_{RN} seja um dos fatores que levam à sobrecarga dos néfrons remanescentes, iniciando um processo de lesão renal que conduz ao desenvolvimento da hipertensão sistêmica. Por sua vez, a hipertensão arterial cada vez mais acentuada (devido à perda contínua de néfrons) é transmitida aos glomérulos, acentuando a agressão à parede e assim perpetuando a perda contínua da função renal.

Após 10 meses de vida, foram observadas alterações importantes no compartimento túbulo-intersticial dos animais L_{RN} . O aumento no volume urinário e diminuição na U_{osm} no Grupo L_{RN} sugerem que esses animais

apresentam uma disfunção tubular. Dados de literatura indicam que ratos submetidos à inibição do SRA durante a lactação apresentam redução na capacidade de concentração urinária [16] em consequência da diminuição na expressão de aquaporina-2 [60] e na hiperosmolalidade do tecido medular [60]. A expansão da área intersticial está acentuada nessa fase da vida dos ratos L_{RN} , sendo evidente a participação de fenômenos inflamatórios na lesão intersticial com o aumento progressivo na intensidade do infiltrado macrofágico e de células positivas para All. Num paradoxo, apenas aparente, a All, que é fundamental para o desenvolvimento normal do rim, atua como mediadora inflamatória nas nefropatias progressivas participando do processo de ativação de linfócitos e monócitos [5], além de estimular a ativação do NF- κ B (fator nuclear - kappaB) [8], a expressão de vários outros mediadores inflamatórios e de fatores de crescimento [31, 61].

Recentemente, demonstramos a presença concomitante de células positivas para All e de seu receptor AT1 na área com fibrose intersticial em ratos Nx [13], enquanto o bloqueio do SRA reduz o processo inflamatório e a lesão intersticial [12, 62]. Outro mecanismo de lesão intersticial é a filtração exagerada de proteínas, a qual estimula a reabsorção tubular, que por sua vez promove a fibrogênese através da produção de fatores quimiotáticos que recrutam células mononucleares [63, 64]. O excesso de proteínas plasmáticas na região do túbulo proximal leva à produção de MCP-1 (proteína quimioatratadora de monócitos-1), RANTES (“regulated upon activation, normal T

cell expressed and secreted”) e IL-8 (interleucina-8), que atraem células inflamatórias como MØ, linfócitos e neutrófilos. O acúmulo de células inflamatórias leva à transformação de células intersticiais em miofibroblastos através da produção de TGF- β , PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e outras quimiocinas, resultando em acúmulo de matriz extracelular.

As alterações estruturais causadas pelo bloqueio do SRA durante a fase final da nefrogênese são irreversíveis e resultam na redução no número de néfrons, hipertensão glomerular, albuminúria decorrente do aumento na permeabilidade glomerular e inflamação renal. Tardiamente esses animais desenvolveram hipertensão sistêmica, albuminúria maciça, esclerose glomerular e fibrose intersticial, caracterizando, portanto um modelo de nefropatia progressiva grave. Os mecanismos de lesão renal nos animais L_{RN} são semelhantes aos observados em outros modelos de nefropatia progressiva.

5. CONCLUSÕES

- 1) O bloqueio do receptor AT1 durante a lactação constitui um modelo simples e reprodutível de nefropatia progressiva, que evolui sem hipertensão arterial até fases avançadas.
- 2) Os mecanismos envolvidos na progressão da lesão renal no modelo de L_{RN} são semelhantes aos de outros modelos de doença renal crônica.

6. ANEXOS

6.1. TABELAS

Tabela 1. Estudo da função renal aos 3 meses de idade.

	PE	PAM	RFG	FPR	RVR	P_{GC}
	g	mmHg	ml/min		mmHg/ml/min	mmHg
C	323±18	108,2±2,8	1,42±0.07	4,13±0.24	14,35±0,66	53,32±1,03
L_{RN}	285±14	104,2±1,5	0,94±0.06 ^a	2,77±0.27 ^a	20,94±2,34 ^a	63,47±1,80 ^a

Peso corpóreo (PE), pressão arterial média (PAM), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo plasmático renal (FPR), resistência vascular renal (RVR) e pressão hidráulica glomerular (P_{GC}) nos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação). Os resultados estão expressos como Média±EP, ^ap<0.05 vs. C.

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

	PE		PC		U_{alb}V	
	g		mmHg		mg/24hs	
	C	L_{RN}	C	L_{RN}	C	L_{RN}
3m	278±9	264±10	138±3	136±2	3,22±0,40	23,11±3,79
6m	370±7 ^b	359±2 ^b	133±3	136±2	4,11±0,64	49,88±6,42 ^{ab}
10m	417±7 ^{bc}	393±11 ^{bc}	142±4	174±5 ^{abc}	16,74±2,97	146,72±14,07 ^{abc}

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

Tabela 3. Parâmetros analisados aos 3 e 10 meses de idade.

	3 meses		10 meses	
	C	L _{RN}	C	L _{RN}
ISG	0,115±0,016	0,215±0,027 ^a	0,141±0,018	0,261±0,034 ^a
ZO-1 (%)	62,5±1,0	53,7±2,3 ^a	58,8±2,0	47,7±2,1 ^a
IEG	0,60±0,23	4,19±1,25	3,14±1,17	64,38±7,92 ^{ab}
P_{Na} (mEq/L)	139±2	141±2	142±2	140±1
P_K (mEq/L)	3,74±0,12	3,91±0,18	4,25±0,15	4,32±0,15
Scr (mg/dl)	0,64±0,11	0,70±0,09	0,68±0,04	0,94±0,06 ^a
V_{U24h} (ml/24hs)	22,60±2,15	30,90±1,47	29,04±1,71	63,81±7,09 ^{ab}
U_{osm} (mOsm)	1210±116	921±45 ^a	1111±83	543±58 ^{ab}
%INT	0,21±0,04	2,03±0,38 ^a	0,45±0,09	6,09±0,49 ^{ab}
MØ (céls/mm²)	20,38±2,66	60,30±12,04 ^a	29,02±2,84	151,85±14,39 ^{ab}
All (céls/mm²)	0,54±0,22	4,57±0,63	2,92±0,76	27,12±2,73 ^{ab}

Volume urinário de 24 horas (V_{u24h}), índice de seletividade glomerular (~180/~68) (ISG), “Zonula occludens-1” (ZO-1), Índice de esclerose glomerular (IEG), Concentração de creatinina sérica (Scr), concentração sódio plasmático (P_{Na}), concentração de potássio plasmático (P_K), osmolalidade urinária (U_{osm}), área intersticial fracional (%INT), infiltração de macrófagos no interstício renal (MØ), células positivas para angiotensina II no interstício renal (All). Os resultados estão expressos como Média±EP, ^ap< 0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m.

6.2. FIGURAS

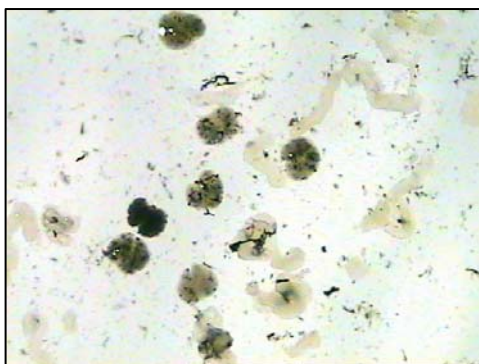


Figura 1. Microfotografia de glomérulos corados com nanquim (40X).

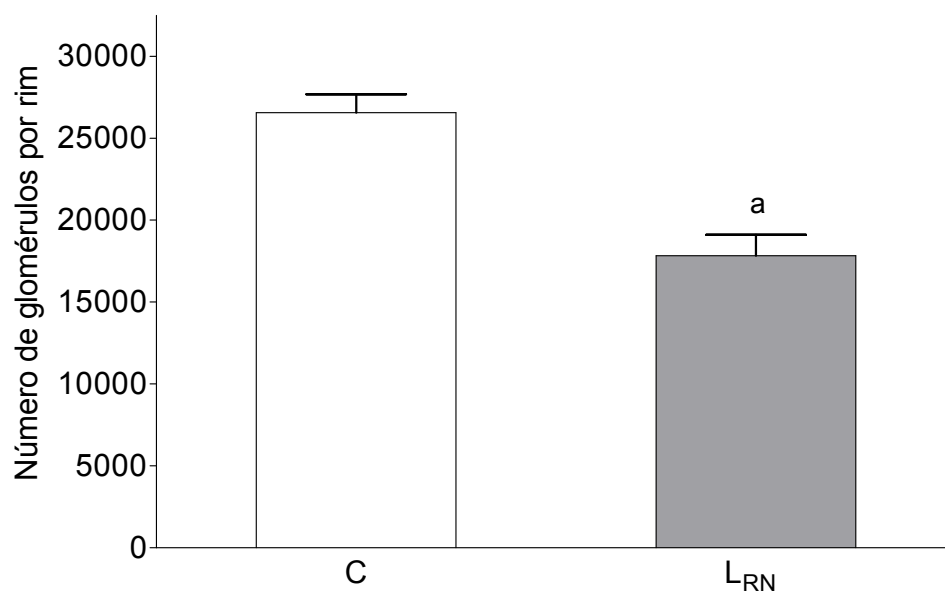


Figura 2. Contagem do número de glomérulos por rim nos Grupos C (controle) e LRN (receberam losartan durante a lactação) aos 3 meses de vida. $p < 0,05$ vs C.

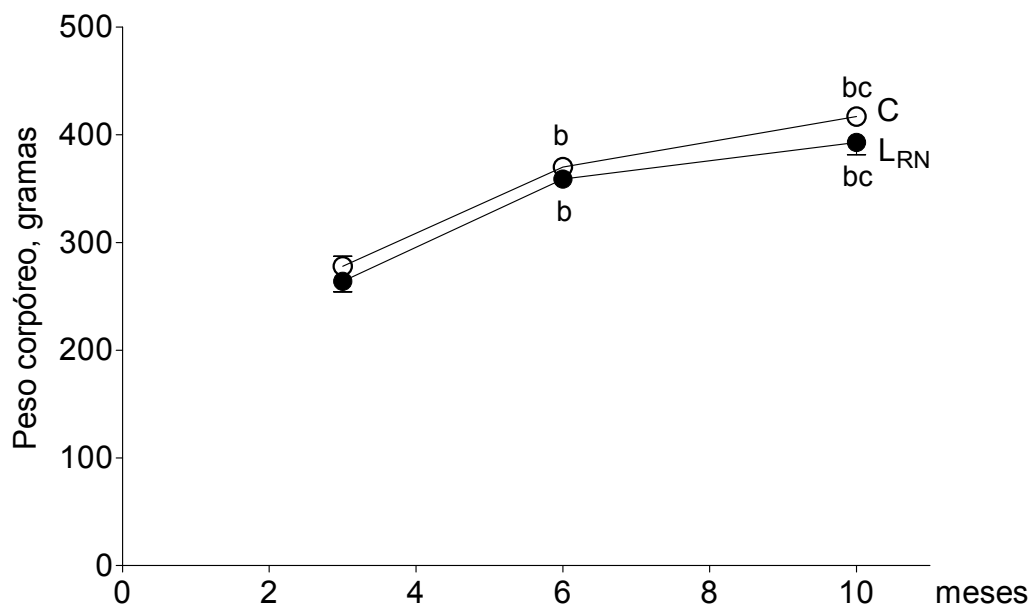


Figura 3. Evolução do peso corpóreo nos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) ao longo do estudo. ^bp<0,05 vs. respectivo 3m; ^cp<0,05 vs. respectivo 6m.

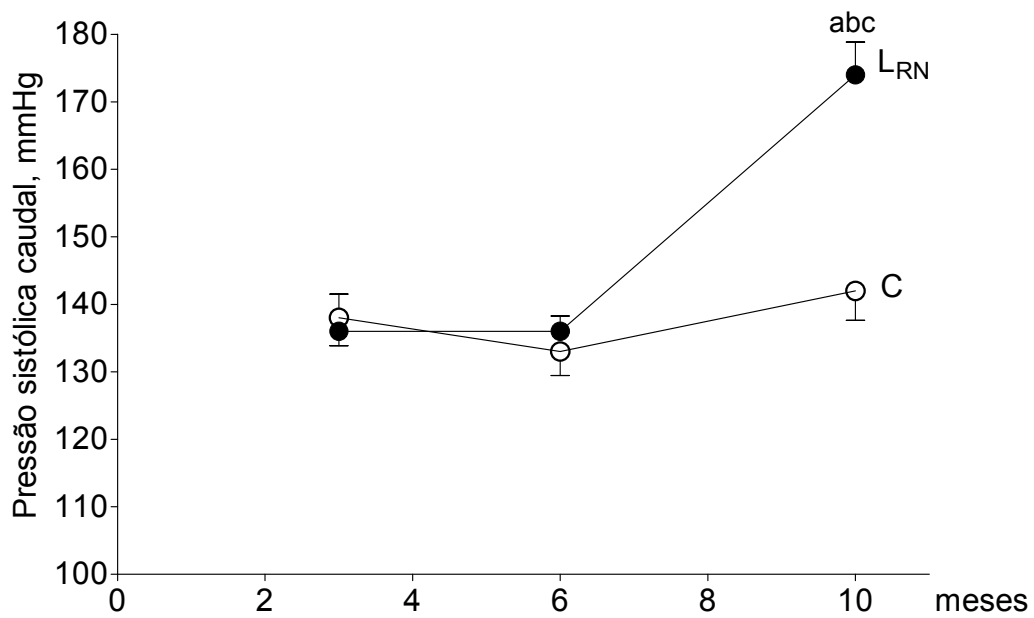


Figura 4. Pressão sistólica caudal (mmHg) dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação), ao longo do estudo. ^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m; ^cp<0,05 vs. respectivo 6m.

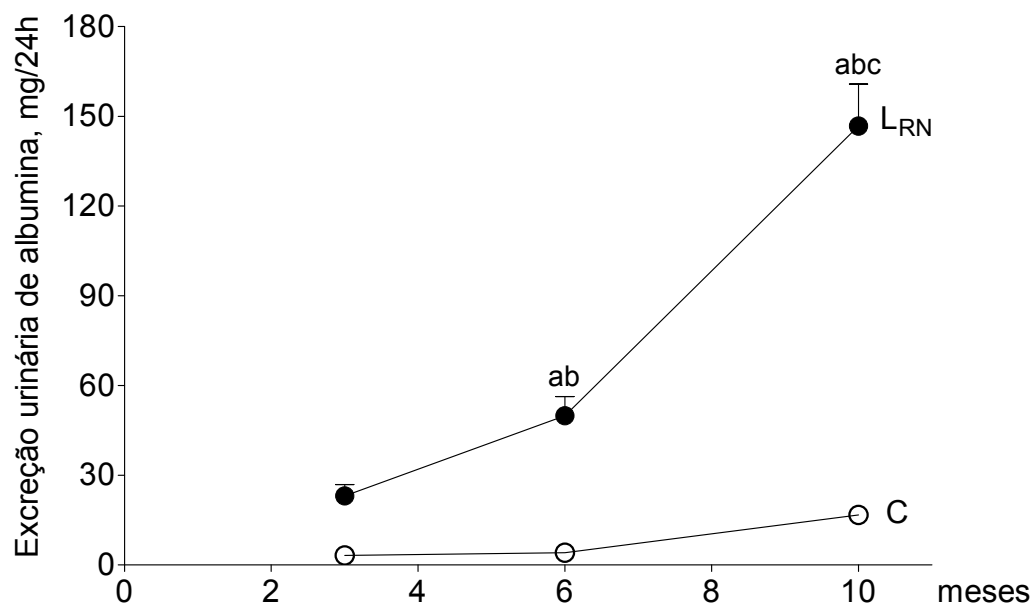


Figura 5. Excreção urinária de albumina dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) ao longo do estudo. ^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m; ^cp<0,05 vs. respectivo 6m.

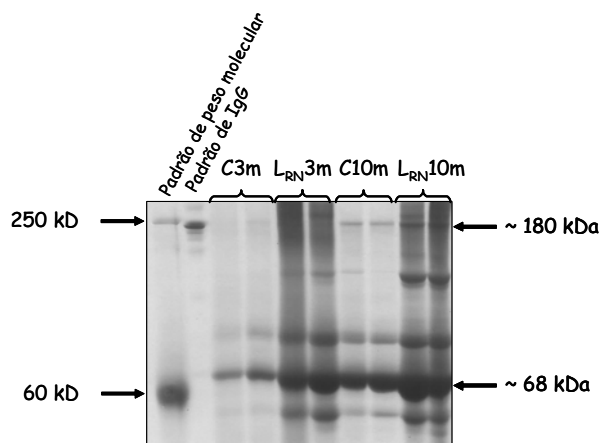


Figura 6. Eletroforese de proteínas urinárias (SDS-PAGE) dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 3 e 10 meses de idade.

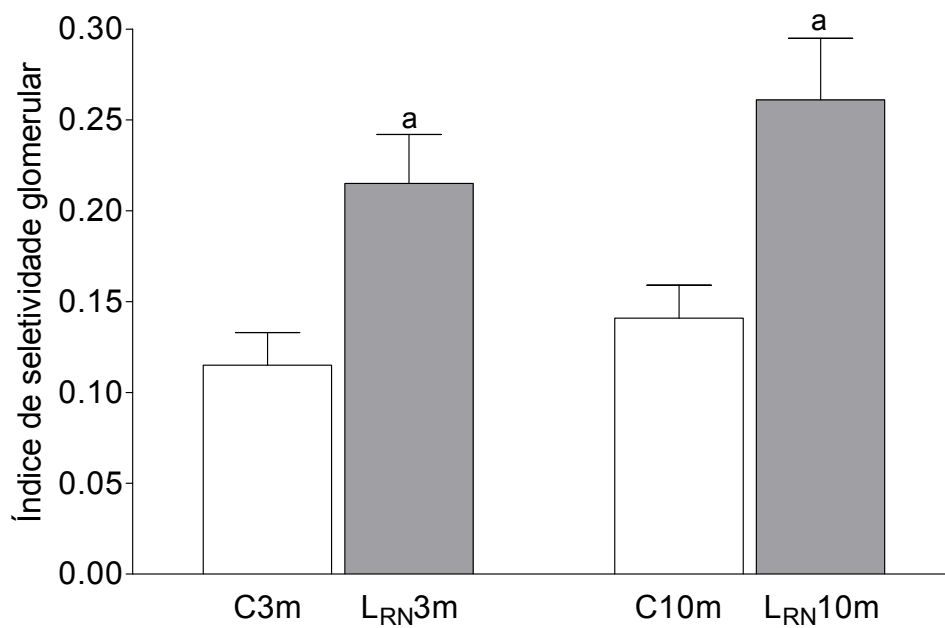


Figura 7. Índice de seletividade glomerular ($\sim 180kD/\sim 68kD$) (ISG) dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 3 e 10 meses de idade. ^a $p < 0,05$ vs. C.

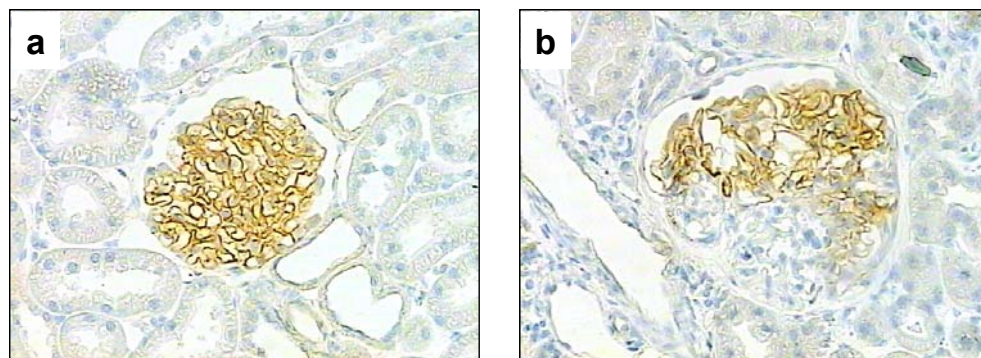


Figura 8. Microfotografias representativas de tecido renal com marcação para ZO-1 em animais com 10 meses de vida. a) Grupo C (controle) (200X); b) Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) (200X).

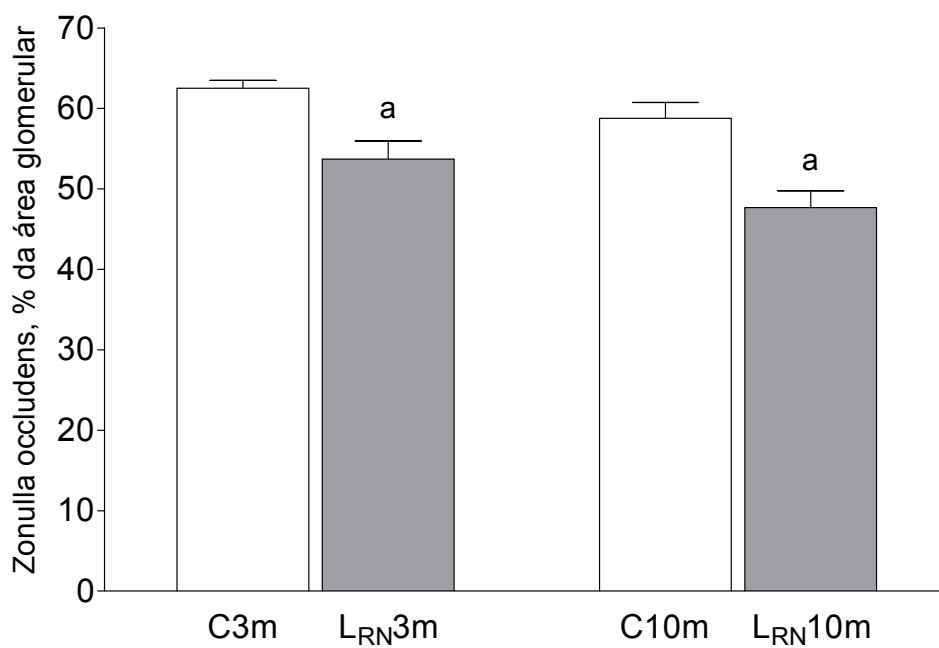


Figura 9. Quantificação da marcação de ZO-1 no tufo glomerular dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 3 e 10 meses de idade. ^ap < 0,05 vs. C.

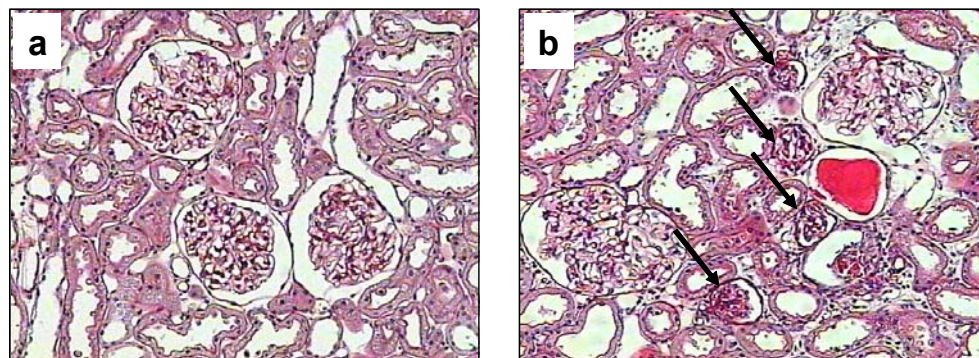


Figura 10. Microfotografias representativas de tecido renal com glomérulos de tamanhos diferentes. **a)** Grupo C (controle) (100X); **b)** Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação), as setas indicam glomérulos de tamanho reduzido (100X). Coloração pela técnica de PAS.

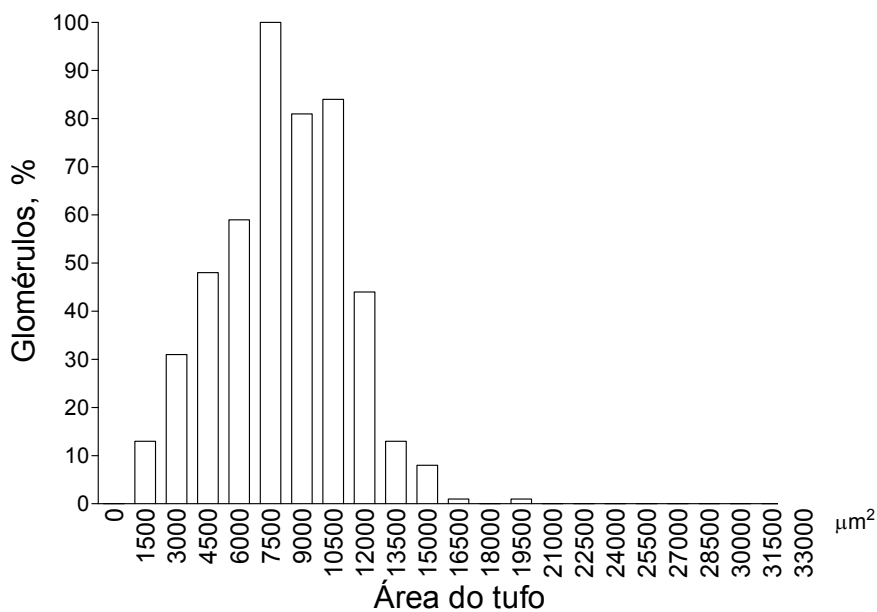


Figura 11. Gráfico de distribuição da porcentagem de glomérulos de acordo com a área glomerular (μm^2) do Grupo C (controle) aos 3 meses de idade.

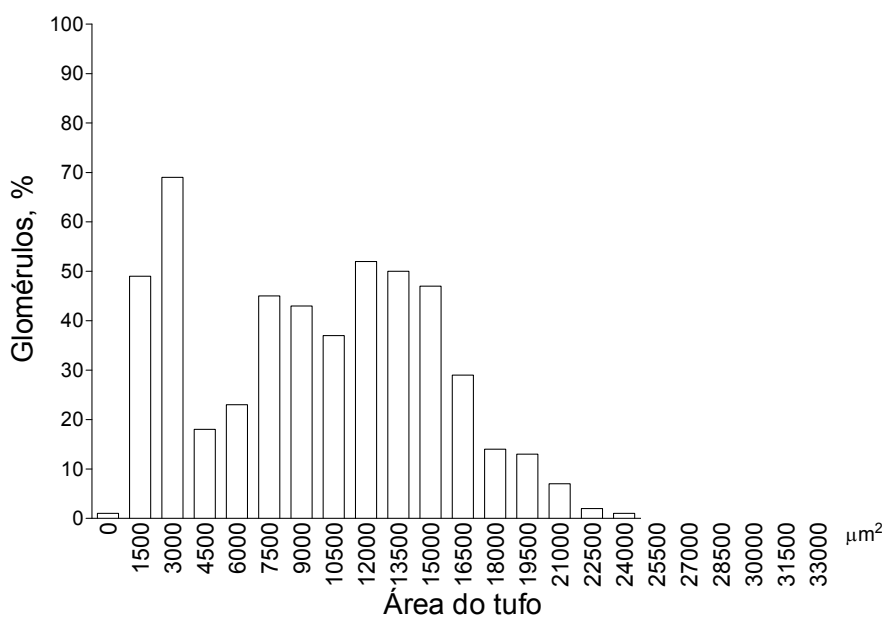


Figura 12. Gráfico de distribuição da porcentagem de glomérulos de acordo com a área glomerular (μm^2) do Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 3 meses de idade.

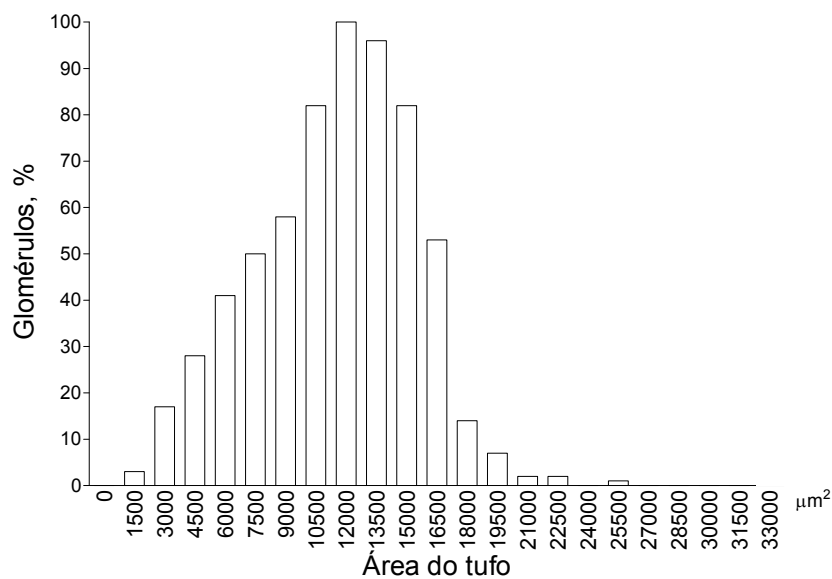


Figura 13. Gráfico de distribuição da porcentagem de glomérulos de acordo com a área glomerular (μm^2) do Grupo C (controle) aos 10 meses de idade..

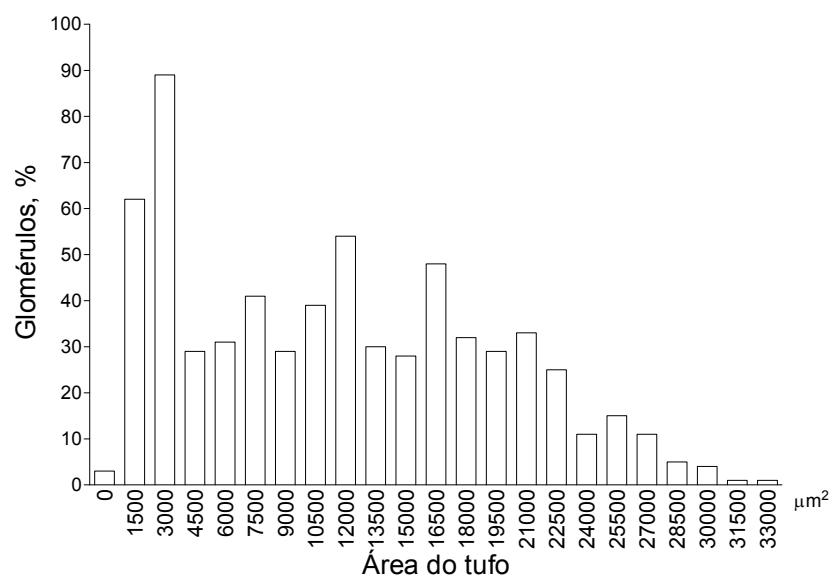


Figura 14. Gráfico de distribuição da porcentagem de glomérulos de acordo com a área glomerular (μm^2) do Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 10 meses de idade.

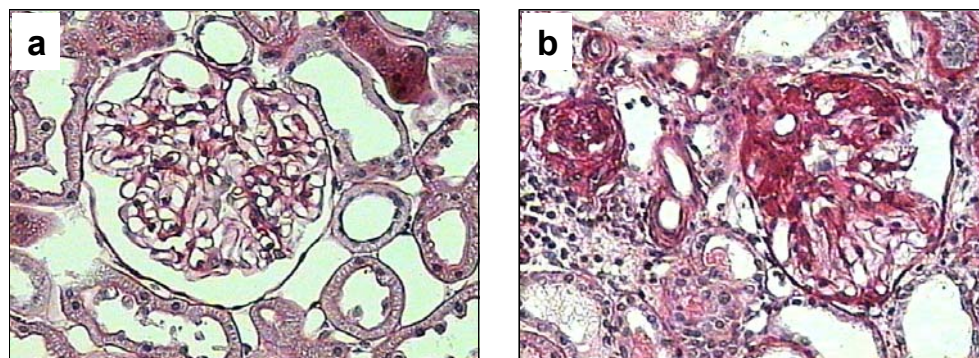


Figura 15. Microfotografias representativas de lesão glomerular aos 10 meses de vida. **a)** Grupo C (controle) (200X); **b)** Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) (200X). Coloração pela técnica de PAS.

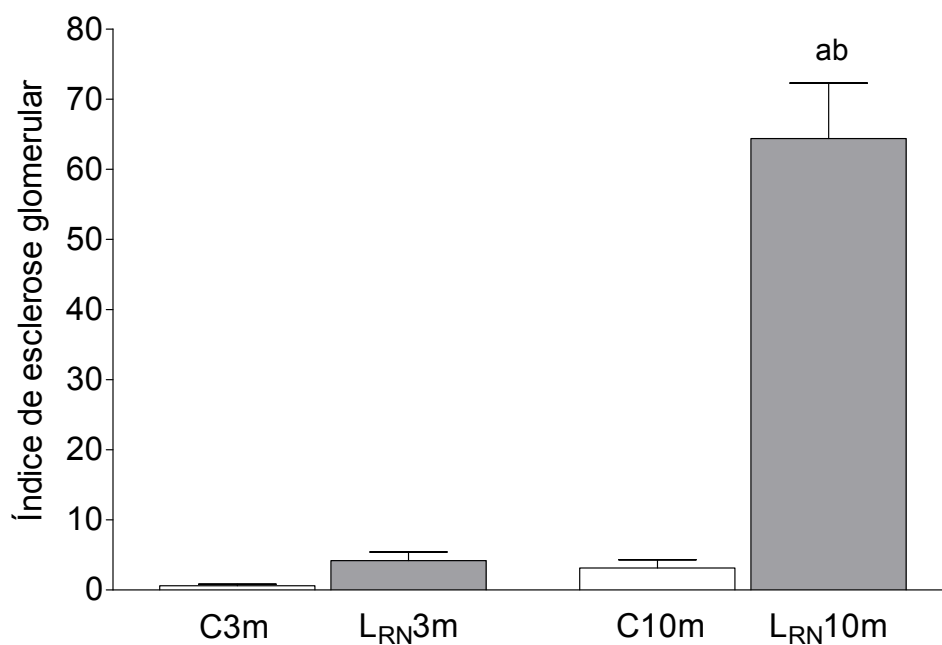


Figura 16. Índice de esclerose glomerular dos animais dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 3 e 10 meses de idade. ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m.

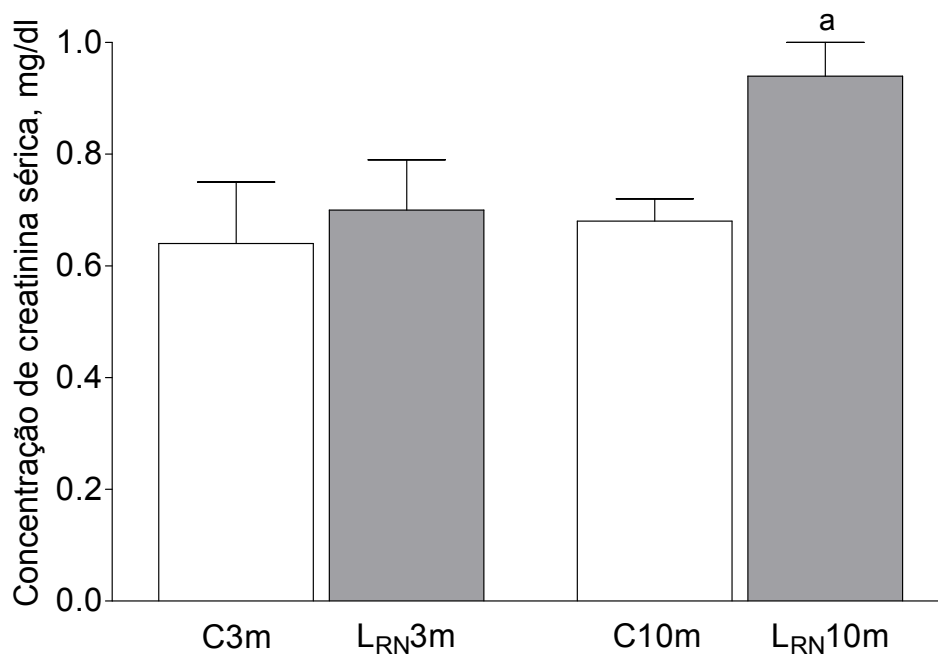


Figura 17. Concentração sérica de creatinina dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 3 e 10 meses de idade. ^ap<0,05 vs C.

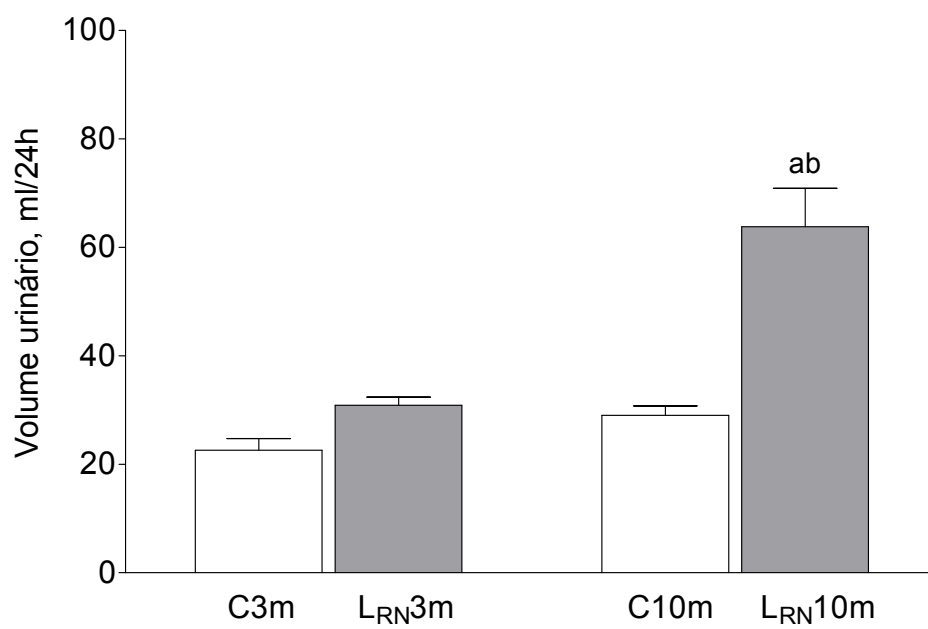


Figura 18. Volume urinário dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) ao longo do estudo. ^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m.

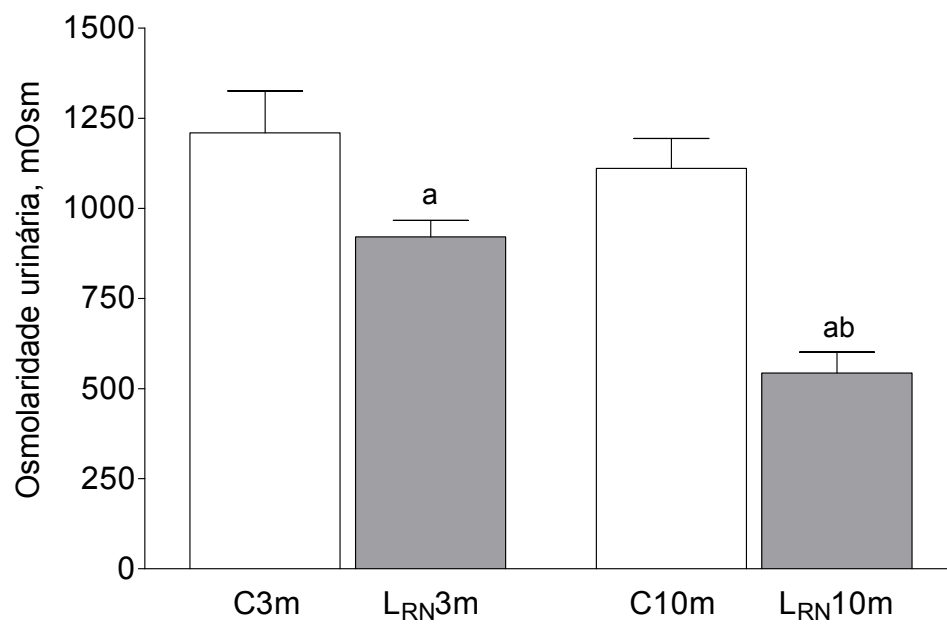


Figura 19. Osmolalidade urinária dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 3 e aos 10 meses de vida. ^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m.

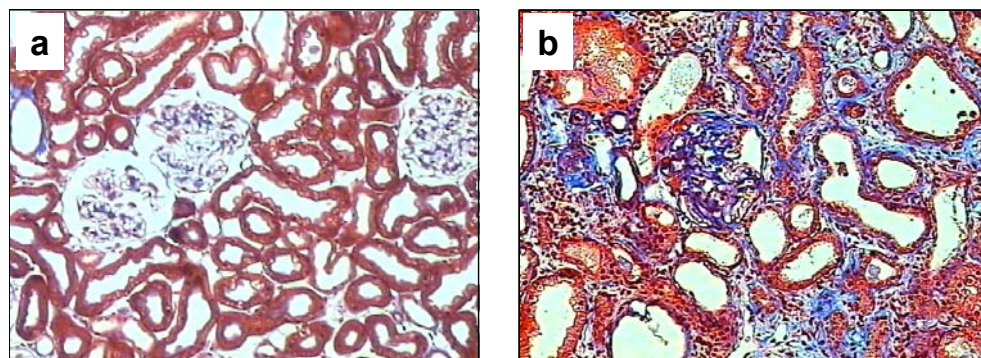


Figura 20. Microfotografias representativas do interstício do tecido renal aos 10 meses de vida. **a)** Grupo C (controle) (100X); **b)** Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 10 meses de idade (100X). Coloração pela técnica de tricrômio de Masson.

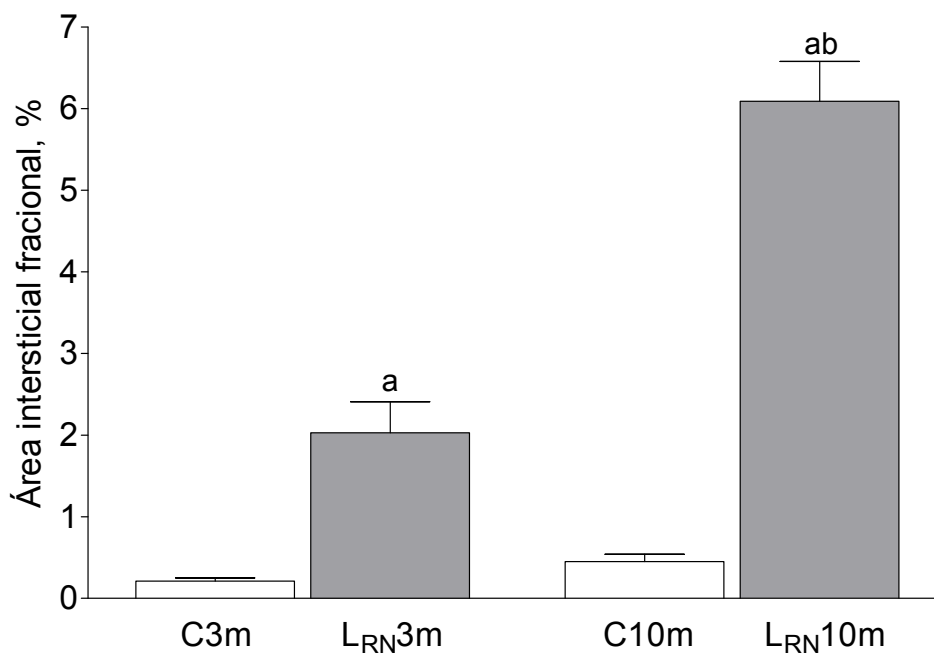


Figura 21. Gráfico da quantificação da área intersticial fracional (%) dos animais dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação), aos 3 e aos 10 meses de idade. ^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m.

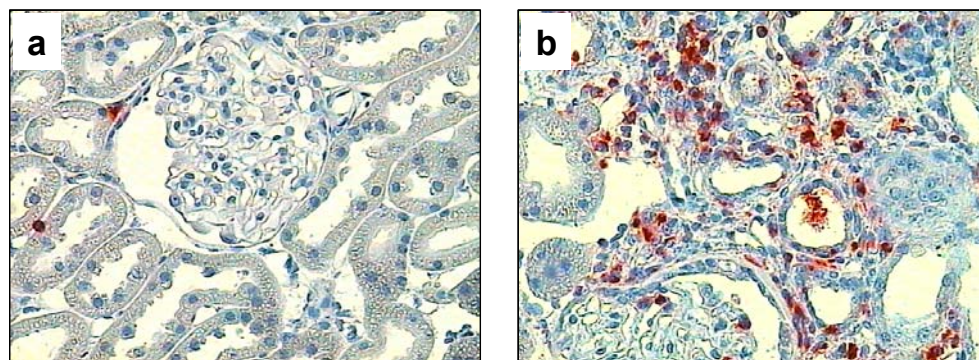


Figura 22. Microfotografias de tecido renal com marcação para ED-1 (macrófagos). **a)** Grupo C (controle) (200X); **b)** Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 10 meses da idade (200X).

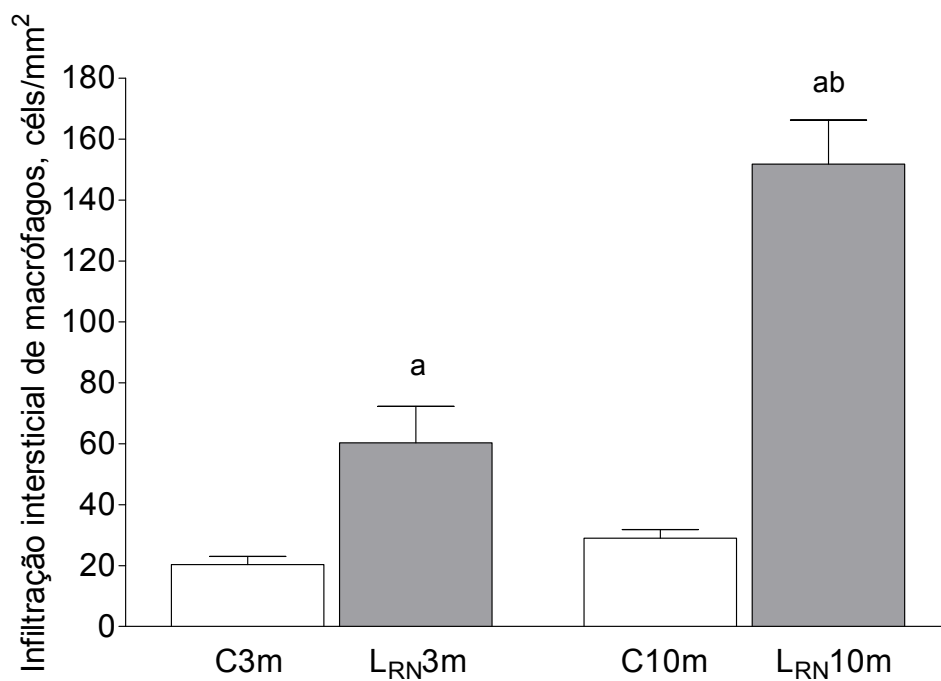


Figura 23. Gráfico da quantificação da infiltração intersticial macrófaga através de imuno-histoquímica dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação), aos 3 e aos 10 meses de idade. ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo 3m.

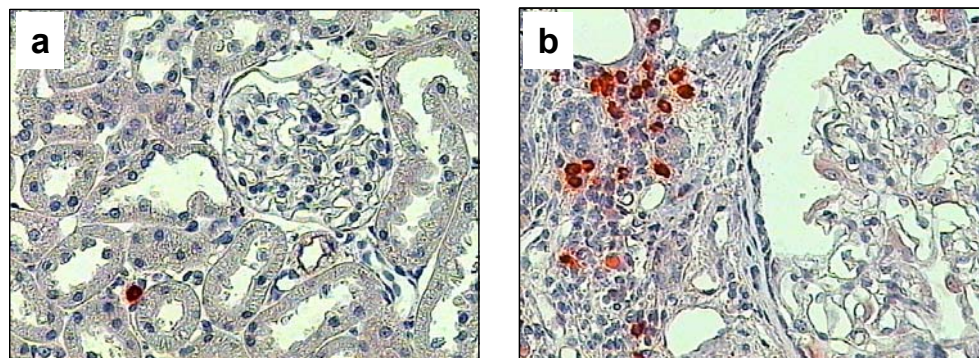


Figura 24. Microfotografias de tecido renal com marcação para All. a) Grupo C (controle) (200X); b) Grupo L_{RN} (receberam losartan durante a lactação) aos 10 meses de idade (200X).

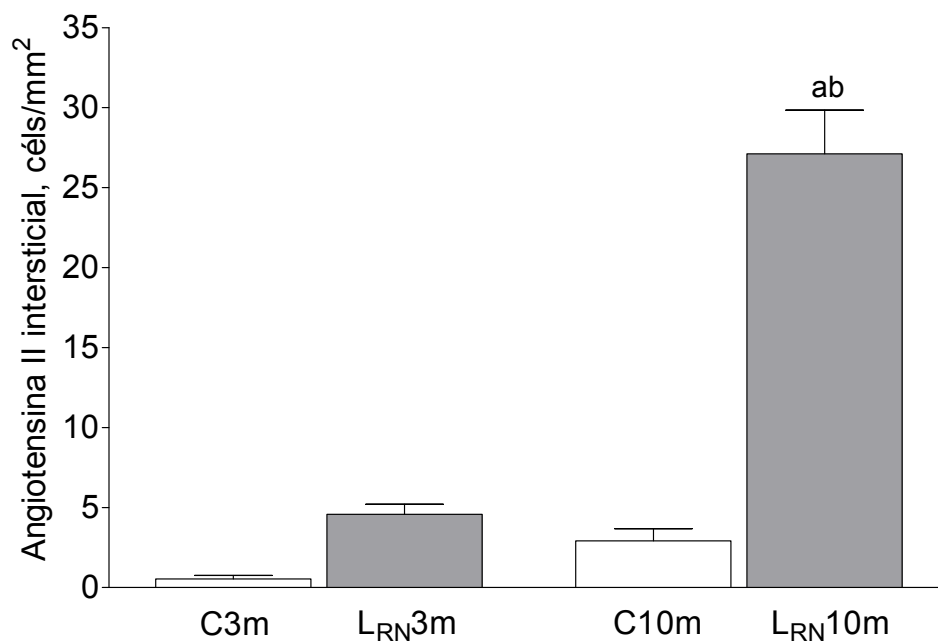


Figura 25. Gráfico da quantificação de células positivas para All no interstício renal dos Grupos C (controle) e L_{RN} (receberam losartan durante a lactação), aos 3 e aos 10 meses de idade. ^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. respectivo 3m.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Oliveira MB, Romao JE, Jr., Zatz R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. *Kidney international*. 2005 Aug(97):S82-6.
- [2] Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Mar;103(5):627-35.
- [3] Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine*. 2001 Sep 20;345(12):861-9.
- [4] Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2001 Sep 20;345(12):870-8.
- [5] Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Dec;104(12):1693-701.

- [6] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2001 May;10(3):321-9.
- [7] Wu JN, Edwards D, Berecek KH. Changes in renal angiotensin II receptors in spontaneously hypertensive rats by early treatment with the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril. *Hypertension*. 1994 Jun;23(6 Pt 2):819-22.
- [8] Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol*. 1998 Jul 1;161(1):430-9.
- [9] Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 1986 Jun;77(6):1925-30.
- [10] Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *The New England journal of medicine*. 1993 Nov 11;329(20):1456-62.
- [11] Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2001 Sep 20;345(12):851-60.

- [12] Fujihara CK, Velho M, Malheiros DM, Zatz R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney Int.* 2005 May;67(5):1913-24.
- [13] Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, et al. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *American journal of physiology.* 2004 May;286(5):F945-54.
- [14] Lafayette RA, Mayer G, Park SK, Meyer TW. Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *The Journal of clinical investigation.* 1992 Sep;90(3):766-71.
- [15] Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *The Journal of clinical investigation.* 1986 Jun;77(6):1993-2000.
- [16] Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, Bobik A, Nilsson H, Wickman A, et al. Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int.* 1994 Feb;45(2):485-92.
- [17] Correa FM, Viswanathan M, Ciuffo GM, Tsutsumi K, Saavedra JM. Kidney angiotensin II receptors and converting enzyme in neonatal and adult Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Peptides.* 1995;16(1):19-24.
- [18] Niimura F, Labosky PA, Kakuchi J, Okubo S, Yoshida H, Oikawa T, et al. Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development

and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *The Journal of clinical investigation*. 1995 Dec;96(6):2947-54.

[19] Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *The American journal of physiology*. 1995 Jul;269(1 Pt 2):F110-5.

[20] Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatric research*. 2001 Apr;49(4):460-7.

[21] Woods LL, Rasch R. Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *The American journal of physiology*. 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1593-9.

[22] Yosipiv IV, el-Dahr SS. Activation of angiotensin-generating systems in the developing rat kidney. *Hypertension*. 1996 Feb;27(2):281-6.

[23] Guron G, Friberg P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *Journal of hypertension*. 2000 Feb;18(2):123-37.

[24] Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *The American journal of physiology*. 1997 Feb;272(2 Pt 2):R662-8.

[25] Iosipiv IV, Schroeder M. A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching. *American journal of physiology*. 2003 Aug;285(2):F199-207.

[26] Gomez RA. Role of angiotensin in renal vascular development. *Kidney international*. 1998 Sep;67:S12-6.

- [27] Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P. The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta physiologica Scandinavica*. 2004 Aug;181(4):529-35.
- [28] Guron G, Nilsson A, DiBona GF, Sundelin B, Nitescu N, Friberg P. Renal adaptation to dietary sodium restriction and loading in rats treated neonatally with enalapril. *The American journal of physiology*. 1997 Oct;273(4 Pt 2):R1421-9.
- [29] Lasaitiene D, Chen Y, Guron G, Marcussen N, Tarkowski A, Telemo E, et al. Perturbed medullary tubulogenesis in neonatal rat exposed to renin-angiotensin system inhibition. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Dec;18(12):2534-41.
- [30] Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, et al. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*. 1992 May;19(5):464-74.
- [31] Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Jun;93(6):2431-7.
- [32] Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. 1988 Oct;1(4 Pt 1):335-47.
- [33] Spence SG, Zacchei AG, Lee LL, Baldwin CL, Berna RA, Mattson BA, et al. Toxicokinetic analysis of losartan during gestation and lactation in the rat. *Teratology*. 1996 Apr;53(4):245-52.

- [34] Damadian RV, Shwayri E, Bricker NS. On the Existence of Non-Urine Forming Nephrons in the Diseased Kidney of the Dog. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1965 Jan;65:26-39.
- [35] Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 1994 Apr;8(2):175-80.
- [36] Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, Nijland MJ. Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *The Journal of physiology*. 2005 May 15;565(Pt 1):137-47.
- [37] Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965 Sep;2(3):235-54.
- [38] Maddox DA, Price DC, Rector FC, Jr. Effects of surgery on plasma volume and salt and water excretion in rats. *The American journal of physiology*. 1977 Dec;233(6):F600-6.
- [39] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- [40] Jepsen FL, Mortensen PB. Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function. A quantitative study. *Virchows Archiv*. 1979 Aug 23;383(3):265-70.
- [41] Weibel ER. *Steriological methods: Practical methods for biological morphometry*. London, UK, Academic. 1979:51-7.

- [42] Hirose K, Osterby R, Nozawa M, Gundersen HJ. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int.* 1982 May;21(5):689-95.
- [43] Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, eds. *Clinical Chemistry, Principles and Tecnics*. 2º edição ed. New York: Harper & Row 1974.
- [44] Holiday ER, Preedy JR. The precision of a direct-reading flame photometer for the determination of sodium and potassium in biological fluids. *The Biochemical journal.* 1953 Sep;55(2):214-20.
- [45] Barros EP, Teles F, Malheiros DMAC, Zatz R, Fujihara CK. Characterization of a model of progressive nephropathy based on losartan (L) treatment during lactation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(Abstract):183A.
- [46] Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *The Journal of clinical investigation.* 1985 Aug;76(2):612-9.
- [47] Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha ID. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1998 Nov;54(5):1510-9.
- [48] Fujihara CK, Michellazzo SM, de Nucci G, Zatz R. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *The American journal of physiology.* 1994 May;266(5 Pt 2):F697-705.
- [49] Fujihara CK, Sena CR, Malheiros DM, Mattar AL, Zatz R. Short-term nitric oxide inhibition induces progressive nephropathy after regression of initial renal injury. *American journal of physiology.* 2006 Mar;290(3):F632-40.

- [50] Carvalho LF, Fujihara CK, Malheiros DMAC, Fernandes CH, Mattar AL, Zatz R. An extremely high dose of Losartan (L) preserves ZO1 expression and intrarenal distribution pattern of angiotensin II (All) and AT1 receptor (AT1R) in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(Abstract):212A.
- [51] Olson JL, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM, Venkatachalam MA. Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. *Kidney Int*. 1982 Aug;22(2):112-26.
- [52] Zatz R. Haemodynamically mediated glomerular injury: the end of a 15-year-old controversy? *Current opinion in nephrology and hypertension*. 1996 Nov;5(6):468-75.
- [53] Neuringer JR, Brenner BM. Hemodynamic theory of progressive renal disease: a 10-year update in brief review. *Am J Kidney Dis*. 1993 Jul;22(1):98-104.
- [54] Riser BL, Cortes P, Zhao X, Bernstein J, Dumler F, Narins RG. Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1992 Nov;90(5):1932-43.
- [55] Yasuda T, Kondo S, Homma T, Harris RC. Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Nov 1;98(9):1991-2000.
- [56] Riser BL, Cortes P, Heilig C, Grondin J, Ladson-Wofford S, Patterson D, et al. Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor-

beta isoforms in cultured rat mesangial cells. *The American journal of pathology*. 1996 Jun;148(6):1915-23.

[57] Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Dec;13(12):3005-15.

[58] Schwartz MM, Lewis EJ. Focal segmental glomerular sclerosis: the cellular lesion. *Kidney Int*. 1985 Dec;28(6):968-74.

[59] Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *The New England journal of medicine*. 2003 Jan 9;348(2):101-8.

[60] Guron G, Nilsson A, Nitescu N, Nielsen S, Sundelin B, Frokiaer J, et al. Mechanisms of impaired urinary concentrating ability in adult rats treated neonatally with enalapril. *Acta physiologica Scandinavica*. 1999 Jan;165(1):103-12.

[61] Wolf G, Ziyadeh FN, Thaiss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, et al. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Sep 1;100(5):1047-58.

[62] Yu C, Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Dworkin LD. Long-term, high-dosage candesartan suppresses inflammation and injury in chronic kidney disease: nonhemodynamic renal protection. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Mar;18(3):750-9.

[63] Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004 Jan;13(1):31-7.

[64] Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17(11):2974-84.