

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MESTRADO

DANIELA LIVINALLI RODRIGUEZ

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E DO
ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA RENAL DE RATOS
MANIPULADOS NO PERÍODO NEONATAL**

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Orientador

Porto Alegre, 2010.

DANIELA LIVINALLI RODRIGUEZ

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E DO ESTRESSE
OXIDATIVO NO SISTEMA RENAL DE RATOS MANIPULADOS NO PERÍODO
NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, 2010.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao professor Jarbas Rodrigues de Oliveira pela oportunidade, dedicação e conhecimento durante todo o trabalho.

Ao Professor Márcio F. Donadio pela co-orientação. Sempre presente para esclarecer dúvidas.

A professora Virgínia Minghelli Schmitt que sempre esteve disposta a ajudar nas dúvidas no decorrer do trabalho.

A todos do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, que sempre estiveram presentes para tirar dúvidas, pela amizade, pelo carinho e também nos muitos momentos de descontração. Em especial aos colegas da Biologia Molecular que junto comigo realizaram o primeiro trabalho do laboratório nesta área.

A minha família, em especial meus pais Adriana e Heber Daniel que sempre me apoiaram para chegar aonde eu cheguei, sem eles nada seria possível. Aos meus irmãos Pablo Vicente e Mariana que de alguma maneira me confortaram nas dificuldades e entenderam a minha ausência.

Aos meus amigos, minha segunda família, sempre presentes para comemorar as minhas conquistas e ajudar nos momentos mais difíceis. Em especial a colega Bárbara Scherer que esteve ao meu lado desde a prova até a conclusão do mestrado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A manipulação neonatal é considerada uma intervenção que ocasiona efeitos duradouros no comportamento emocional e na reatividade ao estresse em animais adultos. O período imediatamente após o nascimento é um período crítico quando o cérebro imaturo é permanentemente alterado por hormônios esteróides gonadais e da supra-renal. Estudos prévios demonstraram que a manipulação neonatal pode influenciar mecanismos de regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e na função renal.

Os componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) no rim são altamente expressos durante o desenvolvimento renal e estão ligados a estágios específicos da nefrogênese e vascularização, tendo maior expressão em ratos recém-nascidos. Esse sistema tem papel fundamental nos mecanismos de inflamação e defesa de células e tecidos do organismo. A angiotensina II é o principal hormônio efetor nessa cascata e é também considerada um hormônio pró-oxidante, e liga-se a dois tipos de receptores: AT₁ e AT₂, que têm funções opostas. O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mecanismos de defesa antioxidante. Essas EROs quando em excesso causam dano a vários componentes celulares. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre o SRA e o balanço oxidativo renal de ratos

Verificou-se que os animais manipulados apresentaram aumento na expressão de renina e do receptor AT₂ e uma diminuição do receptor AT₁. Foi encontrado um aumento de ANG II plasmática e também de TBARS no rim. Estes resultados indicam que a manipulação neonatal altera o sistema renina-angiotensina e justificam as alterações renais já descritas.

Palavras-chave: Sistema Renina-Angiotensina; Estresse oxidativo; Manipulação neonatal; receptores de angiotensina II.

Abstract

Neonatal handling is considered an intervention that causes lasting effects on emotional behavior and reactivity to stress in adult animals. The period immediately after birth is a critical period when the immature brain is permanently altered by gonadal steroid hormones and adrenal. Previous studies have shown that neonatal handling can influence mechanisms regulating hydroelectrolytic balance and renal function.

The components of the renin-angiotensina (RAS) are highly expressed in the kidney during renal development and are linked to specific stages of nephrogenesis and vascularization is higher in newborn rats. This system has a fundamental role in the mechanisms of inflammation and protection of cells and tissues. Angiotensin II is the main effector hormone in this cascade, and binds to two types of receptors: AT₁ and AT₂, which have opposite functions. The aim of this study was to evaluate the effect of neonatal handling on the renal RAS and oxidative balance in rats.

Handled animals presented an increase in AT₂ receptor expression and a decrease in AT₁ receptor expression. An increase in plasmatic ANG II and in kidney TBARS was also found. These results indicate that neonatal handling changes the renin-angiotensin system, justifying the renal alterations described.

Key words: Renin-angiotensin system; oxidative stress; neonatal handling; angiotensin II receptors.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	7
1.1 INTRODUÇÃO	7
1.1.1 MANIPULAÇÃO NEONATAL	7
1.1.2 ANGIOTÊNSINA II E O DESENVOLVIMENTO RENAL	12
1.1.3 ESTRESSE OXIDATIVO	14
1.2 JUSTIFICATIVA	17
1.3 OBJETIVOS	18
1.3.1 GERAL	18
1.3.2 ESPECÍFICOS	18
1.4 ASPECTOS ÉTICOS	19
CAPÍTULO 2	20
2.1 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL	20
CAPÍTULO 3	44
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A	50

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 MANIPULAÇÃO NEONATAL

A manipulação neonatal é considerada uma intervenção durante o período neonatal que tem efeitos duradouros no comportamento emocional e na reatividade ao estresse em animais adultos (Donadio et al., 2009). A manipulação neonatal altera permanentemente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em resposta a estímulos estressantes (Gomes et al., 2005) e tem sido usada como um modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais mudanças ambientais precoces podem afetar o sistema neural, conduzindo a alterações comportamentais e mudanças neuroendócrinas. Como nos adultos, ratos manipulados no período neonatal sintetizam e secretam menor quantidade de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e corticosterona em resposta a uma variedade de estressores, e mostra um rápido retorno desses hormônios aos níveis basais após o término do estímulo (Gomes et al., 2005). O modelo de manipulação neonatal consiste na retirada dos filhotes de perto da mãe e da manipulação dos mesmos diariamente por 1 minuto durante os primeiros 10 dias de vida (Donadio et al., 2009; Gomes et al., 2006, Gomes et al., 1999; Gomes et al., 2005, Hermel et al., 2001; Lucion, et al. 2003, Severino et al., 2004; Winkelmann-Duarte et al.; 2007). Este procedimento altera a diferenciação do eixo HPA promovendo mudanças nos padrões comportamentais e de resposta ao estresse em animais adultos (Levine, 2001; Meerlo et al., 1999; Núñez et al., 1996).

A atividade do eixo HPA é governada pela secreção de CRH e de vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, os quais, por sua vez, ativam o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela pituitária, que finalmente estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal como ilustra a figura 1. Os glicocorticóides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela retro-alimentação da secreção do ACTH pela pituitária e do HLC a partir do hipotálamo. Embora os glicocorticóides regulem a

função de quase todos os tecidos do corpo, o efeito fisiológico mais conhecido desses hormônios é a regulação do metabolismo energético (Jurueña et al., 2004).

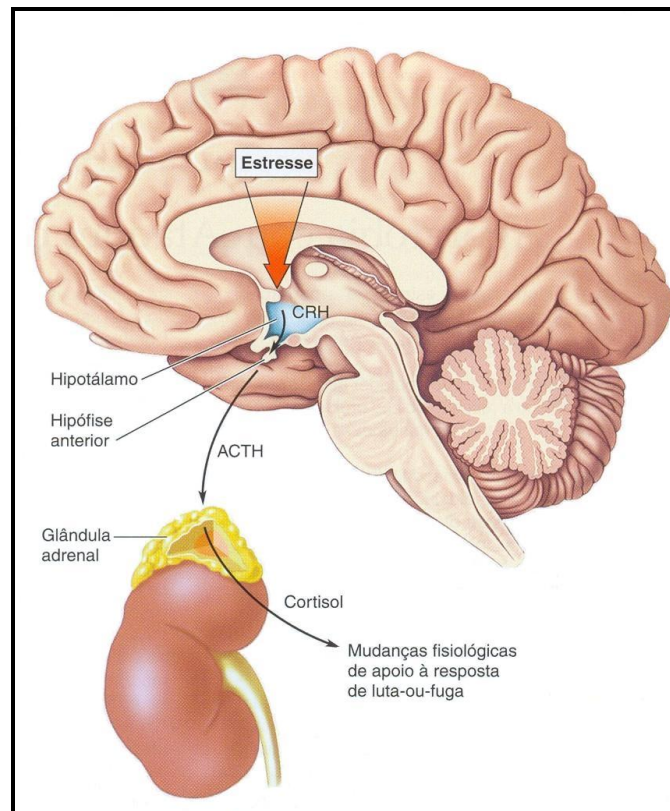


Figura 1 - Eixo HPA (Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 2008)

O estresse é considerado por muitos cientistas como uma situação de ativação do eixo HPA, representado principalmente pela elevação dos níveis de hormônio ACTH (Moal, 2007). Outros autores sugerem que a ativação de outros sistemas com ou sem elevação de ACTH pode refletir em distúrbios da homeostasia induzidos pelo estresse (Pacák e Palkovits, 2001). A homeostasia foi descrita primeiramente como processos coordenados que mantêm constante a fisiologia do organismo (Cannon, 1941), que pode ser constantemente ameaçada por forças ou estressores intrínsecos e extrínsecos (Moal, 2007). Dentre os estressores intrínsecos estão polimorfismos genéticos bem como alterações na expressão de genes e estressores extrínsecos como fatores ambientais, são importantes na determinação de respostas individuais ao estresse (Pacák e Palkovits, 2001).

O sistema de estresse coordena respostas adaptativas do organismo a qualquer tipo de estressor (Tsigos e Chrousos 2002). A ativação do sistema de

estresse leva a mudanças comportamentais e periféricas para melhorar a habilidade do organismo a ajustar a homeostase e aumentar sua chance de sobrevivência. Durante uma situação de estresse agudo, a amplitude e a sincronização de CRH e AVP na hipófise aumenta, levando a um aumento de ACTH e secreção de cortisol. Dependendo do tipo de estressor, outros fatores como AVP de origem de neurônios magnocelulares, angiotensina II (ANG II), várias citocinas e mediadores lipídicos da inflamação são secretados e atuam em componentes hipotálamicos, hipofisários ou adrenais do eixo HPA potencializando sua atividade (Tsigos e Chrousos 2002). O ACTH circulante é o principal regulador da secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Os glicocorticóides são os efetores finais do eixo HPA e participam no controle da homeostasia corporal e na resposta ao estresse do organismo. O *feedback* negativo dos glicocorticóides na resposta secretória de ACTH atua como limite na duração da exposição dos glicocorticóides aos tecidos, assim, minimizando os efeitos catabólicos, antireprodutivos e imunossupressores desses hormônios (Ritter, J.M, 2008). Além disso, os glicocorticóides alteram a estabilidade de RNAs mensageiros, portanto a tradução de muitas proteínas dependentes de glicocorticóides, bem como o potencial elétrico das células neuronais (Tsigos e Chrousos 2002).

O desenvolvimento normal do eixo HPA é essencial para o funcionamento adequado do organismo durante a vida adulta. Muitos estudos em humanos demonstraram, que um trauma nos primeiros dias de vida, como abuso ou maltratado de crianças, tem efeitos duradouros na hipófise-adrenal e representa um risco maior para o desenvolvimento de transtornos de humor e de ansiedade (Schmidt et al., 2003). No rato uma das características do desenvolvimento pós-natal do sistema de estresse é chamada de período hiporresponsivo ao estresse. É o período que compreende do 4º ao 14º dia pós-natal, e é caracterizado por níveis basais muito baixos de corticosterona devido a incapacidade dos estressores induzirem um aumento de ACTH e uma liberação de corticosterona (Schmidt, et al. 2003, Levine 2001).

Esse período logo após o nascimento é um período crítico em que o cérebro é permanentemente alterado por hormônios esteróides gonodais e adrenais (Gomes et al., 1999), deste modo é de grande importância que o animal mantenha o eixo HPA sob supressão durante o período neonatal, característica padrão no seu

desenvolvimento (Martin et al., 1977). Durante o período hiporresponsivo ao estresse, tanto estimulações aparentemente inofensivas, bem como estímulos como frio e choque elétrico induzem alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta (Levine, 1994). Os efeitos de intervenções ambientais durante o período neonatal pode constituir a formação de vulnerabilidades individuais a doenças relacionadas ao estresse ao longo da vida (Lucion, et al. 2003).

Variações no cuidado maternal têm sido amplamente consideradas como uma influência crítica no desenvolvimento (Caldji et al., 2000; Champagne, et al. 2003). No rato, variações no comportamento maternal, particularmente o ato de lambar o filhote, regula o desenvolvimento de respostas endócrinas, emocionais e cognitivas ao estresse (Champagne, et al. 2003) e esses efeitos são mediados por variações no cuidado maternal de tal forma que o comportamento da mãe altera o desenvolvimento de respostas comportamentais e endócrinas em resposta ao estresse na prole através de efeitos na expressão gênica de tecidos específicos (Weaver et al., 2006). O desenvolvimento do eixo HPA em resposta ao estresse é modificado por eventos no ambiente neonatal, incluindo a manipulação neonatal (Liu, et al. 1997).

Quando analisados os comportamentos de mães de animais manipulados e não manipulados durante os 10 primeiros dias de vida, um período crítico para os efeitos da manipulação no desenvolvimento do eixo HPA, as mães de animais manipulados mostraram um aumento no ato de lambar os filhotes comparados com mães de filhotes não manipulados (Liu, et al. 1997). Quando adultas, a prole das mães que lambaram mais mostraram redução significativa no ACTH plasmático e respostas limitadas de corticosterona ao estresse comparado com a prole das mães que lambaram menos (Caldji et al.,2000; Liu et al., 1997). Animais adultos, manipulados quando recém-nascidos, demonstraram diminuição do medo sob condições de estresse (Caldji et al.,2000; Hsu et al., 2003; Weaver et al., 2006) e respostas diminuídas do eixo HPA em resposta ao estresse (Weaver et al., 2006). Diferenças individuais no comportamento (Caldji et al.,2000; Francis e Meaney 1999), no eixo HPA (Caldji et al.,2000) e nas respostas ao estresse (Francis e Meaney, 1999) são, em parte, derivadas de variações no cuidado maternal pós-natal (Caldji et al.,2000; Francis e Meaney, 1999).

Esse procedimento aparentemente inofensivo na infância causa efeitos comportamentais e neuroendócrinos estáveis, expressos pela redução de respostas emocionais na vida adulta, como um aumento da atividade exploratória, que é interpretada pela diminuição do medo em ambientes novos, o que foi comprovado, pois ratos manipulados adultos machos e fêmeas exibem uma redução do medo frente a um predador (Severino, et al. 2004). Também foram relatadas diminuição da secreção de corticosterona e adrenocorticotropina em resposta a estressores na vida adulta (Núñez, et al. 1996).

Em ratos, a manipulação neonatal altera o eixo HPA, bem como o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) (Gomes et al., 2005). Fêmeas manipuladas mostraram diminuição nos níveis de prolactina 2 e 5 minutos após o estresse, quando comparadas com o grupo não manipulado no mesmo período de tempo após o estresse (Severino, et al. 2004), também apresentaram redução no número de oócitos confirmando uma diminuição da ovulação causada pela manipulação (Gomes et al., 2005). Outro estudo também demonstrou que o número de fêmeas manipuladas que apresentou ciclos anovulatórios foi significativamente maior que as fêmeas do grupo não manipulado (Gomes et al., 1999). A manipulação neonatal também reduz a atividade sexual em ratos machos e fêmeas e os níveis plasmáticos de estradiol, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e prolactina (PRL) (Gomes et al., 2006).

A manipulação aumenta a densidade de receptores de glicocorticóides no hipocampo e no córtex frontal (Liu et al., 1997; Winkelmann-Duarte et al., 2007) e mudanças em receptores para o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA_A) no hipocampo (Hsu et al., 2003; Winkelmann-Duarte, et al. 2007). Além disso, resultados mostraram uma diminuição na densidade de receptores de angiotensina II (ANG II) na área pré-optica (MPOA) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em animais manipulados (Gomes et al., 2006) e também mostraram redução significativamente no número de células e no volume do *locus coeruleus* em ratos machos e fêmeas manipulados comparados com ratos não manipulados. Isso sugere que a estimulação precoce no ambiente neonatal induz a mudanças estruturais no núcleo central noradrenérgico, que pode ser um dos fatores responsáveis pelas alterações comportamentais e hormonais observadas nesses animais na vida adulta (Lucion et al., 2003).

Estudos prévios em nosso laboratório mostraram uma redução no peso total renal, na ingestão hídrica, no volume urinário, no *clearance* de creatinina, na ANG II plasmática, corticosterona e aldosterona e um aumento da osmolaridade urinária e da fração excretada de sódio comparando animais manipulados com animais não manipulados demonstrando que a manipulação neonatal pode influenciar mecanismos de regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e no processo de maturação renal, considerando que o período neonatal é crucial para o desenvolvimento renal e do trato urinário (Donadio et al., 2009).

1.1.2 ANGIOTÊNSINA II E O DESENVOLVIMENTO RENAL

O sistema renina-angiotensina (SRA), que é um importante modulador da função do eixo HPA através da estimulação da secreção de CRH durante a resposta ao estresse, tem um papel crucial no desenvolvimento renal (nefrogênese) incluindo desenvolvimento vascular e estruturas tubulares (Chen et al., 2004; Lasaitiene, et al. 2006). No rim, todos os componentes do SRA (renina, angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina (ECA) e os receptores de angiotensina tipo I e II) são sintetizados localmente. Além disso, a expressão de todos os componentes do SRA no rim pode ser detectada a partir do 12º ao 17º dias de gestação, sendo maior em ratos fetos e neonatais do que em ratos adultos (Chen et al., 2004). Apesar dos componentes do SRA estarem expressos em níveis altos na fase gestacional e neonatal, uma hiperativação deste sistema tem sido considerada como tendo um papel central na progressão da doença renal crônica (Lin et al., 2009; Nistala et al., 2009)

A renina é a enzima que cliva o angiotensinogênio, uma substância produzida pelo fígado, em um polipeptídeo chamado angiotensina I. A angiotensina I circula no sangue, e uma segunda enzima, chamada enzima conversora de angiotensina (ECA), converte angiotensina I em angiotensina II (ANG II) pela remoção de um único polipeptídeo. Dentre os componentes desta cascata, é a ANG II que tem atividade sobre o rim. Os primeiros efeitos da ANG II no rim é a retenção de água e sódio; no sistema arterial, a ANG II causa vasoconstrição, que leva a um aumento na pressão arterial. Esse sistema tem um papel fundamental nos mecanismos de

inflamação e na defesa de células e tecidos de organismos (Serrano, et al. 2009). A ANG II é o principal hormônio efetor na cascata da SRA (Lasaitiene, et al. 2006), e é considerado um hormônio com atividade pró-oxidante, pró-fibrogênica (Wei et al., 2009) e pró-inflamatória (Serrano et al., 2009) que pode influenciar todos os estágios da resposta inflamatória (Marchesi et al., 2008). A ANG II é conhecida por aumentar a pressão arterial, induzir hipertrofia celular renal, e promover a ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) e acumulação de matriz protéica, eventos que estão ligados com a progressão da doença renal (Vaziri, et al. 2007).

A ANG II atua via dois principais receptores: o receptor de ANG II tipo 1 (AT₁) e receptor de ANG II tipo 2 (AT₂). Os receptores AT₁ e AT₂ são membros da família da proteína G e possuem sete domínios transmembrana. Os receptores AT₂ são altamente expressos no período fetal e gradativamente vão diminuindo depois do nascimento. Os receptores AT₁ também são expressos em rins fetais, mas sua expressão aumenta depois do nascimento, e eles parecem ser responsáveis pelo ajuste fino dos estágios mais tardios do desenvolvimento tubular e nefrovascular. Os receptores AT₁ parecem ter funções opostas ou modulando as repostas dos receptores AT₂ (Lasaitiene, et al. 2006) como ilustra a figura 2. Alguns autores comentam que o receptor AT₁ pode ter uma atividade pró-fibrótica e que o receptor AT₂ ter uma atividade anti-fibrótica (Marchesi et al., 2008).

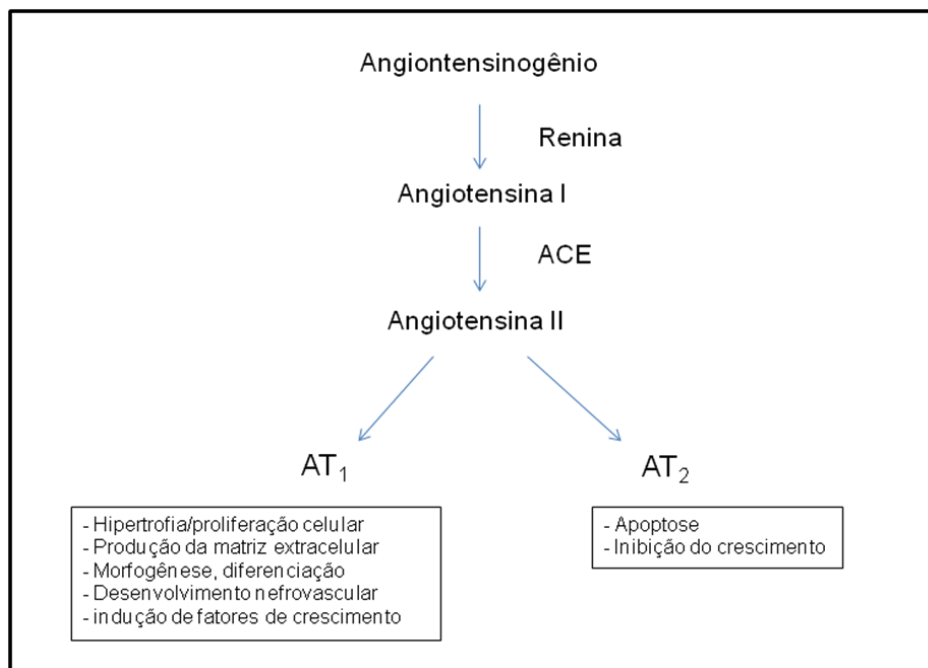


Figura 2 - Cascata do SRA e função dos receptores de angiotensina (Lasaitiene, et al. 2006).

A ligação da ANG II ao receptor AT₁ leva a ativação de NAD(P)H oxidase causando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Lenarczyk et al., 2009; Nistala et al., 2009; Severino, et al. 2004). A produção de ERO leva a ativação de NFκB e a transcrição de fatores pró-inflamatórios (Marchesi et al., 2008; Serrano, et al. 2009), levando em um aumento nos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Serrano, et al. 2009). A inibição farmacológica ou genética da produção de ANG II ou a ativação do receptor de ANG II tipo I (AT₁) durante a nefrogênese resultam em anormalidades no desenvolvimento estrutural e funcional dos rins em várias espécies animais (Chen et al., 2004; Lasaitiene et al., 2006) e o bloqueio desse receptor causa diminuição na pressão sanguínea, desacelera a progressão de doenças renais e atenua a super regulação do sistema pró-oxidante e pró-inflamatório (Vaziri, et al. 2007). Em humanos, o uso incorreto de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou de bloqueadores dos receptores AT₁ durante a gravidez causa anúria neonatal e displasia tubular renal, confirmando o papel do SRA na nefrogênese humana (Lasaitiene, et al. 2006). Outros estudos mostraram um marcado aumento na produção de ANG II e na expressão do receptor AT₁ na região tubulointersticial com redução na massa renal e também outras nefropatias (Vaziri, et al. 2007). Considerando que o processo de desenvolvimento e maturação dos órgãos ocorre continuamente ao longo dos períodos pré e pós natais, modificações no desenvolvimento podem levar a redução dos néfrons, hipertensão e doenças renais, e fatores genéticos e condições ambientais parecem contribuir nessas alterações (Puddu, et al. 2009).

1.1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre a formação de ERO e mecanismos de defesa anti-oxidante (Galle 2001). É um processo biológico que causa acúmulo de espécies reativas de oxigênio no plasma, tecido, interior das células e nas mitocôndrias, acúmulo esse que causa danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares (Serrano et al., 2009; Núñez, et al., 1996) e que envolve

ativação de vias de sinalização específicas (Serrano et al., 2009). Os oxidantes são gerados como resultado do metabolismo normal intracelular na mitocôndria e nos peroxissomos e influenciam numerosos processos celulares que estão ligados ao envelhecimento e doenças relacionadas ao envelhecimento (Finkel e Holbrook, 2000) e também com atividade física intensa, apoptose, câncer, diabetes *mellitus* e arteriosclerose (Núñez, et al. 1996). Mas os oxidantes também podem ser gerados de forma exógena, como, por exemplo, por exposição ao álcool, fumo, drogas, raios ultravioleta, quimioterápicos, citocinas inflamatórias, toxinas ambientais, entre outros fatores (Finkel e Holbrook, 2000; Núñez et al., 1996) como ilustra a figura 3.

As ERO necessitam estar em níveis fisiológicos normais, pois uma diminuição das mesmas abaixo do ponto homeostático pode interromper o papel fisiológico dos oxidantes na proliferação celular e na defesa do hospedeiro (Finkel e Holbrook, 2000). O termo EO é utilizado em circunstâncias nas quais os radicais livres promovem dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos (Finkel e Holbrook, 2000; Schneider e Oliveira, 2004). Dentre os diversos sistemas que podem ser afetados por intervenções precoces e que possuem grande importância nos mecanismos de controle da homeostase está o sistema de defesa antioxidante (Finkel e Holbrook, 2000). Este sistema é composto basicamente por proteínas enzimáticas, não enzimáticas e algumas vitaminas, capazes de inibir ou reduzir os danos causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Ferreira e Matsubara, 1997; Finkel e Holbrook, 2000; Lenarczyk et al., 2009). O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx), e o sistema de defesa não-enzimático inclui a glutathiona reduzida (GSH) e algumas vitaminas como as vitaminas A, C e E (Finkel e Holbrook, 2000).

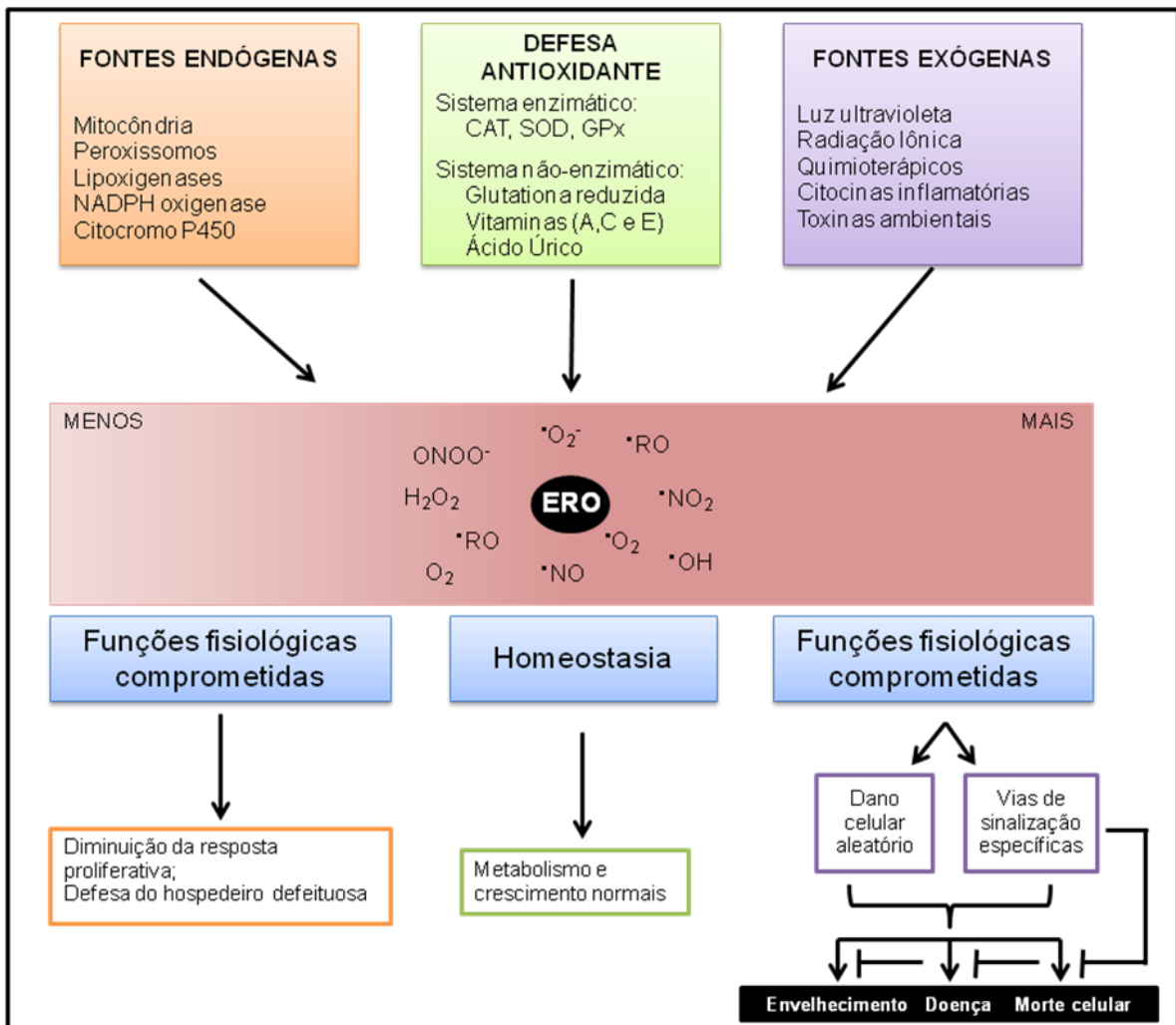


Figura 3 - As fontes e as respostas celulares a espécies reativas de oxigênio (ERO) (Finkel e Holbrook 2000).

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob EO quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes favorecendo o dano oxidativo e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (Finkel e Holbrook, 2000; Galle, 2001; Schneider e Oliveira, 2004). Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular e um dos métodos capazes de avaliar a LPO é a medida de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), embora seja um método indireto é bastante utilizado (Schneider e Oliveira, 2004).

1.2 JUSTIFICATIVA

Levando-se em consideração a importância das alterações comportamentais e neuroendócrinas provocadas pela manipulação no período neonatal e as evidências funcionais nos rins de animais adultos que foram manipulados ao nascimento, criou-se a hipótese de que os componentes do SRA, como a renina e os receptores AT₁ e AT₂ da ANG II, e o estresse oxidativo possam estar alterados nesses animais. Dessa forma, decidiu-se investigar os efeitos da manipulação neonatal sobre a expressão de diferentes componentes do SRA e de parâmetros de estresse oxidativo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 GERAL

Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre o SRA e o balanço oxidativo no sistema renal de ratos.

1.3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do RNAm da renina e dos receptores AT₁ e AT₂ no sistema renal;

- Avaliar o dano oxidativo (TBARS) e os parâmetros antioxidantes (CAT, SOD) no sistema renal dos animais em estudo;

- Avaliar a concentração plasmática de ANG II.

1.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê Científico da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, protocolado sob o nº 100/09.

CAPÍTULO 2

2.1 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Evaluation of the kidney renin-angiotensin system and oxidative stress in neonatal handled rats

Submetido ao periódico: Developmental Biology

Evaluation of the kidney renin-angiotensin system and oxidative stress in neonatal handled rats

Daniela Livinalli Rodriguez^{1,2}, Márcio Vinícius Fagundes Donadio^{1,3}, Fernanda Cristina de Mesquita¹, Débora Attolini¹, Bruna Borba¹, Patrícia da Silva Scherer¹, Priscilla Heberle Almeida¹, Vinícius Lorini da Costa¹, Bárbara de Souza Scherer^{1,2}, Virgínia Minguelli Schmitt⁴ and Jarbas Rodrigues de Oliveira^{1,2}

¹Faculdade de Biociências e Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

²Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). ³Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). ⁴Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Adress correspondence to: Márcio Vinícius F. Donadio, Av. Ipiranga 6681 – Prédio 12 – 8° andar. Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90619-900 (Brazil). CEP90619-900. Tel. +55 51 3320 3646, Fax +55 51 3320 3647.

E-mail:mdonadio@pucrs.br

ABSTRACT

Neonatal handling induces behavioral, hormonal and hydroelectrolytic balance changes. In the kidney, all renin-angiotensin system components, including angiotensin II type 1 (AT₁) and type 2 (AT₂) receptors, are highly expressed during nephrogenesis. This study aimed to evaluate the effects of neonatal handling on the kidney renin-angiotensin system and oxidative stress balance. The pups were divided into two groups: nonhandled and handled. The procedure consisted of handling the pups for 1 min/day in the first 10 days of life. On day 1, 5 and 10, animals were killed by decapitation. Blood samples were collected and the kidneys were removed. Renin, AT₁ and AT₂ mRNA expression were evaluated through RT-PCR. Angiotensin II (ANG II) plasma levels were also measured. Results have shown an increase in ANG II plasma concentration and kidney AT₂ expression mRNA. The kidney mRNA AT₁ expression was decreased and, when the oxidative stress balance was evaluated, a TBARS increase was shown. The results indicate that handling in the neonatal period induces the activation of the angiotensinergic system, as well as modulates its receptors, indicating that it may play an important role in the development of some of the renal alterations.

Key words: Neonatal handling, renin-angiotensin system, oxidative stress, angiotensin II receptors.

Introduction

Environmental stimuli during the neonatal period have lasting effects on emotional behavioral and reactivity to stress in adult animals (Meerlo et al., 1999; Padoin et al., 2001). Neonatal handling has been used as an experimental model to examine the mechanisms by which early environmental changes could affect neural systems, leading to stable behavioral and neuroendocrine changes (Levine, 1994). Adult male and female rats handled for 1 minute during the first 10 days exhibited reduction in emotional responses in adulthood, expressed by increased exploratory activity, which is interpreted as attenuated fearfulness to novel environments. This apparently harmless procedure in infancy reduces the secretion of corticosterone, adrenocorticotrophin and prolactin in response to stressors in adulthood (Meerlo et al., 1999). Other results showed that neonatal handling may affect the regulation of angiotensin II (ANG II) receptors in the central nervous system (Gomes et al., 2006), as well as regulatory mechanisms of hydroelectrolyte balance and renal function in adult rats. Neonatal handling significantly reduced urinary volume, water intake, creatinine clearance, plasma aldosterone, angiotensin II (ANG II) and corticosterone concentrations (Donadio et al., 2009). This long-lasting effects could be related to a possible disruption in the system's maturation process, considering that neonatal period is crucial for kidney and urinary tract development.

The renin-angiotensin system (RAS) is a coordinated hormonal cascade that culminates in the production of ANG II and are involved in the control of cardiovascular, renal and adrenal function, controlling fluid, electrolyte balance and arterial pressure (Carey and Siragy, 2003). In the kidney, all components of the RAS, including angiotensin II type 1 (AT₁) and type 2 (AT₂) receptors, are highly expressed during nephrogenesis (Mesquita et al., 2010), and evidence shows that this local system can work independently through paracrine mechanisms (Siragy, 2010). AT₂ receptors are highly expressed in fetal kidneys but are markedly downregulated after birth, suggesting a key role for AT₂ receptors in fetal nephrogenesis. AT₁ receptors are also expressed by fetal kidneys but their expression is markedly upregulated at birth, and they appear to be responsible for the fine-tuning of later stages of tubular and nephrovascular development. In general, AT₁ receptors appear to have functions

opposite to and perhaps balancing those of AT₂ receptors (Lasaitiene et al., 2006). Furthermore ANG II causes production of reactive oxygen species (ROS) through activation of NADPH oxidase (Lenarczyk et al., 2009).

Oxidative stress is defined as an imbalance between formation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidative defence mechanisms (Galle, 2001). The balance between ROS production and antioxidant defences determines the degree of oxidative stress. Consequences of this stress include modification to cellular protein, lipids and DNA. One of the main mechanisms of injury is the lipid peroxidation, which is the oxidation of cell membrane, and can be measured through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). On the other hand, the main enzymatic antioxidant defence system includes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) (Finkel and Holbrook, 2000).

Considering that early-life environmental changes can induce stable long-lasting effects upon a variety of systems, including the renal function, and the importance of the RAS in nephrogenesis, this study aimed to evaluate the effects of neonatal handling on the expression of renin, AT₁ and AT₂ receptors in the kidney. The renal oxidant defence system balance and the lipid peroxidation were also determined. The possible influence of early handling on the RAS, as well as on the oxidative stress system, could contribute to the understanding of long-term renal function impairment seen in this model.

Materials and Methods

Animals

We have used male and female Wistar rats that were maintained on a 12-hour light-dark cycle (lights on from 06:00 to 18:00), room temperature was 24±2°C, and water and food were available at all times. On the day of birth (day 0), the number of pups was randomly culled to 8 per dam.

Neonatal Handling

The pups were divided into two groups: nonhandled (control) and handled during the neonatal period. First, the mother was placed in another cage next to the home cage, and then all the pups gently handled at the same time using both hands, covered with fine latex gloves, for 1 minute. After handling, all pups were returned to the nest at the same time and then the mother was placed back in the home cage. This procedure was repeated from the 1st to the 10th postnatal day, during the light period of the daily photoperiod cycle (Donadio et al., 2009).

Experimental Design

Firstly, all animals were divided in two groups (nonhandled and handled), as previously described. After that, all experiments were performed in 3 different days: first, fifth and tenth day after birth. For all animals included in the handled group, experiments were also conducted in two different moments in each of the 3 days: before and after (30 min) the handling procedure. The complete description of all experimental groups is summarized in table 1. In all cases, 6 animals per group were used.

All animals were killed by decapitation. Kidney were collected and stored in -80°C to evaluate renin and ANG II receptors (AT₁ and AT₂) expression by RT-PCR, as well as antioxidative and lipid peroxidation parameters. Blood samples were also collected in order to measure ANG II serum concentration.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total cellular RNA from all experimental groups were isolated from preparations using TRIzol Reagent[®] (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), following manufacturer's instructions. After the total RNA was extracted from each kidney, the cDNA synthesis was performed using the SuperScript[™] *First-Strand Synthesis System for RT-PCR*[®] kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

β -actin amplification was performed using 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1U Taq polymerase and the following primers: forward was 5'-ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG-3' and reverse was 5'-GGC CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3'. The amplification was carried out using an initial denaturing cycle at 94°C for 2 min and the subsequent cycles as follows: denaturation, 1 min at 94°C; annealing 1 min at 60°C; and extension, 1 min at 72°C and a final extension, 5 min at 72°C. In the renin amplification we have used: 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1U Taq polymerase. The forward primer was 5'-CTA CGT GAG CAT CAG CAA GG-3' and the reverse was 5'-AGG TAG AAG GAG ATG TCG G-3'. The amplification was carried out using an initial denaturing cycle at 95°C for 5 min and the subsequent cycles as follows: denaturation, 40 s at 95°C; annealing 40 s at 57°C; and extension, 30 s at 72°C and a final extension, 5 min at 72°C. AT₁ receptor amplification was performed using 2.5 mM MgCl₂, 0.45 mM dNTP, 2,5 U Taq polymerase and the following primers: forward was 5'-TGA AAC GCG CAC ACT GTG ATA T-3' and the reverse was 5'-ACT TTG CCC CTG TGG GCA G-3'. The amplification was carried out using an initial denaturing cycle at 94°C for 5 min and the subsequent cycles as follows: denaturation, 30 s at 94°C; annealing 30 s at 60°C; and extension, 45 s at 72°C and a final extension, 3 min at 72°C. In the AT₂ receptor amplification we have used: 1.5 mM MgCl₂, 0.45 mM dNTP, 2,5 U Taq polymerase. The forward primer was 5'-CCT TCT TGG ATG CTC TGA CC-3' and the reverse was 5'-TGG AGC CAA GTA ATG GGA AC-3'. The amplification was carried out using an initial denaturing cycle at 94°C for 5 min and the subsequent cycles as follows: denaturation, 30 s at 94°C; annealing 30 s at 65°C; and extension, 45 s at 72°C and a final extension, 3 min at 72°C.

PCR products were electrophoresed using 1.5% agarose gel containing ethidium bromide 0.5 μ g/mL. The gel was subjected to ultraviolet light and photographed. The band intensities were measured using the public domain National Institutes of Health Image program (Image J) and the signals were expressed relatively to the intensity of the β -actin amplicon in each coamplified sample.

Oxidative stress

The kidney were homogenized and the supernatant was used to evaluate the following parameters in all groups.

Lipid peroxidation (TBARS)

Lipid peroxidation resulting from lesions in the cell membrane causes the formation of malondialdehyde and other substances that heated in the presence of thiobarbituric acid form a pink compound measured spectrophotometrically at 535 nm. The reagents used were thiobarbituric acid (TBA) 0.67 %, trichloroacetic acid (TCA) 10 % butyl alcohol (Draper, et al., 1993).

Catalase

CAT activity is based on the conversion of H_2O_2 into water and oxygen. The measurement of CAT levels was determined according to the principle that the absorbance at 240 nm will decrease due to dismutation of H_2O_2 . The amount of H_2O_2 converted in 60 seconds is accepted as the enzyme-reaction velocity.

Superoxide dismutase

The method used to determine the SOD activity is based on the inhibition of superoxide radical (O_2^-) reaction with adrenaline, which is a compound that self-oxidizes with pH changes. The auto-oxidation of adrenaline, in an alkaline medium, generates O_2^- . SOD in the sample competes with the detection system for O_2^- radical. The oxidation of adrenaline leads to the formation of a colored product, the adrenochrome, detected spectrophotometrically. The SOD activity is determined by measuring the rate of formation of adrenochrome, observed at 480 nm in a reaction medium containing glycine-NaOH (50mM at pH 10.2) and adrenaline (60 mM at pH 2) (Boveris et al., 1983).

Protein Measurement

Protein was measured using a commercial kit (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brazil), according to the manufacturer's instructions.

Angiotensin II Measurement

Plasma angiotensina II levels were measured using commercially available ELISA kits (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, Calif., USA). The lower limit for detection was 0.02-0.04 ng/ml and all procedures were conducted according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The normality of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test and the results were presented by descriptive statistics as average and standard error of the mean. Differences between means were evaluated by two way analysis of variance - ANOVA and Bonferroni post hoc test was used. The level of significance was $p \leq 0.05$ and all data analysis were performed using the SPSS (Statistical Package for Social Sciences software) 17.0.

Results

Renin expression

The results demonstrate an increased in the kidney renin mRNA in the AHd1 group when compared to the NHd1 group ($p=0.01$), indicating that neonatal handling induced renin mRNA expression in the first day. When the expression was analyzed on day 5, it have found an increase in the AHd5 group when compared to the NHd5 group ($p=0.038$), showing that neonatal handling also increased renin expression in day 5. We have also demonstrated an increased expression when the BHd5 group was compared to the NHd1 ($p=0.002$), indicating that the high renin mRNA expression induced in the first day was still present in day 5 before animals were handled (Figure 1).

AT₁ receptor expression

When the kidney AT₁ receptor mRNA expression was analyzed, a decrease in the AHd5 group was found when compared to the NHd5 group ($p=0.05$), indicating that neonatal handling can also act modulating the receptor expression. We have also found an increased expression in both NHd5 ($p=0.04$) and NHd10 ($p=0.05$) groups when compared to the NHd1 group, demonstrating that mRNA AT₁ receptor expression increases during the neonatal period (Figure 2a).

AT₂ receptor expression

The results show an increase in the kidney AT₂ receptor mRNA expression in the AHd1 group when compared to the NHd1 group ($p=0.05$). No other significant differences were found. This also indicates that neonatal handling can act modulating not only AT₁ receptors but also AT₂ receptor mRNA expression (Figure 2b).

Angiotensin II evaluation

When ANG II plasma concentration was analyzed, a significant increase was found after the handling procedure on day 1 ($p=0.01$) and day 10 ($p=0.002$), demonstrating that the neonatal handling intervention can act inducing a RAS activation. Moreover, we have also found an increased ANG II plasma concentration in the NHd5 ($p=0.05$) and NHd10 ($p=0.03$) groups compared to the NHd1, showing that ANG II levels also increase during the neonatal period (Figure 3).

Oxidative Stress Evaluation

Lipid peroxidation was accessed through the TBARS assay. Results show an increase in the AHd10 group compared to both NHd10 ($p=0.05$) and BHd10 ($p=0.01$) groups. However, no other significant differences were found when both CAT and SOD antioxidant defense enzymes were analyzed, indicating that neonatal handling induces very limited effects on the kidney oxidative stress balance (Figure 4).

Discussion

The present study shows that neonatal handling induces alterations in some of the kidney RAS components mRNA expression, as well as increases ANG II plasma concentration. On the other hand, the neonatal handling as an early life intervention seems not to have major effects on the oxidative stress balance.

The period right after birth is called hyporesponsive stress period, which comprehends approximately between the fourth and the 14th day after birth, and it is characterized by very low glucocorticoid levels due to the inability of several stressors in inducing an ACTH and corticosterone plasma increase (Levine, 2001; Schmidt et al., 2003). In spite of the characteristic HPA axis hyporesponsivity of this period, our results demonstrate that neonatal handling induced an increase in the kidney mRNA renin expression and ANG II plasma concentration. Considering that the neonatal period is crucial for the development of several systems (Lucion et al., 2003; Schmidt et al., 2003) and the evidences that the RAS may act modulating these functions through its' receptors (Chen et al., 2004), the RAS activation in response to the neonatal handling could be one of the mechanisms responsible for important changes previously described in this experimental model. It is well known that stress increases circulating ANG II production by increasing renin secretion through sympathetic stimulation and beta-adrenergic receptor activation (Saavedra, et al. 2004; Yang et al., 1996), potencializing the HPA axis activity by acting over hypothalamic, pituitary and adrenal components (Tsigos and Chrousos, 2002). Thus, in spite of the neonatal handling model being considered a stress model or not, our results demonstrate that this early life intervention was capable of inducing a RAS activation at different levels.

Regardless being a stress hormone, ANG II plays a key role in regulating the kidney development, since it is the main RAS hormone. Indeed, all kidney RAS components are highly expressed in the neonatal period (Puddu et al., 2009). ANG II effects are mainly mediated by AT₁ and AT₂ receptors. AT₂ receptors are highly expressed in the fetal kidney and progressively decrease after birth, while AT₁ receptors increase its expression. AT₁ receptors seem to have functions opposite to and perhaps balancing those of AT₂ receptors, since AT₁ receptors are involved in the cellular proliferation, nefrovascular development and growth factors induction,

while AT₂ receptors have apoptotic and growth inhibition functions (Lasaitiene et al., 2006). A previous study has demonstrated that animals handled in the neonatal period presented a decrease in the kidney function, evaluated through the glomerular filtration rate, and an alteration in the hydroelectrolytic regulatory mechanisms, when compared to the nonhandled animals (Donadio et al., 2009). Our results show an increase in the kidney AT₂ mRNA expression in the first day of handling, a decrease in the kidney AT₁ mRNA expression in the fifth day of handling and an increase in the circulating levels of ANG II. Taken together, these results may help explaining the previously described renal alterations induced by handling the animals in the neonatal period, since a greater AT₂ receptor expression, associated to an increase in both renin expression and circulating ANG II levels, could be involved in inhibitory mechanisms regulating kidney growth, considering the well described AT₂ receptor apoptotic effects. However, in spite of the fact that previous results have failed to demonstrate a significant decrease in the number of nephrons, a kidney weight decrease was shown (Donadio et al., 2009), indicating that growth inhibition mechanisms are likely to be involved and that other morphological parameters changes that were not addressed couldn't be ruled out.

The production of circulating and local ANG II, as well as the expression of AT₁ receptors, increases during stress situations (Saavedra and Benincky 2007). We have demonstrated here that neonatal handling increased plasma ANG II and kidney renin mRNA expression. Evidence shows that neonatal handling affects sympathoadrenal activity (Young, 2000). On the other hand, in spite of several physiological situations that influence mechanisms regulating the renin secretion, it is known that stress also increases renin activity (Jindra and Kvetnansky 1982). Thus, it is possible that an increased sympathetic activity could play a role in the increased renin expression and plasma ANG II seen in our results. Enhanced AT₁ receptor activity, which is also influenced by stress, has been reported to modulate AT₂ receptor expression. However, regulation of the AT₂ receptor expression is still poorly understood. The AT₂ receptor is upregulated by sodium depletion, insulin and insulin-like growth factor 1, and is downregulated by ANG II and growth factors such as platelet-derived growth factor and epidermal growth factor, and in diabetes (Siragy, 2010). However, in spite of the possible origin of the RAS activation and mechanisms underlying receptor alterations, to our knowledge, this is the first study showing that

the main components of the RAS, for instance plasma ANG II, renin and both receptors (AT₁ and AT₂) mRNA expression are influenced by early environmental changes such as neonatal handling in rats.

On the other hand, oxidative stress is defined as an imbalance between reactive oxygen species (ROS) formation and antioxidative defense mechanisms (Galle, 2001). This imbalance can cause injuries to DNA molecules, lipids, carbohydrates and proteins, in addition to other cellular components (Lenarczyk et al., 2009). Our results have showed an increase in the TBARS levels in the day 10, after animals were handled, although no significant changes were demonstrated in the antioxidant defense enzymes analyzed. This TBARS increase seen in the 10th day, although isolated, could be contributing to increase renal tissue cellular injury. Besides that, it is known that ANG II is also a pro-oxidative hormone through its binding to AT₁ receptors, which will activate NAD(P)H oxidase and then increase the ROS (Lenarczyk et al., 2009; Serrano et al., 2009). Thus, it is possible that the increased TBARS in our results could be a consequence of the RAS activation. Nevertheless, the hypothesis that oxidative stress balance changes could influence the kidney development and be involved in the long-lasting alterations previously described seems very unlikely, considering present results that demonstrate no reliable changes in the oxidative stress balance after neonatal handling in rats.

Conclusion

Taken together, the results indicate that handling in the neonatal period induces the activation of the angiotensinergic system, as well as modulates its receptors, indicating that it may play an important role in the development of some of the renal alterations previously described. On the other hand, the mechanisms regulating the oxidative stress balance system seems not to be involved. The precise mechanisms by which neonatal handling induces long-lasting effects are still not completely understood and futures studies addressing this issue should be conducted.

Acknowledgements

The authors are indebted to CNPq for financial support.

REFERENCES

- Boveris, A., Fraga, C.G., Vassavskis, A.I., Koch, O.R, 1983. Archives of Biochemistry and Biophysics. 534-541.
- Carey, R.M., Siragy, H.M., 2003. Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. Endocrine Reviews. 24, 261-271.
- Chen, Y., Lasaitiene, D., Frieberg, P., 2004. The renin-angiotensin system in kidney development. Acta Physiological Scandinavian. 181, 529-535.
- Donadio, M.V., Jacobs, S., Corezola, K.L., Melo, D.M., Dias, H.M., Reichel, C.L., Franci, C.R., Jeckel-Neto, E.M., Lulhier, F., Oliveira, J.R., Sanvitto, G.L., 2009. Neonatal Handling Reduces Renal Function in Adult Rats. Kidney & Blood Pressure Research. 32, 286-292.
- Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Agarwae, S., Hadley, M., 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radical Biology and Medicine. 15, 353-363.
- Finkel, T., Holbrook, N., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 408, 239-247.
- Galle, J., 2001. Oxidative stress in chronic renal failure. Nephrology Dialysis Transplantation 16, 2135-2137.
- Gomes, C.M., Donadio, M.V., Franskoviaki, I., Anselmo-Franci, J.A., Franci, C.R., Lucion, A.L., Sanvitto, G.L., 2006. Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats. Brain Research 1067, 177-180.
- Jindra, A., Kvetnansky, R., 1982. Stress-induced activation of inactive renin. Journal of Biological Chemistry 257, 5997– 5999.
- Lasaitiene, D., Chen, Y., Adams, M.A., Frieberg, P., 2006. Further insights into role of angiotensin II and kidney development. Clinical Physiology and Functional Imaging 26, 197-204.
- Lenarczyk, M., Cohen, E. P., Fish, B. L., Irving, A. A., Sharma, M., Driscoll, C. D., Moulder, J. E., 2009. Chronic Oxidative Stress as a Mechanism for Radiation Nephropaty. Radiation Research. 171, 164-172.
- Levine, S., 2001. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. Physiology & Behavior. 73, 255-260.

- Levine, S., 1994. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annual New York Academy of Sciences*. 746, 275-293.
- Lucion, A. B., Pereira, F. M., Winkelman, E. C., Sanvitto, G. L., & Anselmo-Franci, J. A., 2003. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavior Neuroscience*. 117, 894-903.
- Meerlo, P., Horvath, K.M., Nagy, G.M., Bohus, B., Koolhaas, J.M., 1999. The Influence of Postnatal Handling on Adult Neuroendocrine and Behavioural Stress Reactivity. *Journal of Neuroendocrinology*. 11, 925-933.
- Mesquita, F.F., Gontijo, J.A.R, Boer, P.A., 2010. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 25, 380-388.
- Padoin, M.J., Barros, H.M.T, Cadore, L.P., Gomes, C.M., Lucion, A.B., 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats." *Behavioral neuroscience*. 115, 1332-1340.
- Puddu, M., Fanos, V., Podda, F., Zaffanello. The kidney from Prenatal to Adult Life: Perinatal Programming and Reduction of Number of Nephrons during Development. *American Journal of Nephrology*. 30, 162-170.
- Saavedra, J.M., Benicky, J., 2007. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress*. 10, 185-189.
- Saavedra, J.M., Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Jezova, M., Zhou, J., 2004. Brain Angiotensin II, an Important Stress Hormone: Regulatory Sites and Therapeutic Opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1018, 76-84.
- Schmidt, M., Enthoven, L., Van der Mark, M., Levine, S., Kloet, E.R., Oitzl, M.S., 2003. The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 21, 125-132.
- Serrano, G.L., Ritchie, B., Hoffman, D., Ferder, L., 2009. A new concept for an old system: The anti-inflammatory paradigm of the renin-angiotensin system. *Medical Hypotheses* 72, 584-588.
- Siragy, H.M., 2010. The angiotensin II type 2 receptor and the kidney. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 11, 33-36.
- Tsigos, C., Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*. 53, 865-871.

Yang, H., Wan, Y., & Zhu, Y., 1996. Angiotensin II: an important stress hormone. *Biology Signals*. 5, 1-8.

Young, J.B., 2000. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 279, R1745-1752.

Table 1 - Experimental design used in the study.

Group	Day after birth	Time of euthanasia
Nonhandled	Day 1 (NHd1)	-
	Day 5 (NHd5)	-
	Day 10 (NHd10)	-
Handled	Day 1	Before Handling* (BHd1)
		30 min After Handling (AHd1)
	Day 5	Before Handling(BHd5)
		30 min After Handling (AHd5)
	Day 10	Before Handling (BHd10)
		30 min After Handling (AHd10)

*Considering that in the first day the nonhandled group (NHd1) would be the same as the group before handling (BHd1), since no intervention was performed so far, this group (BHd1) was not used in the experiments. In all cases n = 6 per group.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Effects of neonatal handling on the kidney mRNA renin expression evaluated through RT-PCR. Each bar represents the mean \pm SEM (n=6 per group). Data were analyzed by two way analysis of variance - ANOVA and Bonferroni post hoc test was used. Significant differences accepted at $p \leq 0.05$. * Indicates a significant difference between groups in the same day and # indicates a significant difference between days in the same group.

FIGURE 2. Effects of neonatal handling on the kidney mRNA AT₁ (a) and AT₂ receptors (b) expression evaluated through RT-PCR. Each bar represents the mean \pm SEM (n=6 per group). Data were analyzed by two way analysis of variance - ANOVA and Bonferroni post hoc test was used. Significant differences accepted at $p \leq 0.05$. * Indicates a significant difference between groups in the same day and # indicates a significant difference between days in the same group.

FIGURE 3 – Effects of neonatal handling on the angiotensin II plasma concentrations evaluated through an immunoassay (ELISA). Each bar represents the mean \pm SEM (n=6 per group). Data were analyzed by two way analysis of variance - ANOVA and Bonferroni post hoc test was used. Significant differences accepted at $p \leq 0.05$. * Indicates a significant difference between groups in the same day and # indicates a significant difference between days in the same group.

FIGURE 4 – Effects of neonatal handling on the oxidative stress system: TBARS (a), SOD (b) and CAT (c). Each bar represents the mean \pm SEM (n=6 per group). Data were analyzed by two way analysis of variance - ANOVA and Bonferroni post hoc test was used. Significant differences accepted at $p \leq 0.05$. * Indicates a significant difference between groups in the same day and # indicates a significant difference between days in the same group.

FIGURE 1

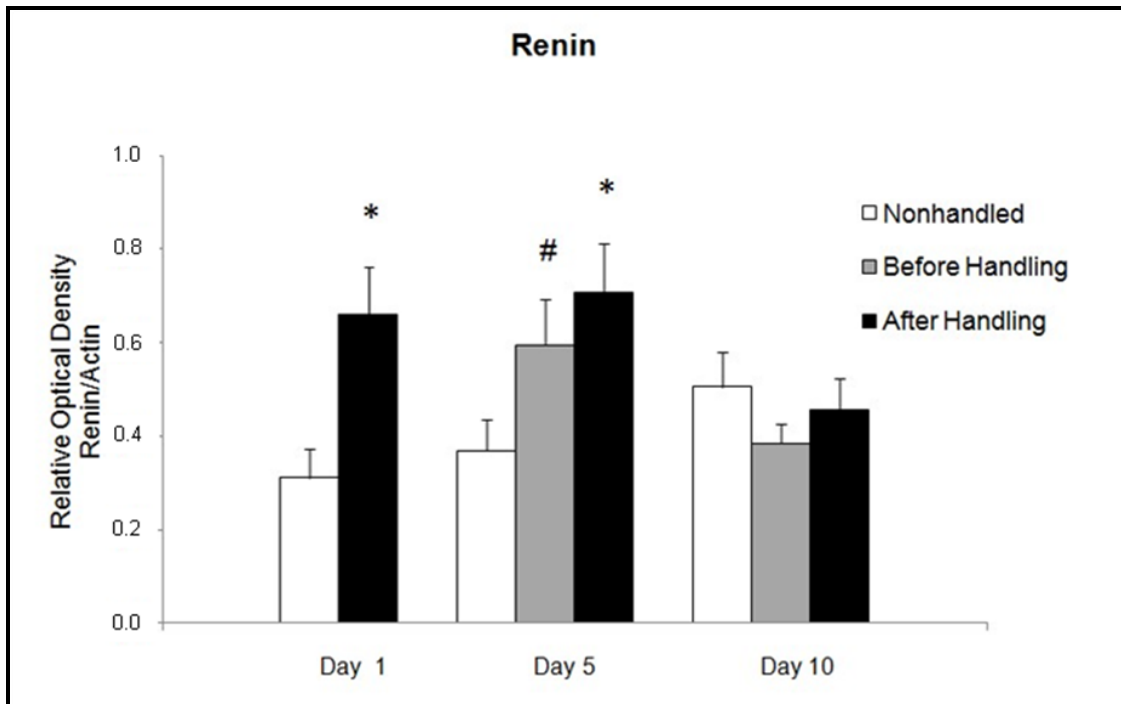


FIGURE 2

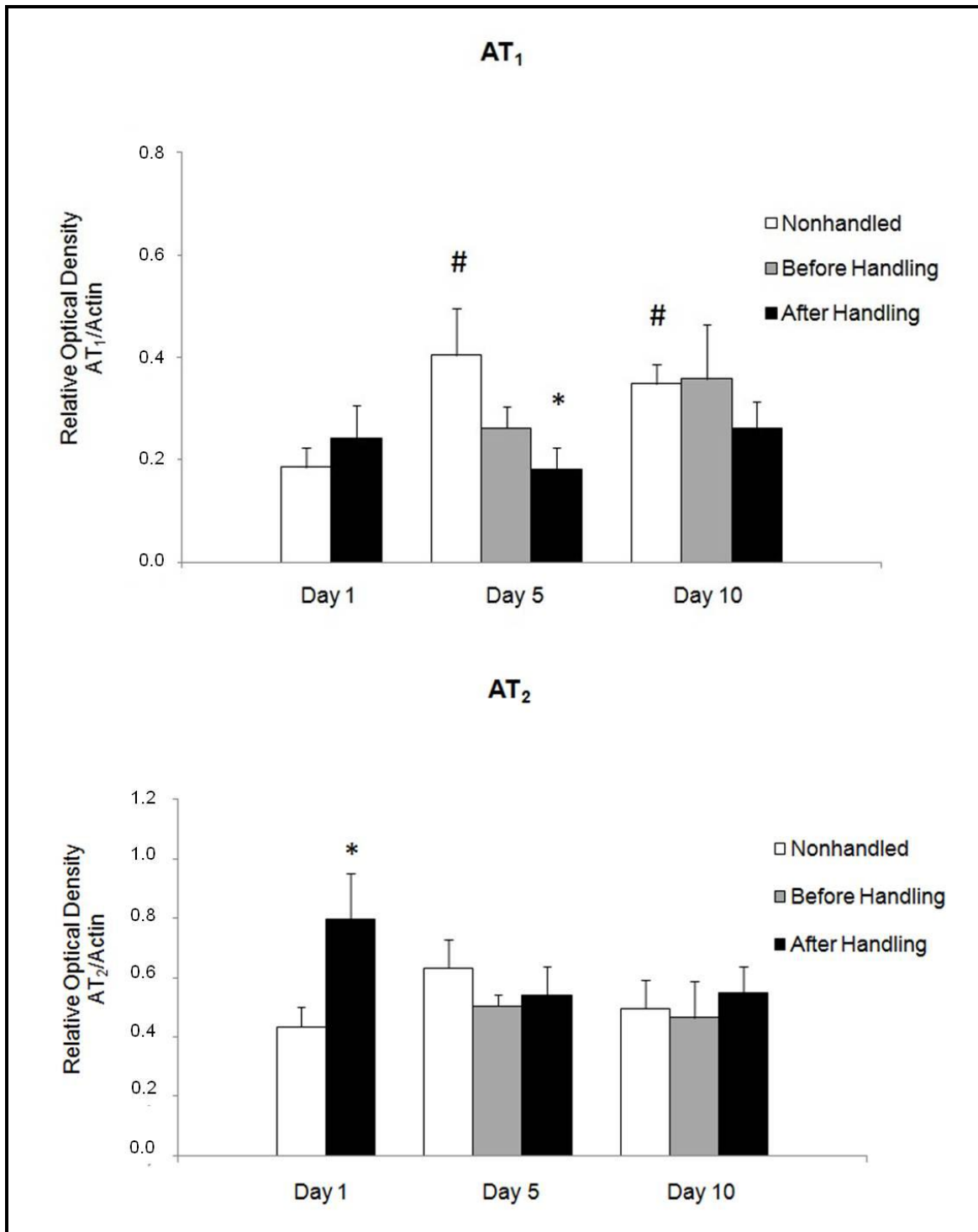


FIGURE 3

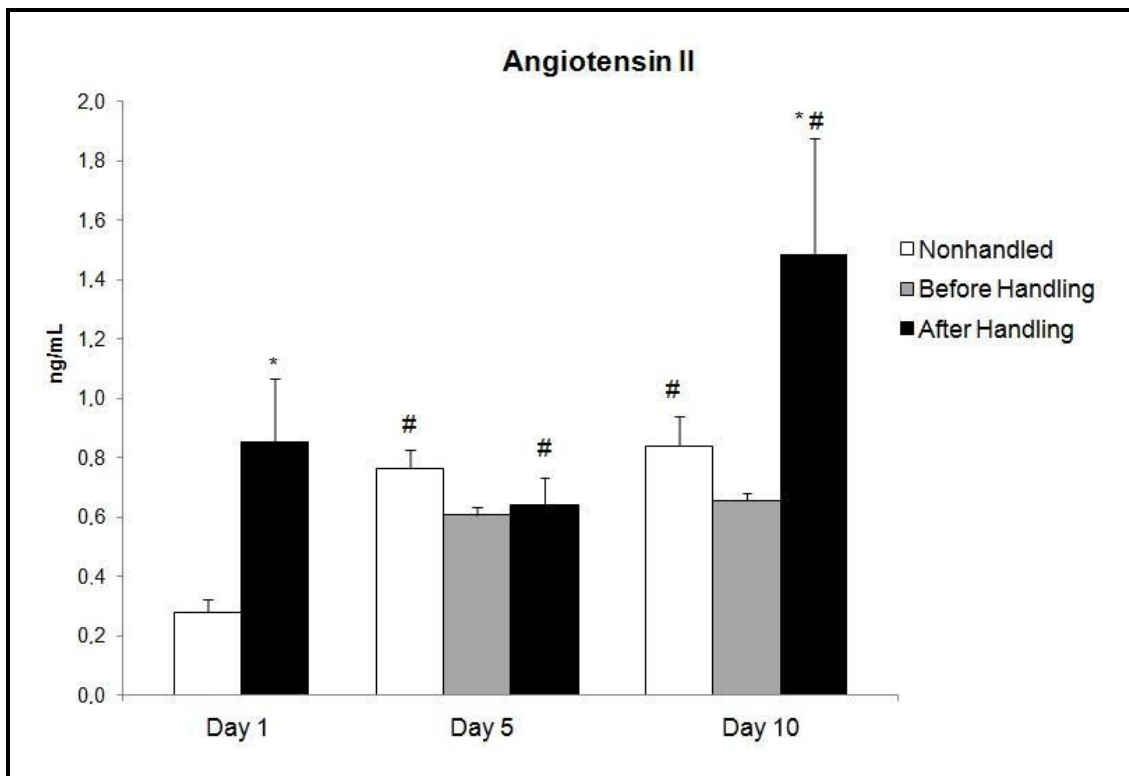
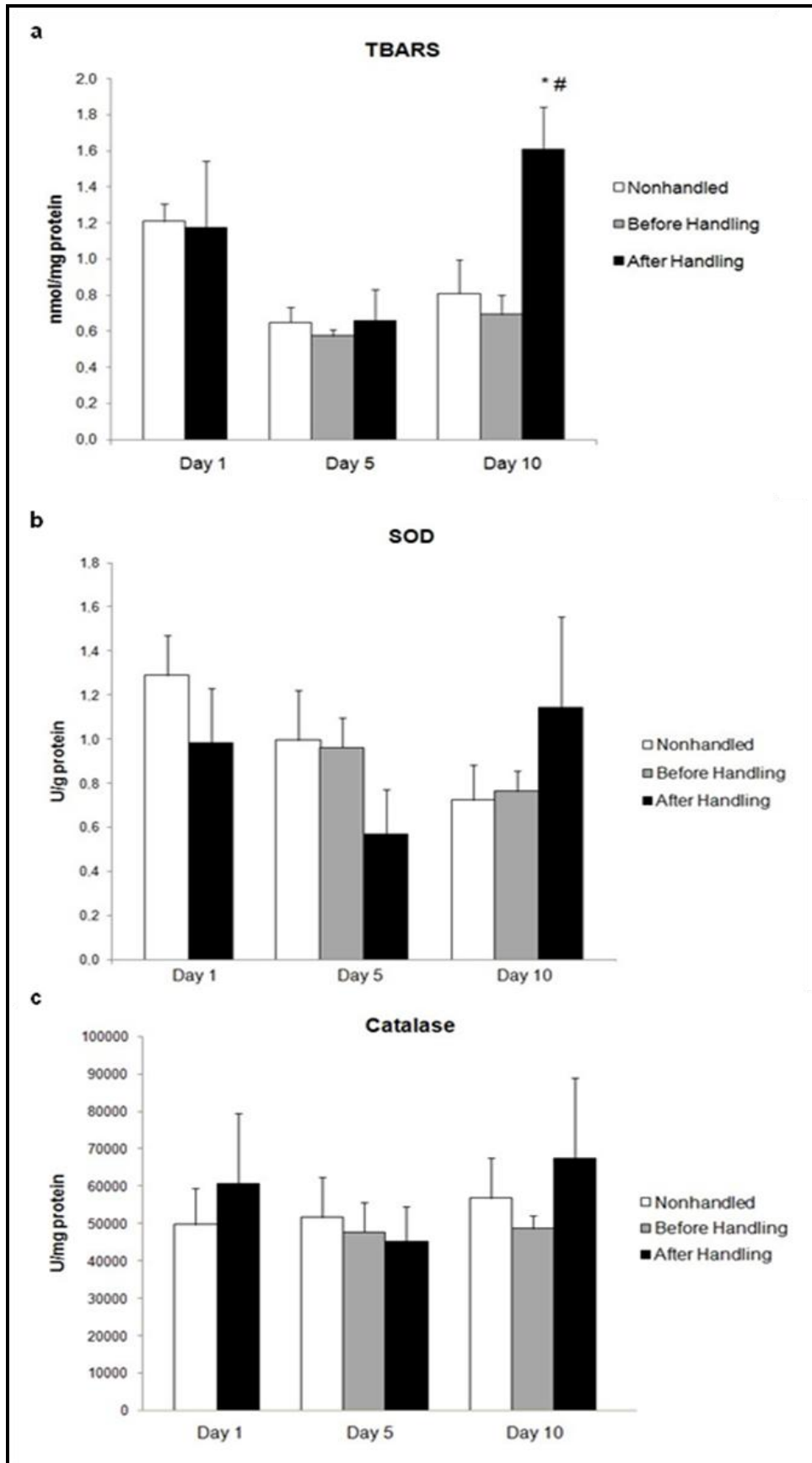


FIGURE 4



CAPÍTULO 3

3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que a manipulação neonatal afeta o sistema renina-angiotensina (SRA). Estudos demonstram que o período que compreende do 4º ao 14º dia pós-natal é chamado de período hiporresponsivo ao estresse, por ser um período com níveis basais muito baixos de corticosterona (Levine, 2001). Isso se deve a uma dificuldade dos estressores induzirem um aumento de ACTH e conseqüente liberação de corticosterona (Levine, 2001; Schmidt et al., 2003). Apesar da hiporresponsividade do eixo HPA, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o SRA responde em situações de estresse nessa fase do desenvolvimento.

O estresse causado pela manipulação nos animais, aumentou a expressão de mRNA de renina no primeiro e no quinto dia de manipulação, mostrando que existe um efeito estimulatório sobre o SRA. Este sistema tem papel importante na nefrogênese e todos os seus componentes são altamente expressos durante o desenvolvimento renal (Lasaitiene et al., 2006; Puddu et al., 2009). Alguns estudos já demonstraram que a hiperativação tem um papel central na progressão da doença renal (Lin et al., 2009). E desta forma os resultados demonstram um aumento da atividade do SRA até o quinto dia da manipulação quando comparado ao primeiro dia.

Os efeitos da angiotensina são mediados principalmente pelos receptores AT₁ e AT₂. O receptor AT₁ parece ter uma função oposta ao receptor AT₂ ou modulando sua resposta, uma vez que os receptores AT₁ são responsáveis por proliferação celular, desenvolvimento nefrocelular e induzem fatores de crescimento e os receptores AT₂ tem funções apoptóticas e de inibição do crescimento (Lasaitiene et al., 2006). Foi encontrado um aumento na expressão do receptor AT₂ e uma diminuição na expressão do receptor AT₁ induzido pela manipulação. Foi encontrado também um aumento na concentração plasmática de ANG II. Este aumento do receptor de AT₂, junto com o aumento de renina e ANG II pode indicar que a ativação do SRA esteja induzindo efeitos de apoptose.

Estudos mostraram que a função renal está alterada em animais adultos que foram manipulados no período neonatal, pois esses animais apresentaram uma redução no peso total do rim, na ingestão hídrica, no volume urinário e no clearance de creatinina (Donadio, et al. 2009). O SRA no período neonatal contribui de forma importante para o desenvolvimento estrutural e funcional dos rins, o que foi demonstrado através de estudos que utilizaram bloqueio farmacológico ou genético dos seus componentes e foi encontrado diminuição (Lasaitiene, et al. 2006, Chen, et al. 2004).

O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mecanismos de defesa anti-oxidante (Galle 2001). Este desbalanço gera acúmulo de EROs que causa danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares (Lenarczyk, et al. 2009). Nossos resultados mostraram um aumento de TBARS no décimo dia após a manipulação, porém não mostraram nenhuma alteração das enzimas de defesa antioxidante. Este aumento de TBARS isolado no décimo dia poderia estar contribuindo para um aumento do dano celular no tecido renal. Além disso sabe-se que a ANG II é também um hormônio com atividade pró-oxidante pela sua ligação ao receptor AT_1 que leva a ativação de NAD(P)H oxidase causando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Serrano, et al. 2009; Lenarczyk, et al. 2009). A hipótese de que alterações no balanço oxidativo pudessem influenciar o desenvolvimento de sistemas e ter envolvimento nas alterações estáveis já descritas parece não se confirmar, considerando os resultados do presente estudo que demonstram que a manipulação neonatal praticamente não altera o estresse oxidativo.

Em conjunto, os resultados indicam que a manipulação no período neonatal provoca uma ativação do SRA, além da modulação de seus receptores, podendo ter um papel importante no desenvolvimento das alterações renais já descritas. Por outro lado, os mecanismos de regulação do sistema de balanço oxidativo parecem não estar envolvidos. Os mecanismos precisos pelos quais essas alterações ocorrem ainda não são claros e devem ser avaliados em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- Caldji, C., Diorio, J., & Meaney, M. J. (2000). Variations in Maternal Care in Infancy Regulate the Development of Stress Reactivity. *Society of Biological Psychiatry* , 48, 1164-1174.
- Cannon, W. B. (1941). The body physiologic and the body politic. *Science* , 93.
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior* , 79, 359-371.
- Chen, Y., Lasaitiene, D., & Frieberg, P. (2004). The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiological Scandinavian* , 181, 529-535.
- Donadio, M. V., Jacobs, S., Corezola, K. L., Melo, D. A., Dias, H. B., Reichel, C. L., et al. (2009). Neonatal Handling Reduces Renal Function in Adult Rats. *Kidney & Blood Pressure Research* , 32, 286-292.
- Ferreira, A. L., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* , 43, 61-68.
- Finkel, T., & Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* , 408, 239-247.
- Francis, D. D., & Meaney, M. J. (1999). Maternal care and the development of stress responses. *Current Opinion in Neurobiology* , 9, 128-134.
- Galle, J. (2001). Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 16, 2135-2137.
- Gomes, C. M., Donadio, M. V., Franskoviaki, I., Anselmo-Franci, J. A., Franci, C. R., Lucion, A. B., et al. (2006). Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats. *Brain Research* , 1067, 177-180.
- Gomes, C. M., Frantz, P. J., Sanvitto, G. L., Anselmo-Franci, J. A., & Lucion, A. B. (1999). Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* , 32, 1239-1242.
- Gomes, C. M., Raineski, C., Paula, P. R., Severino, G. S., Helena, C. V., Anselmo-Franci, J. A., et al. (2005). Neonatal handling and reproductive function in female rats. *Journal of Endocrinology* , 184, 435-445.
- Hsu, F.-C., Zhang, G.-j., Raol, Y. S., Valentino, R. J., & Coulter, D. A. (2003). Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters

hippocampal GABA_A receptors and behavioral stress responses. *PNAS* , 100 (21), 12213-12218.

Juruena, M. F., Cleare, A. J., & Pariante, C. M. (2004). Eixo Hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. *Revista Brasileira de Psiquiatria* , 26, 189-201.

Lasaitiene, D., Chen, Y., Adams, M. A., & Frieberg, P. (2006). Further insights into role of angiotensin II and kidney development. *Clinical Physiology and Functional Imaging* , 26, 197-204.

Lenarczyk, M., Cohen, E. P., Fish, B. L., Irving, A. A., Sharma, M., Driscoll, C. D., et al. (2009). Chronic Oxidative Stress as a Mechanism for Radiation Nephropaty. *Radiation Research* , 171, 164-172.

Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior* , 73, 255-260.

Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence os maternal factors. *Annual New York Academy of Sciences* , 746, 275-293.

Lin, J., Hu, F. B., Qi, L., & Curhan, G. C. (2009). Genetic polymorphisms of angiotensin-2 type 1 receptor and angiotensinogen and risk of renal dysfunction and coronary heart disease in type 2 diabetes mellitus. *Biomed Central Nephrology* , 10, 1-8.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldj, C., Francis, D., Freedman, A., et al. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science* , 277, 1659-1661.

Lucion, A. B., Pereira, F. M., Winkelman, E. C., Sanvitto, G. L., & Anselmo-Franci, J. A. (2003). Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavior Neuroscience* , 117, 894-903.

Marchesi, C., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2008). Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Cell Press* , 367-374.

Martin, C. A., Cake, M., & Holbrook, N. j. (1977). Relationship between foetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat. *Acta Endocrinology* , 84, 167-176.

Meerlo, P., Horvath, K. M., Nagy, G. M., Bohus, B., & Koolhaas, J. M. (1999). The Influence of Postnatal Handling on Adult Neuroendocrine and Behavioural Stress Reactivity. *Journal of Neuroendocrinology* , 11, 925-933.

Moal, M. L. (2007). Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinology* , 32, 53-59.

- Nistala, R., Wei, Y., Sowers, J. R., & Whaley-Connel, A. (2009). Renin-angiotensin-aldosterone system-mediated redox effects in chronic disease. *Subspeciality in translational medicine* , 153, 102-113.
- Núñez, J. F., Ferré, P., Escorihuela, R. M., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (1996). Effects of Postnatal Handling of Rats on Emotional, HPA-Axis, and Prolactin Reactivity to Novelty and Conflict. *Physiology & Behavior* , 60, 1355-1359.
- Pacák, k., Palkovits, M. (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews* , 22, 502-548.
- Puddu, M., Fanos, V., Podda, F., & Zaffanello. (2009). The kidney from Prenatal to Adult Life: Perinatal Programming and Reduction of Number of Nephrons during Development. *American Journal of Nephrology* , 30, 162-170.
- Schmidt, M., Enthoven, L., Van der Mark, M., Levine, S., Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2003). The postnatal development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience* , 21, 125-132.
- Schneider, C. D., & Oliveira, A. R. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* , 10, 308-313.
- Serrano, G. L., Ritchie, B., Hoffman, D., & Ferder, L. (2009). A new concept for an old system: The anti-inflammatory paradigm of the renin-angiotensin system. *Medical Hypotheses* , 72, 584-588.
- Severino, G. S., Fossati, I. A., Padoin, M. J., Gomes, C. M., Trevizan, L., Sanvitto, G. L., et al. (2004). Effects of neonatal on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & Behavior* , 81, 489-498.
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* , 53, 865-871.
- Vaziri, N. D., Bai, Y., Ni, Z., Quiroz, Y., Pandian, R., & Rodriguez-Iturbe, B. (2007). Intra-renal angiotensin II/AT1 receptor, oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 323, 85-93.
- Weaver, I. C., Meaney, M. J., & Szyf, M. (2006). Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *PNAS* , 103 (9), 3480-3485.
- Wei, Y., Clark, S. E., Thyfault, J. P., Uptergrove, G. M., Whaley-Connell, A. T., Ferrario, C. M., et al. (2009). Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction

Contributes to Angiotensin II-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Transgenic Ren2 Rats. *The American Journal of Pathology* , 174.

Winkelmann-Duarte, E. C., Todeschin, A. S., Fernandes, M. C., Bittencourt, L. C., Pereira, G. A., Samios, V. N., et al. (2007). Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Research* , 1170, 20-30.

ANEXO A

DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

From: ees.developmentalbiology.0.ab3cc.93f453ad@eesmail.elsevier.com on behalf of Developmental Biology

Subject: Submission Received

Title: Evaluation of the kidney renin-angiotensin system and oxidative stress in neonatal handled rats

Corresponding Author: Dr Marcio V Donadio

Authors: Daniela L Rodriguez; Fernanda C Mesquita; Débora Attolini; Bruna S Borba; Patrícia S Scherer; Priscilla H Almeida; Vinícius L Costa; Bárbara S Scherer; Virgínia M Schmitt; Jarbas R de Oliveira

Dear Dr Donadio,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Developmental Biology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Developmental Biology as an author:

<http://ees.elsevier.com/developmentalbiology/>

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Developmental Biology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Developmental Biology

Elsevier Science
525 B St., Ste. 1900
San Diego, CA 92101-4495 USA
tel: 619-699-6351
fax: 619-699-6211
db@elsevier.com