

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A FUNÇÃO  
RENAL, INGESTÃO HÍDRICA E CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE CORTICOSTERONA E ANGIOTENSINA II  
EM RATOS**

**Porto Alegre, 2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A FUNÇÃO  
RENAL, INGESTÃO HÍDRICA E CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE CORTICOSTERONA E ANGIOTENSINA II  
EM RATOS**

**Silvana Jacobs**

Orientador

**Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto**

Co-orientador

**Prof. Dr. Márcio V. F. Donadio**

**Porto Alegre, 2009**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à Vida, que com todos os seus mistérios e razões, me permitiu uma experiência tão enriquecedora, a qual me trouxe conhecimento, desenvolveu minha paciência e fortaleceu o meu caráter.

Especial agradecimento à minha família, que sempre acreditou, investiu e incentivou minha busca pelas coisas nas quais acredito. Aos meus pais, por todo o carinho e apoio nos momentos que julguei difíceis. Sandra e Kelly, minhas irmãs: Obrigada por tudo, tudo mesmo. Se hoje sou como sou, devo muito a vocês!

Ao Professor Gilberto L. Sanvitto, muito obrigada pela oportunidade! Por toda a paciência, dedicação e conhecimento gerado durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Márcio F. Donadio pela co-orientação. Sempre disposto a esclarecer dúvidas e a sugerir soluções.

Agradeço também às Professoras Adriane Belló-Klein, que primeiramente oportunizou meu acesso a esta instituição de ensino, e às Professoras Maria Flávia Ribeiro e Wania Partata pela amizade, apoio e sempre sábio aconselhamento.

Aos meus amigos, minha segunda família. Sempre presentes, para comemorar as boas conquistas e também para confortar nos momentos de angústia. Para jamais me fazer esquecer o verdadeiro valor que cada coisa tem. Juliana Kiefer, Marcio Marchiori, Leonardo Almeida.

À amiga e colaboradora Kizzy Corezola, sempre bem-humorada e disposta ao trabalho. Por todo o apoio técnico, indispensável para a realização deste trabalho.

Ao colega Charles Ferreira, que tornou-se grande amigo e colaborador deste trabalho. Símbolo de companheirismo, otimismo e lealdade.

À colega e amiga Patrícia Feksa, que me permitiu uma importante troca de experiências, lapidando minhas impressões sobre tantas coisas.

Aos demais colegas de laboratório, por toda a amizade e tolerância, pelo apoio técnico e pela experiência compartilhada, otimizando o trabalho e o tornando menos árduo. Anelise Todeschin, Karin Weissheimer, Ana Raquel Karkow, Vanise Sebben, Márcia Scherem, Ana Lúcia Cecconello, Marcelo Souza, Marcelo Herberts, Lígia Centenaro, Adolfo Reis.

Ao apoio financeiro do CNPq e FAPESP.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2- HIPÓTESE.....</b>	<b>19</b>
<b>3- OBJETIVO.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1- Objetivo geral.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2- Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>4- MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1- Animais.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2- Manipulação Neonatal.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3- Grupos Experimentais.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4- Coleta de Dados.....</b>	<b>22</b>
<b>4.5- Função Renal.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6- Relação peso renal/peso corporal.....</b>	<b>23</b>
<b>4.7- Análise morfológica.....</b>	<b>23</b>
<b>4.8- Dosagens hormonais.....</b>	<b>24</b>
<b>4.9- Análise Estatística.....</b>	<b>24</b>
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1- Peso corporal .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2- Peso renal.....</b>	<b>27</b>
<b>5.3- Peso das glândulas supra-renais.....</b>	<b>29</b>
<b>5.4- Relação entre peso renal e peso corporal.....</b>	<b>31</b>

5.5- Medida da espessura do córtex renal.....	33
5.6- Ingestão hídrica basal (24h).....	35
5.7- Volume urinário (24h).....	36
5.8- Taxa de filtração glomerular (TFG).....	37
5.9- Dosagens hormonais.....	38
5.9.1- Corticosterona.....	38
5.9.2- Angiotensina II.....	42
6- RESUMO DOS RESULTADOS.....	46
7- DISCUSSÃO.....	49
8- CONCLUSÕES.....	60
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Resumo dos resultados obtidos em animais de 11 dias de idade, dos grupos não-manipulado e manipulado.

**Tabela 2:** Resumo dos resultados obtidos em animais de 45 dias de idade, dos grupos não-manipulado e manipulado.

**Tabela 3:** Resumo dos resultados obtidos em animais de 90 dias de idade, dos grupos não-manipulado e manipulado.

**Tabela 4:** Resumo das concentrações hormonais dos os animais do grupo não-manipulado, nas diferentes idades.

**Tabela 5:** Resumo das concentrações hormonais dos os animais do grupo manipulado, nas diferentes idades.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Peso corporal em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 2:** Peso renal em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 3:** Peso das glândulas supra-renais em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 4:** Relação entre peso renal e peso corporal em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 5:** Medida da espessura do córtex renal em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 6:** Ingestão hídrica basal de 24h em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 7:** Volume urinário de 24h em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 8:** Taxa de filtração glomerular (TFG) de animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 9:** Concentrações plasmáticas de corticosterona em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 10:** Concentrações plasmáticas de corticosterona em animais não-manipulados de diferentes idades.

**Figura 11:** Concentrações plasmáticas de corticosterona em animais manipulados de diferentes idades.

**Figura 12:** Concentrações plasmáticas de angiotensina II em animais não-manipulados e manipulados.

**Figura 13:** Concentrações plasmáticas de angiotensina II em animais não-manipulados de diferentes idades.

**Figura 14:** Concentrações plasmáticas de angiotensina II em animais manipulados de diferentes idades.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico  
Ang II: Angiotensina II  
ARQ: Núcleo arqueado  
AT: Receptor de Angiotensina  
ECA: Enzima conversora de Ang I em Ang II  
CRH: Hormônio liberador de corticotropina  
HPA: Hipotálamo-hipófise-supra-renal  
ICV: Intracerebroventricular  
IGF-I: *Insulin-like Growth Factor- I*  
LC: Lócus coeruleos  
M: Manipulado  
MN: Manipulação Neonatal  
MnPO: Núcleo pré-óptico mediano  
NM: Não manipulado  
OVLT: Órgão vasculoso da lâmina terminal  
PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo  
RAS: Sistema renina-angiotensina  
SFO – órgão subfornicial  
SNC – sistema nervoso central  
TFG - taxa de filtração glomerular

## RESUMO

A estimulação neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para analisar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis. Uma das alterações mais características é a diminuição do medo a ambientes novos e uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal a estímulos estressantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da manipulação neonatal sobre o sistema angiotensinérgico, sobre a regulação hídrica e o desenvolvimento renal, visto que os ratos apresentam os rins e o trato urinário imaturos ao nascimento e seu desenvolvimento depende de angiotensina II. Investigamos aspectos do desenvolvimento e também da função renal em ratos machos de diferentes idades (11, 45 e 90 dias). Para isso, ratos Wistar foram divididos em dois grupos, dos quais um deles foi submetido a 1 minuto diário de manipulação durante os primeiros 10 dias de vida (grupo manipulado), enquanto o outro grupo não sofreu nenhum tipo de intervenção (grupo não manipulado). Aos 11 dias, os animais foram pesados e em seguida decapitados para coleta de sangue, seguido de extração e pesagem dos rins e das glândulas supra-renais. Os animais de 45 e de 90 dias permaneceram por um período de 24h em gaiolas metabólicas para análise da ingestão hídrica basal, do volume urinário e para posterior cálculo da taxa de filtração glomerular (TFG). Em seguida, estes mesmos animais foram pesados e logo decapitados para coleta de sangue e extração de rins e glândulas supra-renais para serem pesados. Nos animais de 11 dias, não observamos diferenças no peso corporal, peso renal, peso das supra-renais e na espessura de córtex renal entre os grupos manipulado e não manipulado. Os animais manipulados de 11 dias exibiram um aumento nas concentrações plasmáticas de angiotensina II, associada a uma redução de corticosterona plasmática, quando comparados aos animais não manipulados de mesma idade. Nos animais de 90 dias manipulados, quando comparados aos não manipulados, observamos uma redução de peso renal, embora não tenhamos observado redução da espessura do córtex renal. Esses animais apresentaram também uma redução de ingestão hídrica basal e de volume urinário, bem como redução de TFG. Ainda, apresentaram concentrações reduzidas de angiotensina II plasmática,

acompanhadas de redução na concentração de corticosterona. Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados nos animais de 45 dias de idade. Este conjunto de resultados sugere que a manipulação neonatal produz efeitos sobre o sistema angiotensinérgico, manifestados através das diferentes concentrações plasmáticas de angiotensina II observadas entre os animais manipulados e não manipulados. Ainda, que estes efeitos podem estar envolvidos nas alterações dos mecanismos que permeiam a regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, observadas na idade adulta desses animais.

## 1- INTRODUÇÃO

A estimulação neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis (Levine, 1962; Denenberg, 1964). Em ratos, a estimulação neonatal tipicamente consiste na “manipulação” dos animais por alguns minutos, em geral durante as primeiras semanas de vida. Este intervalo após o nascimento representa um período crítico para o desenvolvimento neural em ratos. Processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular ocorrem no encéfalo neste período (Mistretta & Bradley, 1978). A manipulação no período neonatal, ou qualquer outro tipo de estimulação do animal neste período, provoca um distúrbio da relação mãe-filhote (Levine, 1994). As mães de filhotes submetidos à manipulação lambem mais sua prole do que mães de filhotes não-manipulados, ou seja, que não sofreram nenhum tipo de distúrbio (Barbazanges, 1996; Liu *et al.*, 1997; Denenberg, 1999). Sabe-se, por outro lado, que o comportamento da mãe em relação ao filhote (lamber o corpo do filhote, por exemplo) afeta o desenvolvimento do seu sistema nervoso (Levine, 1991), o que poderia explicar as alterações comportamentais e endócrinas observadas na vida adulta desses animais. Assim, postula-se que seria a perturbação da relação mãe-filhote que induziria ao padrão comportamental e endócrino observado na vida adulta do animal manipulado no período neonatal.

O período que corresponde às duas primeiras semanas de vida do rato é marcado por uma redução na capacidade de secretar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona frente a estímulos estressores (Walker *et al.*, 1993). Em estudos realizados por Walker e colaboradores (1986), demonstrou-se que a estimulação neonatal produziu apenas discretas variações de ACTH e corticosterona. No rato, durante as primeiras duas semanas após o parto, a glândula supra-renal produz níveis muito baixos de hormônios corticosteróides. Os níveis de ACTH produzidos pela hipófise nessa fase são também muito baixos, aumentando paulatinamente até a puberdade (Walker *et al.*, 1986). Por este motivo, durante esse período, chamado período hiporresponsivo ao estresse, as reações a estímulos ambientais são acompanhadas apenas por discreta elevação dos hormônios da

supra-renal, diferentemente do que acontece com animais adultos (Gould *et al.*, 1991; Levine, 1994).

O eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (HPA) somente funciona coordenadamente e apropriadamente quando todas as partes que o compõe se encontram amadurecidas. Amadurecimento não só da capacidade de síntese e secreção dos hormônios, mas também da resposta integrada com os tecidos alvos que articulam a retroalimentação da regulação hormonal. Uma possibilidade é de que a hipófise neonatal seja incapaz de responder à liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo via sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, devido à: 1) inabilidade para sintetizar e estocar ACTH; 2) imaturidade do sistema de receptores de CRH ou 3) dissociação entre a estimulação dos receptores de CRH e a secreção de ACTH. Estas considerações foram feitas por Walker e colaboradores (1986), que demonstraram que ratos injetados com CRH no período neonatal não produzem o aumento dos níveis de ACTH observados na idade adulta.

Em ratos, durante o período hiporresponsivo ao estresse (duas primeiras semanas pós-parto), tanto as estimulações aparentemente “inofensivas”, como a manipulação, quanto estímulos estressores como o frio e choque elétrico induzem praticamente as mesmas alterações comportamentais e endócrinas na fase adulta (Levine, 1994). Dessa forma, os grupos de pesquisa que trabalham nessa área consideram os estímulos a que os animais são submetidos no período neonatal apenas como estimulação sensorial, não os caracterizando como estressores, mesmo que assim o sejam considerados no animal adulto (Levine, 1994).

A manipulação neonatal, que é um procedimento aparentemente não-estressante ao animal, tem como conseqüência, na vida adulta, uma série de alterações comportamentais que se caracterizam, entre outras, por uma diminuição do medo a ambientes novos (Denenberg *et al.*, 1973; Smythe *et al.*, 1994). A partir desses trabalhos iniciou-se uma discussão em torno do período crítico do desenvolvimento do rato, o que levou a uma intensificação do estudo da estimulação neonatal.

Os padrões comportamentais alterados, na fase adulta, observadas no animal que sofreu manipulação neonatal, se caracterizam por uma interpretação inadequada do meio ambiente. Por exemplo, fêmeas que foram submetidas à estimulação neonatal aumentam o comportamento agressivo no período de lactação, durante o qual observa-se um aumento

significativo da atividade de morder o intruso. Apesar do intruso mostrar sinais claros de submissão, a fêmea residente insiste em atacá-lo (Padoin *et al.*, 1995). Além disso, machos e fêmeas estimulados no período neonatal apresentam um maior comportamento exploratório a ambientes novos e aproximam-se com maior freqüência de um estímulo potencialmente destrutivo, representado pelo gato (teste de campo aberto com a presença de um gato engaiolado no canto do aparato) ou pela altura (durante teste de labirinto em cruz elevado, permanecem mais tempo no braço aberto) (Meaney *et al.*, 1993). Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos na literatura em que ratos manipulados no período neonatal mostram uma diminuição do medo em ambientes novos (Meaney *et al.*, 1993; Padoin *et al.*, 2001). Além disso, diversas alterações reprodutivas foram demonstradas nos animais manipulados no período neonatal, como uma diminuição drástica da ovulação (Gomes *et al.*, 1999), uma menor secreção de estradiol, hormônio luteinizante e prolactina no proestro (Gomes *et al.*, 2005) e uma redução do comportamento sexual em machos e fêmeas (Padoin *et al.*, 2001). Sabe-se que esses animais quando adultos apresentam uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal, quando expostos a estímulos estressores (Levine, 1993). Assim, ratos manipulados no período neonatal apresentam uma secreção de corticosterona menor que animais não manipulados frente a novos estímulos estressantes (Levine, 1993; Meaney *et al.*, 1993). Possíveis diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central a mecanismos de retroalimentação negativa da supra-renal (Levine, 1994). Foi também demonstrado que ratos adultos manipulados precocemente têm uma maior densidade de receptores glicocorticóides no hipocampo, região conhecida por mediar os efeitos inibitórios dos glicocorticóides sobre a síntese de CRH pelos neurônios da região paraventricular do hipotálamo (PVN) (Meaney *et al.*, 1993; Saplosky, 1994). Postula-se que esta seria a causa das diferenças entre os animais manipulados e os não manipulados no período neonatal, quando submetidos ao estímulo estressor na vida adulta (Meaney *et al.*, 1994; Bhatnagar & Meaney, 1995).

Muitas questões sobre as alterações comportamentais e as reações ao estresse do animal adulto que foi submetido à estimulação neonatal ainda esperam respostas. Uma delas é saber qual ou quais sistemas neuromoduladores são afetados pela estimulação

durante o período neonatal, e que se mantêm alterados até a vida adulta, induzindo as mudanças neuroendócrinas e comportamentais observadas.

Outros estudos também demonstram que, juntamente com as alterações endócrinas, a manipulação neonatal pode produzir alterações estruturais estáveis, como a diminuição no número de neurônios encontrados em diferentes áreas do sistema nervoso central de ratos. Lucion e colaboradores (2003) observaram que a manipulação neonatal produziu uma redução no número de neurônios no *locus coeruleus* (LC) de ratos machos e fêmeas em diferentes idades (11, 27, 36 e 90 dias de vida). Ainda, na amígdala medial, a manipulação neonatal promove, em ratos machos e fêmeas, uma diminuição no número de neurônios aos 11 e aos 90 dias de idade, e no córtex frontal, uma diminuição no número de neurônios nas camadas 2 e 3 em ratos de 11 dias de idade de ambos os sexos (Lucion *et al.*, 1999). Mais recentemente, estudos realizados por Gomes e colaboradores (2006) demonstraram que a estimulação neonatal reduz a densidade de receptores para ang II na área pré-óptica medial e no PVN de ratas adultas manipuladas no período neonatal. Também foi demonstrado por Winkelmann-Duarte e colaboradores (2007) uma redução no número de células no PVN e no núcleo supra-óptico (SON) em fêmeas de 11 e 90 dias, mostrando que as alterações morfológicas observadas em fases iniciais persistem na vida adulta. Esse conjunto de dados indica que o sistema angiotensinérgico também pode ser afetado pelas variações precoces no ambiente dos animais, e que estas alterações são estáveis.

A ang II é um octapeptídeo envolvido em funções de regulação da pressão arterial, equilíbrio eletrolítico, hemodinâmica renal, controle da função reprodutiva através da regulação da secreção de hormônios da adeno-hipófise, entre outros (Saavedra, 1992). A ang II é o componente ativo do sistema renina-angiotensina (RAS), no qual a renina derivada do tecido renal cliva o angiotensinogênio derivado do tecido hepático e forma o decapeptídeo angiotensina I (ang I), o qual é convertido pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em diversos tecidos, em ang II (forma ativa) (Berry *et al.*, 2001). Além do mecanismo clássico do sistema renina-angiotensina periférico, está bem estabelecida a presença de diversos sistemas locais e, entre eles, um sistema renina-angiotensina central (Bickerton & Buckley, 1961).

A ang II exerce suas ações através de receptores que foram classificados farmacologicamente em dois subtipos, receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (Timmermans, 1993). Os

receptores de ang II estão amplamente distribuídos pelo SNC, incluindo núcleos caracteristicamente angiotensinérgicos como o órgão subfornicial (SFO) entre outros como o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o núcleo paraventricular (PVN) e o núcleo arqueado (ARQ) (Lenkei *et al.*, 1997). O SFO é um núcleo dos chamados órgãos circumventriculares, localizados fora da barreira hemato-encefálica, e que desempenham papel importante no controle de funções como a regulação da pressão arterial e do equilíbrio hídrico (Fitzsimons, 1998). Este núcleo apresenta uma alta densidade de receptores do tipo AT<sub>1</sub> de ang II (Lenkey *et al.*, 1997) e representa uma conexão direta entre os sistemas angiotensinérgicos periférico e central, já que ele responde à estimulação da ang II plasmática (Gross *et al.*, 1985). Além disso, outro núcleo de grande importância para o controle do equilíbrio hídrico e da ingestão de sódio é o MnPO (Fitzsimons, 1998), que também possui receptores do tipo AT<sub>1</sub> de ang II (Lenkei *et al.*, 1997) e recebe eferências do SFO, projetando depois para o PVN e núcleo supra-óptico (Lind *et al.*, 1985; Mckinley *et al.*, 2003).

O comportamento de ingestão hídrica é fundamental para a manutenção do equilíbrio das funções orgânicas e a ang II é um dos principais reguladores dessa função. Injeções intracerebroventriculares (ICV) de ang II provocam uma ingestão hídrica volumosa e que, em certas doses, pode acarretar o consumo de água de um dia inteiro nos 15 minutos subseqüentes à injeção (Fitzsimons, 1998). Além disso, o comportamento de ingestão hídrica sofre influência dos hormônios ovarianos e difere entre machos e fêmeas (Kinsley *et al.* 1999; Fitzsimons, 1998). A ingestão hídrica apresenta uma variação cíclica nas diferentes fases do ciclo estral da rata, com a menor ingestão ocorrendo no estro em comparação com as demais fases do ciclo estral (Findlay *et al.*, 1979). Considerando uma possível alteração no sistema angiotensinérgico em animais manipulados e sua devida importância na regulação do comportamento de ingestão hídrica, decidiu-se investigar tal comportamento nestes animais, assim como as respectivas concentrações de ang II plasmática, em ratos machos em condições basais.

Além do comportamento de ingestão hídrica, o equilíbrio hídrico de um organismo depende do funcionamento adequado do sistema renal. Em roedores, os rins e o trato urinário ainda são muito imaturos ao nascimento e, no caso dos ratos, o processo de nefrogênese se estende até o 18<sup>o</sup> dia pós-parto (Matsusaka *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004).

Sabe-se que o sistema renina-angiotensina (RAS) também está envolvido em processos de crescimento celular normais e alterados. O crescimento promovido pela ação da angiotensina tem sido demonstrado em várias células e tecidos (Chen *et al.*, 2004), incluindo células musculares lisas vasculares, células mesangiais glomerulares e células epiteliais tubulares (Oliverio *et al.*, 1997). Nos rins, todos os componentes do RAS (renina, angiotensinogênio e enzima conversora de angiotensina) e os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> para ang II são sintetizados localmente. Além disso, a expressão de todos os componentes do RAS nos rins pode ser detectada a partir de 12-17 dias de gestação e está aumentada em fetos e ratos neonatos em comparação aos ratos adultos (Gomez & Norwood, 1995). O crescimento renal, durante a nefrogênese, é caracterizado por uma proliferação celular ativa, acompanhada por uma ampla cascata apoptótica para eliminar as células não utilizadas. Além do seu clássico papel na regulação da pressão arterial, a ang II é também conhecida por ser um fator de crescimento. A ausência da estimulação promovida pelo receptor do tipo AT<sub>1</sub> poderia interferir no balanço entre proliferação celular/ apoptose através de diferentes vias (Chen *et al.*, 2004). Além dos efeitos de estimulação direta sobre o crescimento e proliferação celular, Nilsson e colaboradores (2000, 2003) demonstraram que a ang II também pode regular a síntese de outros fatores de crescimento que desempenham importantes funções no desenvolvimento renal normal, como o IGF-I (*Insulin-like Growth Factor- I*). Em apoio a esta idéia, o bloqueio farmacológico de receptores do tipo AT<sub>1</sub> em animais durante o período de nefrogênese produz anormalidades renais histológicas específicas, caracterizadas por atrofia de papilas associada à dilatação pélvica, aumento do volume intersticial acompanhado de fibrose e infiltrados de células inflamatórias e atrofia tubular. A vasculatura renal também parece ser afetada, caracterizada por arteríolas aferentes mais curtas e com espessamento anormal de suas paredes (Tufro-McReddie *et al.*, 1995). Por meio do mesmo bloqueio farmacológico de receptores AT<sub>1</sub>, Friberg e colaboradores (1994) demonstraram alterações na função renal, além por aumento considerável na ingestão hídrica e no volume urinário, acompanhados por uma redução de aproximadamente 50% na osmolaridade da urina. Esta redução na osmolaridade da urina persistiu mesmo após 36 horas de privação hídrica e da administração de 1-desamino-8-D-arginina vasopressina, indicando que a dificuldade na concentração de urina foi de origem renal (Guron *et al.* 1999). As anormalidades no manejo hídrico são coerentes com a atrofia

papilar observada, a qual dificulta a eficiência do sistema de contra-corrente por multiplicação, reduzindo a reabsorção tubular de água nos ductos coletores medulares.

Alterações similares na morfologia e função renal ocorrem também em ratos com a inativação específica de genes que decodificam renina, angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina (ECA), ou receptores dos tipos AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub> (Yanai *et al.*, 2000; Niimura *et al.*, 1995; Esther *et al.*, 1996; Tsuchida *et al.*, 1998). Além disso, ratos mutantes sem o receptor AT<sub>1</sub> de ang II no período neonatal, apresentam alterações similares às encontradas nos ratos sem o gene para o angiotensinogênio. Esses animais apresentam defeitos na formação da pelve renal e um desenvolvimento anormal da musculatura lisa do ureter, diminuindo o movimento peristáltico que impulsiona a urina e gerando uma pressão retrógrada aumentada que é lesiva ao parênquima renal.

Juntos, estes resultados claramente indicam que um RAS intacto é um pré-requisito para um desenvolvimento renal normal (Chen *et al.*, 2004). Outro fator importante é que essas alterações não são tão evidentes no momento do nascimento, evidenciando um papel da ang II durante a maturação do sistema renal no período neonatal. No entanto, ratos que não possuem o receptor AT<sub>2</sub> não apresentam essas alterações, evidenciando o papel do receptor AT<sub>1</sub> nesses mecanismos. De uma forma geral, esse conjunto de dados indica que alterações do sistema angiotensinérgico no período pós-natal levam a modificações estruturais permanentes nos rins (Matsusaka *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório por Donadio e colaboradores (2006) demonstraram ausência de lesões no tecido renal como possível conseqüência da estimulação neonatal e seu respectivo impacto sobre o sistema angiotensinérgico. No entanto, no presente estudo, ainda julgou-se pertinente avaliar aspectos morfológicos destes órgãos, como a espessura da área cortical.

Baseado nesse conjunto de dados, o presente trabalho tem por objetivo investigar os efeitos da manipulação neonatal sobre o sistema angiotensinérgico e suas repercussões sobre aspectos da regulação hídrica, da função e do desenvolvimento renal, em ratos.

## **2- HIPÓTESE**

Considerando-se que os eventos ambientais que ocorrem no período neonatal produzem efeitos sobre aspectos comportamentais e neuroendócrinos e que estes manifestam-se na vida adulta, levantou-se a hipótese de que a manipulação neonatal também possa exercer efeitos sobre os mecanismos envolvidos na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, tais como o comportamento de ingestão hídrica e a função renal. Ainda, que o sistema angiotensinérgico esteja envolvido na gênese dessas alterações, possivelmente manifestando-se através de modificações nas concentrações plasmáticas de Angiotensina II, um dos principais hormônios envolvidos na regulação do equilíbrio hídrico.

### **3- OBJETIVO**

#### **3.1- Objetivo geral:**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da manipulação neonatal sobre o sistema angiotensinérgico e suas repercussões sobre a regulação do equilíbrio hídrico em ratos machos filhotes e adultos.

#### **3.2- Objetivos específicos:**

- 1- Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas basais de angiotensina II e corticosterona em ratos de diferentes idades.
- 2- Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre a ingestão hídrica basal e a função renal em diferentes idades.
- 3- Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre o desenvolvimento corporal, desenvolvimento renal e das glândulas supra-renais nas diferentes idades.
- 4- Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre a morfologia renal.

## 4- MATERIAL E MÉTODO

### 4.1- Animais

Fêmeas Wistar prenhas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram mantidas em caixas plásticas de 40 x 34 x 18 cm, no ratário do laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, com temperatura controlada (~22<sup>o</sup>), ciclo claro/escuro (6:00 às 18:00 claro / 18:00 às 6 escuro) e livre acesso à água e ração. Após vinte e quatro horas do nascimento dos filhotes, o que foi considerado como o primeiro dia de vida, as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes cada, e separadas em dois grupos: manipulados e não-manipulados. No grupo não-manipulado, o processo de padronização das ninhadas consistiu na retirada aleatória do número de filhotes necessário para que permanecessem oito filhotes em cada ninhada. No grupo manipulado, houve a retirada de fêmeas para atingir o número de oito filhotes em cada ninhada, dando preferência à permanência de machos (objeto do presente estudo). Durante o período neonatal do grupo não-manipulado apenas os procedimentos de reposição de água e ração foram realizados, enquanto que no grupo manipulado, a estimulação sensorial tátil (manipulação) foi realizada durante os dez primeiros dias após o nascimento.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH), e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.

### 4.2- Manipulação Neonatal

A manipulação foi realizada em sala anexa ao ratário. Para este procedimento, retirava-se a mãe da caixa e todos os filhotes eram manipulados por um minuto. A seguir, a mãe dos filhotes retornava à caixa-residência e esta era recolocada no ratário. Este procedimento foi iniciado após 24h do nascimento dos filhotes (1<sup>o</sup> dia) e seguiu diariamente até o 10<sup>o</sup> dia.

### **4.3- Grupos Experimentais**

Setenta ninhadas foram divididas, logo após o nascimento, em dois grupos: manipulado (M) e não-manipulado (NM). Cada um dos grupos M e NM foram subdivididos em três grupos, correspondendo às três idades analisadas: 11, 45 e 90 dias de idade (11M, 11NM, 45M, 45NM, 90M e 90 NM).

### **4.4- Coleta de dados**

Após o período correspondente à manipulação neonatal (10 primeiros dias de vida), 2 machos de cada ninhada eram retirados para verificação do peso corporal, decapitação para coleta de sangue ("pool" de plasma de 2 animais), seguido de retirada e pesagem dos rins e glândulas supra-renais em balança eletrônica. A ninhada seguia até os 21 dias, quando ocorria o desmame, retirando-se as mães da caixa-residência e separando os filhotes conforme o sexo. Apenas machos foram utilizados neste estudo, de modo que os filhotes machos seguiram sendo utilizados após o desmame. As mães e as fêmeas descartadas no desmame eram reconduzidas ao biotério do ICBS, onde foram descartadas segundo procedimento padrão. Aos 45 dias, retirou-se 1 macho de cada colônia (cada colônia correspondia aos animais de uma ninhada), os quais foram colocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 horas para a quantificação da água ingerida e do volume urinário excretado. Passado o período de 24 horas, os animais eram retirados das gaiolas metabólicas, pesados e decapitados para coleta de sangue, seguido de retirada e pesagem de rins e glândulas supra-renais. O mesmo procedimento foi aplicado aos animais remanescentes de cada colônia, quando estes completavam 90 dias de vida.

O sangue coletado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada e o plasma foi armazenado em freezer -70°C para posteriores dosagens hormonais. Os rins, após retirados e pesados, foram fixados por 48 horas em paraformaldeído a 8%, seguidos de emblocamento em parafina para posterior análise morfológica. A urina coletada após 24 horas foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos e armazenada em freezer -70°C para posterior análise da função renal.

#### **4.5- Função Renal**

A creatinina sérica foi mensurada através do método de Jaffe, utilizando-se kit comercial Labtest (Labtest Diagnostica - Minas Gerais, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A creatinina urinária foi mensurada utilizando-se o mesmo kit comercial Labtest, como descrito para mensuração da creatinina sérica. A taxa de filtração glomerular foi calculada através da depuração da creatinina utilizando-se a seguinte fórmula:  $(\text{creatinina urinária} \times \text{creatinina sérica}) / (\text{volume urinário} \times 1440)$ .

#### **4.6- Relação peso renal/ peso corporal**

Para estabelecer a relação entre o peso renal e o peso corporal, os animais foram pesados antes da coleta de sangue por decapitação. Após, os rins foram retirados e pesados em balança eletrônica. Foi utilizada a seguinte relação:  $\text{peso renal} / \text{peso corporal} \times 100$ .

#### **4.7- Análise morfológica**

Os rins extraídos dos animais após decapitação sofreram secção em plano coronal na sua porção média (hilo) e fixados em paraformaldeído a 8% durante 24 horas. Após, foram emblocados em parafina conforme protocolo padrão. Foram cortados em micrótomo rotativo de parafina a partir da secção coronal, em cortes com espessura de 10 $\mu$ m. A seguir, foram corados com eosina-hematoxilina, segundo protocolo de coloração.

As imagens do primeiro corte foram capturadas com ampliação de 40x por microscópio óptico (Olympus BX 40f-3) e pelo programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) e a seguir, com as ferramentas deste mesmo programa, foi realizada a mensuração da espessura da área cortical renal. O valor utilizado (expresso em micrômetros) foi a média de um total de 4 mensurações realizadas em distintas partes de cada corte.

#### **4.8- Dosagens Hormonais**

A dosagem de angiotensina II plasmática foi realizada pelo Teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), com Angiotensin II – EIA kit (Peninsula Laboratories Inc. – San Carlos, USA), concentração mínima detectável de 0,02-0,04 ng/mL. Os procedimentos foram realizados conforme orientação do fabricante.

A dosagem de corticosterona foi realizada por radioimunoensaio, utilizando-se padrão e anticorpo específicos adquiridos da Sigma (USA) e corticosterona triciada adquirida da Amersham (USA). A separação das frações livre e ligada foi realizada com utilização de carvão-dextran (0,5/ 0,05%). Antes do radioimunoensaio, amostras de plasma (25µL) foram colocadas em tubos individuais, aos quais adicionou-se etanol (1mL). Para extração de corticosterona, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, sob refrigeração (4°C), a 2000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes foram vertidos para outros tubos para o processo de liofilização. O material seco foi armazenado a -20°C até a realização do radioimunoensaio, quando foi ressuspense em 500µL de tampão fosfato. As amostras de um mesmo experimento foram dosadas no mesmo ensaio. O erro intra-ensaio foi de 5%, com concentração mínima detectável de 0,8ng/mL.

#### **4.9- Análise Estatística**

Para testarmos o efeito da estimulação neonatal nas diferentes idades sobre o peso corporal, peso renal, peso das glândulas supra-renais, ingestão hídrica de 24h, volume urinário, taxa de filtração glomerular e concentrações plasmáticas de angiotensina II e corticosterona, foi utilizado teste *t* de Student para dados paramétricos. Para analisarmos as concentrações hormonais entre indivíduos de diferentes idades, porém pertencentes ao mesmo grupo, foi utilizada a análise de variância de uma via (One-way ANOVA) seguido de pós-teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism® versão 4.

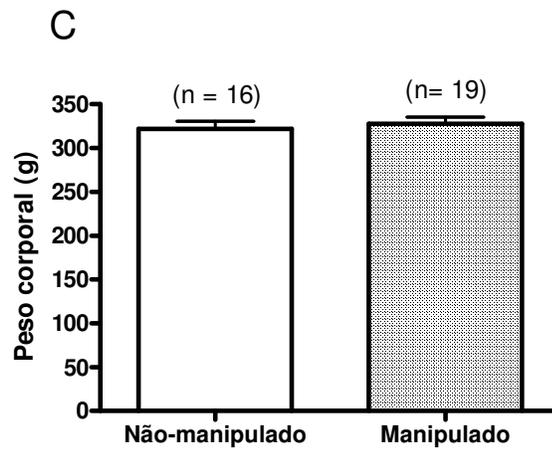
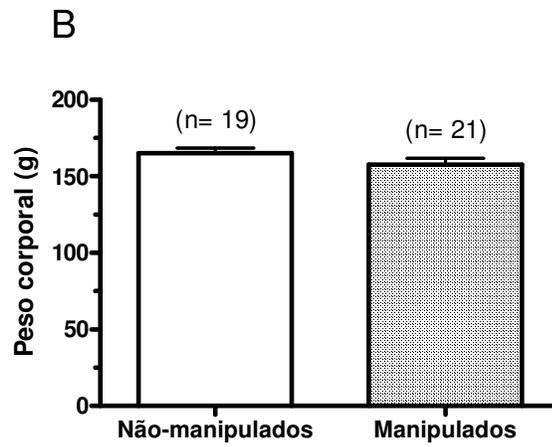
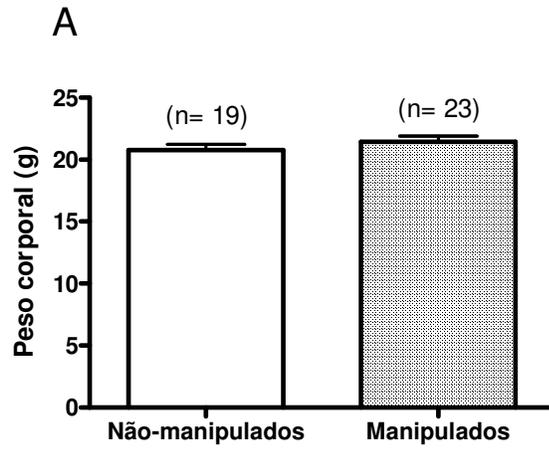
Os resultados obtidos são expressos em média ± EPM (erro padrão da média), sendo adotado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5 - RESULTADOS

Os resultados obtidos com os seis diferentes grupos (11NM, 11M, 45NM, 45M, 90NM, 90M) são expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

### 5.1- Peso corporal

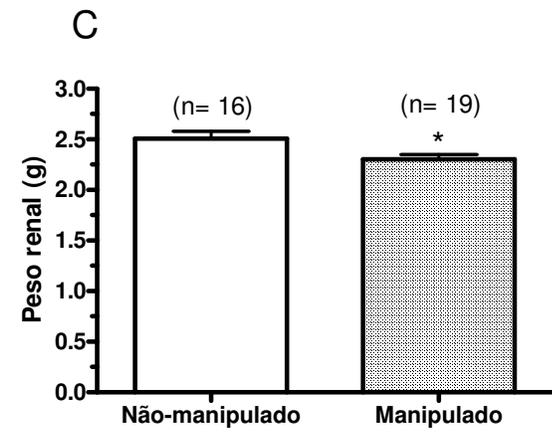
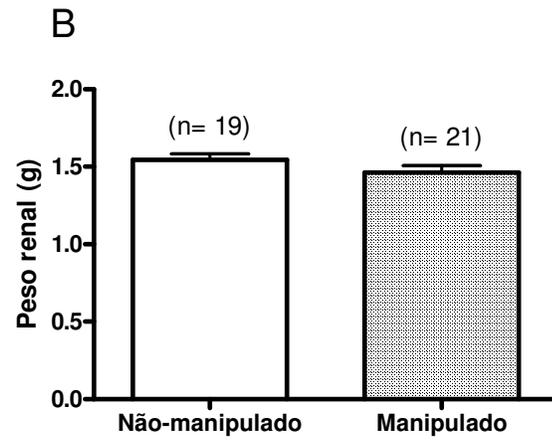
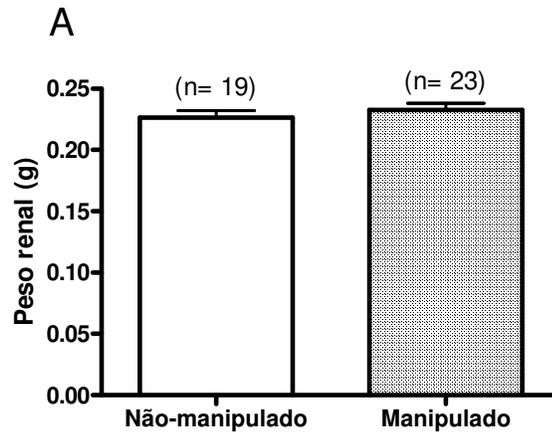
Aos 11 dias de idade, os animais manipulados e não manipulados não apresentaram diferenças no peso corporal (11NM:  $20,76 \pm 0,49g$  vs 11M:  $21,46 \pm 0,44g$ ). Aos 45 dias de idade também não houve diferença entre os grupos (45NM:  $165 \pm 3,4g$  vs 45M:  $158 \pm 4,1g$ ), o mesmo tendo sido observado nos animais de 90 dias de idade, entre os diferentes grupos (90NM:  $322 \pm 8,76g$  vs 90M:  $328 \pm 7,56g$ ), (Fig. 1).



**Figura 1:** Peso corporal de animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 11 dias; B: animais de 45 dias; C: animais de 90 dias.

## 5.2- Peso renal

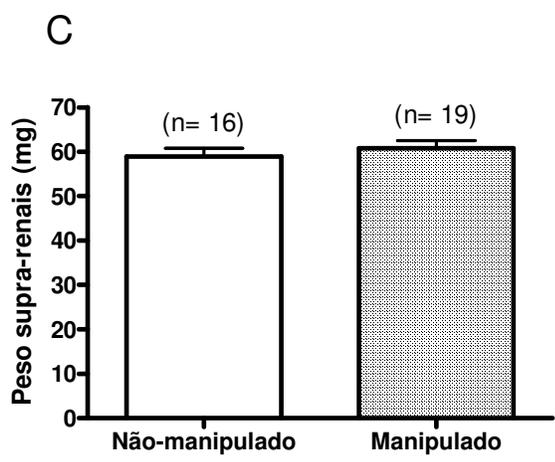
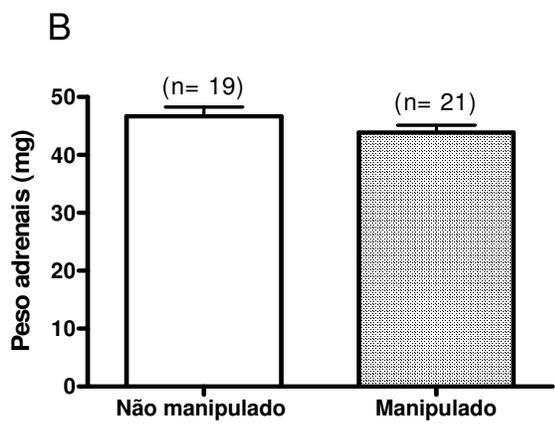
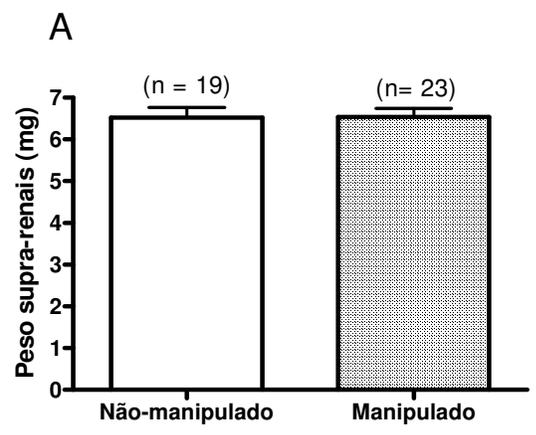
Os animais de 11 dias não apresentaram diferenças no peso dos dois rins (11NM:  $0,23 \pm 0,01\text{g}$  vs 11M:  $0,23 \pm 0,01\text{g}$ ) após a manipulação. Também não foi observada diferença de peso renal nos animais de 45 dias (45NM:  $1,54 \pm 0,04\text{g}$  vs 45M:  $1,46 \pm 0,05\text{g}$ ). Aos 90 dias, foi observada redução significativa ( $p < 0,05$ ) no peso renal total nos animais manipulados em relação aos não-manipulados (90NM:  $2,51 \pm 0,07\text{g}$  vs 90M:  $2,30 \pm 0,05\text{g}$ ), (Fig. 2).



**Figura 2:** Peso renal entre animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 11 dias; B: animais de 45 dias; C: animais de 90 dias. \*  $p < 0,05$ .

### **5.3- Peso das glândulas supra-renais**

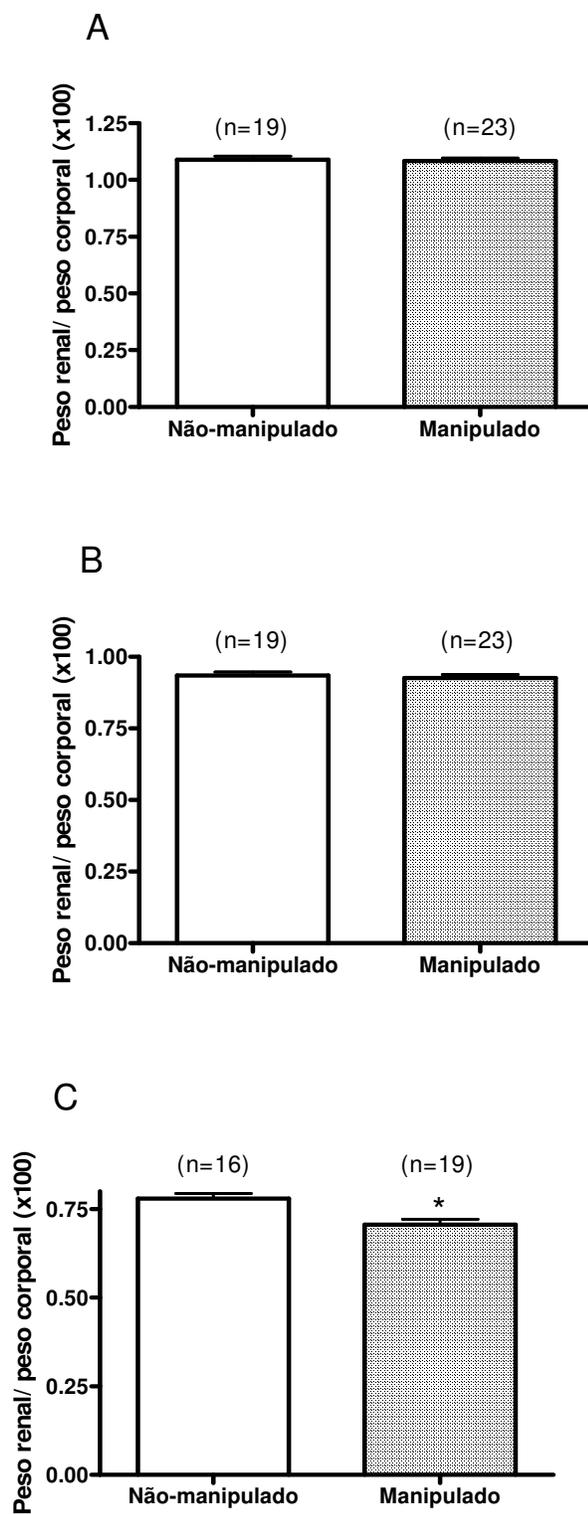
Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos manipulado e não-manipulado nas diferentes idades analisadas (11NM:  $6,5 \pm 0,2\text{mg}$  vs 11M:  $6,5 \pm 0,2\text{mg}$ ); (45NM:  $46,7\text{mg} \pm 1,6$  vs 45M:  $43,9 \pm 1,3 \text{ mg}$ ); (90NM:  $58,88 \pm 1,88\text{mg}$  vs 90M:  $60,75 \pm 1,73 \text{ mg}$ ), (Fig. 3).



**Figura 3:** Peso das glândulas supra-renais em animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 11 dias; B: animais de 45 dias; C: animais de 90 dias.

#### **5.4- Relação entre peso renal e peso corporal**

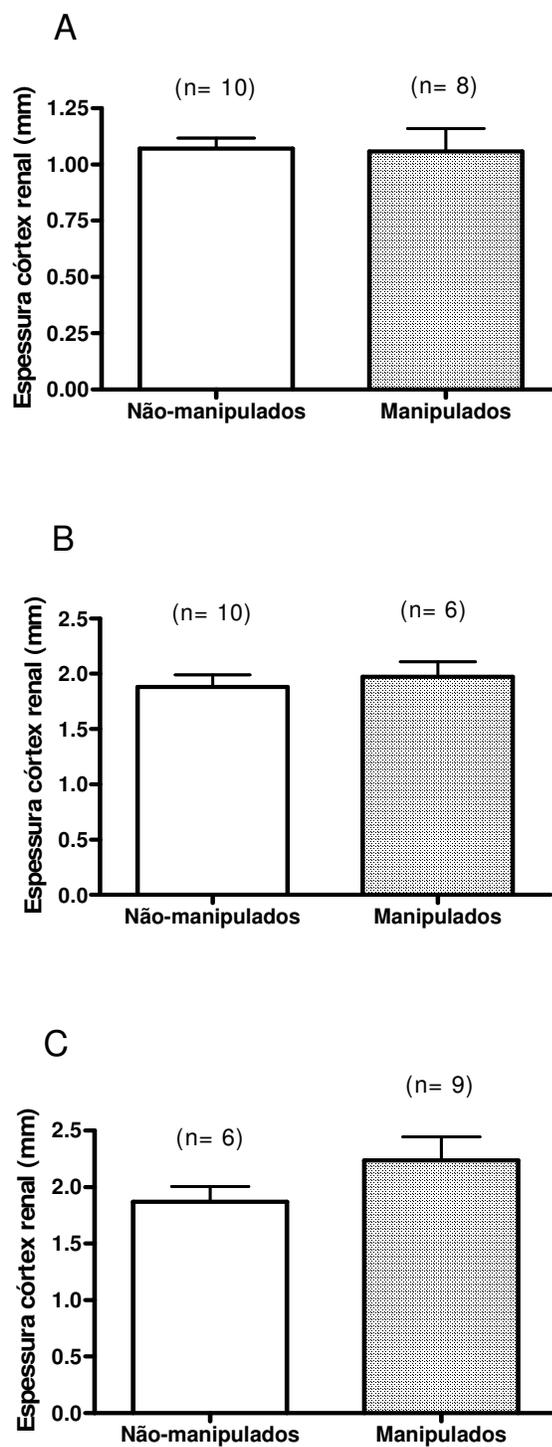
Não foram observadas diferenças significativas entre os animais dos grupos não-manipulado e manipulado de 11 dias (11NM:  $1.1 \pm 0,014$  vs 11M:  $1.1 \pm 0,013$ ) e de 45 dias (45NM:  $0,93 \pm 0,013$  vs 45M:  $0,93 \pm 0,012$ ). Nos animais de 90 dias, o grupo manipulado apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) na relação peso renal/ peso corporal (90NM:  $0,78 \pm 0,014$  vs 90M:  $0,71 \pm 0,015$ ), (Fig. 4).



**Figura 4:** Média da relação peso renal/ peso corporal (x100) de animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 11 dias; B: animais de 45 dias; C: animais de 90 dias. \*  $p < 0,05$ .

### **5.5- Medida da espessura do córtex renal**

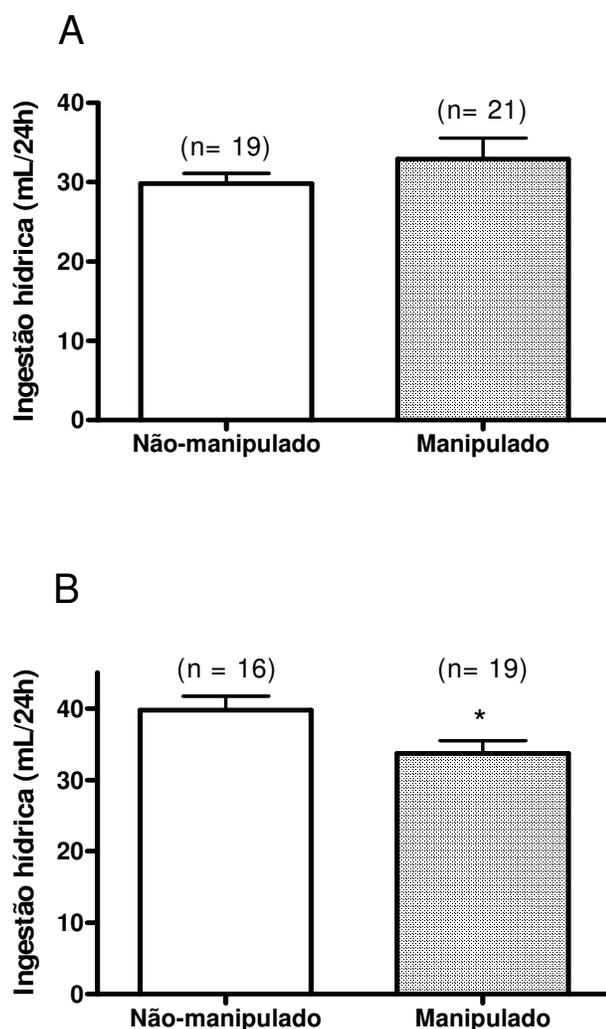
Não foram observadas diferenças significativas na espessura de córtex renal entre animais manipulados e não-manipulados nas diferentes idades analisadas (11NM:  $1.1 \pm 0,47\text{mm}$  vs 11M:  $1,1 \pm 0,1\text{mm}$ ); (45NM:  $1,9 \pm 0,11\text{mm}$  vs 45M:  $2,0 \pm 0,13\text{mm}$ ); (90NM:  $1,9 \pm 0,13\text{mm}$  vs 90M:  $2,2 \pm 0,21\text{mm}$ ), (Fig. 5).



**Figura 5:** Média da espessura do córtex renal em animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 11 dias; B: animais de 45 dias; C: animais de 90 dias.

## 5.6- Ingestão hídrica basal (24h)

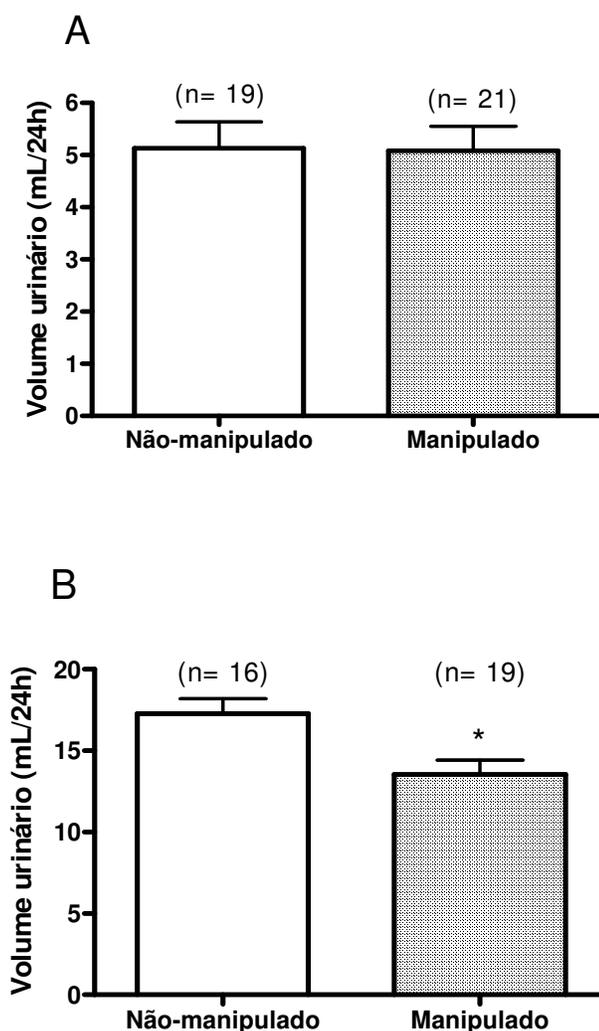
A análise de ingestão hídrica basal foi realizada nos animais de 45 e 90 dias de idade, dos diferentes grupos experimentais (manipulados e não-manipulados). Aos 45 dias não houve diferença entre os grupos (45NM:  $29,8 \pm 1,3\text{mL}$  vs 45M:  $32,9 \pm 2,7\text{mL}$ ). Porém, aos 90 dias de idade foi observada diferença, a qual apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) da ingestão hídrica basal nos animais manipulados (90NM:  $39,75 \pm 1,97\text{mL}$  vs 90M:  $33,68 \pm 1,82\text{mL}$ ), (Fig. 6).



**Figura 6:** Média da ingestão hídrica basal de 24h de animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 45 dias; B: animais de 90 dias. \* $p < 0,05$ .

### 5.7- Volume urinário (24h)

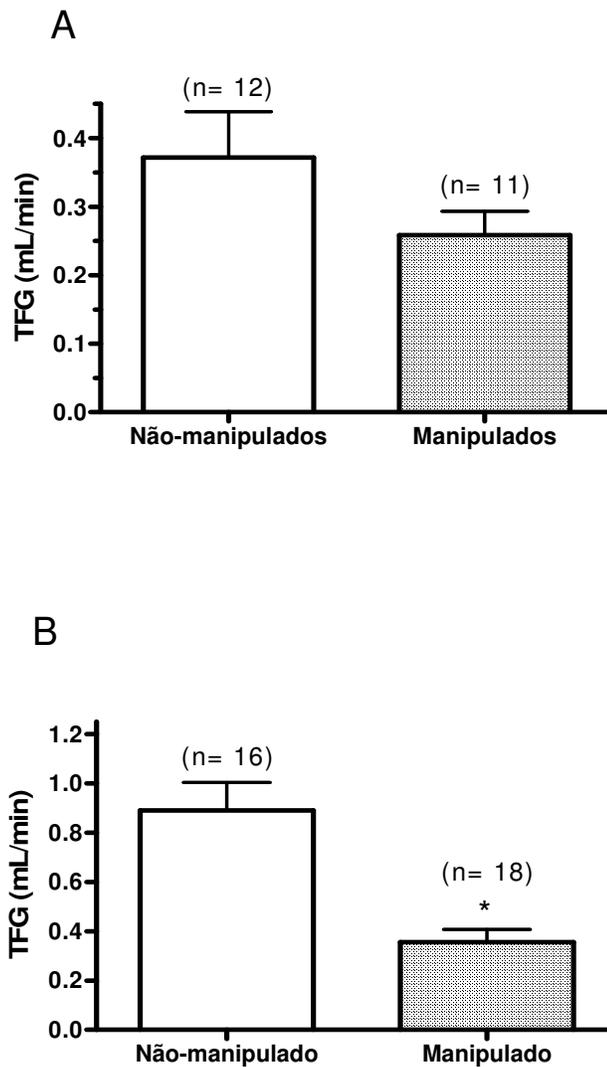
A análise do volume urinário foi realizada nos animais de 45 e 90 dias de idade, dos diferentes grupos experimentais (manipulado e não-manipulado). Nos animais de 45 dias não foi observada diferença no volume de urina excretado (45NM:  $5,1 \pm 2,2\text{mL}$  vs 45M:  $5,1 \pm 2,1\text{mL}$ ). Porém, nos animais de 90 dias de idade, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) do volume urinário excretado pelos animais do grupo manipulado (90NM:  $17,27 \pm 0,92\text{mL}$  vs 90M:  $13,55 \pm 0,88\text{mL}$ ), (Fig. 7).



**Figura 7:** Média do volume urinário de 24h de animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 45 dias; B: animais de 90 dias. \* $p < 0,05$ .

## 5.8- Taxa de filtração glomerular (TFG)

Os animais de 45 dias não apresentaram diferenças significativas na taxa de filtração glomerular (45NM:  $0,37 \pm 0,07$  mL/min vs 45M:  $0,26 \pm 0,04$  mL/min). Os animais de 90 dias apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na taxa de filtração glomerular, evidenciada por uma redução no grupo manipulado (90NM:  $0,89 \pm 0,11$  mL/min vs 90M:  $0,36 \pm 0,05$  mL/min), (Fig 8).

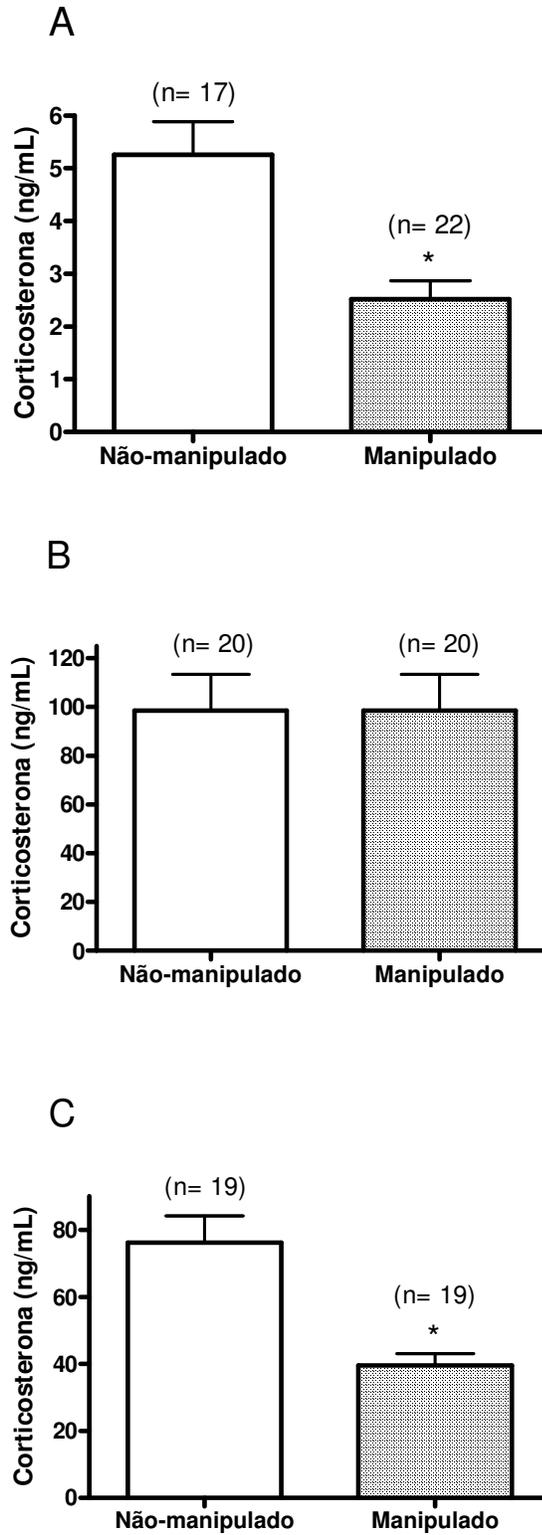


**Figura 8:** Taxa de filtração glomerular (TGF) de animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 45 dias; B: animais de 90 dias. \* $p < 0,05$ .

## **5.9 - Dosagens hormonais**

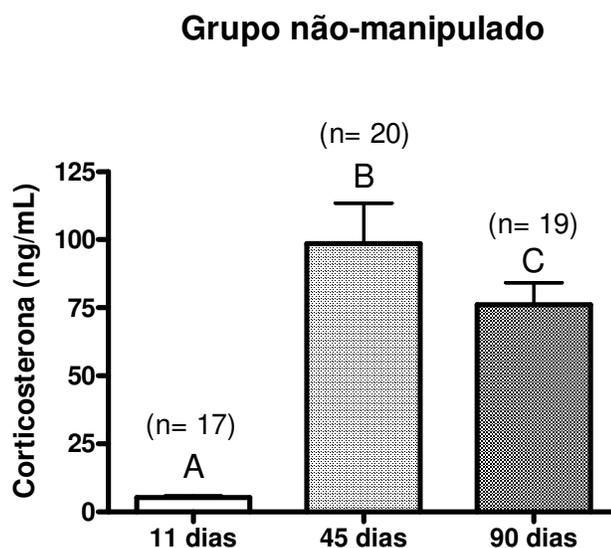
### **5.9.1 – Corticosterona**

Nos animais de 11 dias de idade, observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração plasmática de corticosterona nos animais manipulados (11NM:  $5,26 \pm 0,58$  ng/mL vs 11M:  $2,52 \pm 0,35$  ng/mL). Nos animais de 45 dias, não foi observada diferença entre os grupos (45NM:  $98,61 \pm 14,77$  ng/mL vs 45M:  $110,00 \pm 12,20$  ng/mL). Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais de 90 dias, nos quais o grupo manipulado apresentou redução da concentração plasmática de corticosterona em comparação aos animais não-manipulados (90NM:  $76,14 \pm 8,06$  ng/mL vs 90M:  $39,46 \pm 3,52$  ng/mL).



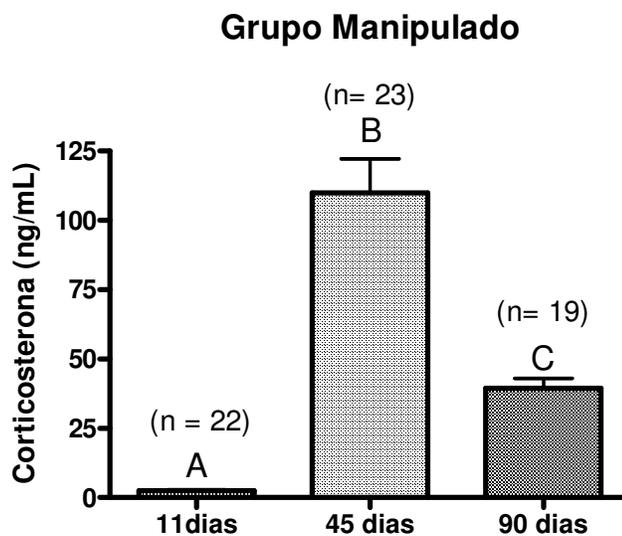
**Figura 9:** Concentrações de corticosterona plasmática (ng/mL) em animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 11 dias; B: animais de 45 dias; C: animais de 90 dias. \*  $p < 0,05$ .

Ao analisarmos as concentrações plasmáticas de Corticosterona nos animais do grupo não-manipulado entre as diferentes idades, observamos diferenças significativas através da ANOVA de 1 via [ $F(2,55) = 21$ ,  $P = 0,0001$ ]. Foi demonstrado um aumento significativo comparando-se os grupos de 90 ( $76,14 \pm 8,06\text{ng/mL}$ ) e 45 dias ( $98,61 \pm 14,77\text{ng/mL}$ ) com o grupo de 11 dias ( $5,26 \pm 0,58\text{ng/mL}$ ) ( $p < 0,001$ ). Além disso, também foi demonstrada uma redução nos animais de 90 dias quando comparado aos de 45 dias ( $p < 0,05$ ) (Fig. 10).



**Figura 10:** Concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/mL) em animais do grupo não-manipulado, em diferentes idades. Letras diferentes indicam diferenças significativas.  $A \neq B$  e  $C$  ( $p < 0,001$ ) e  $B \neq C$  ( $p < 0,05$ ).

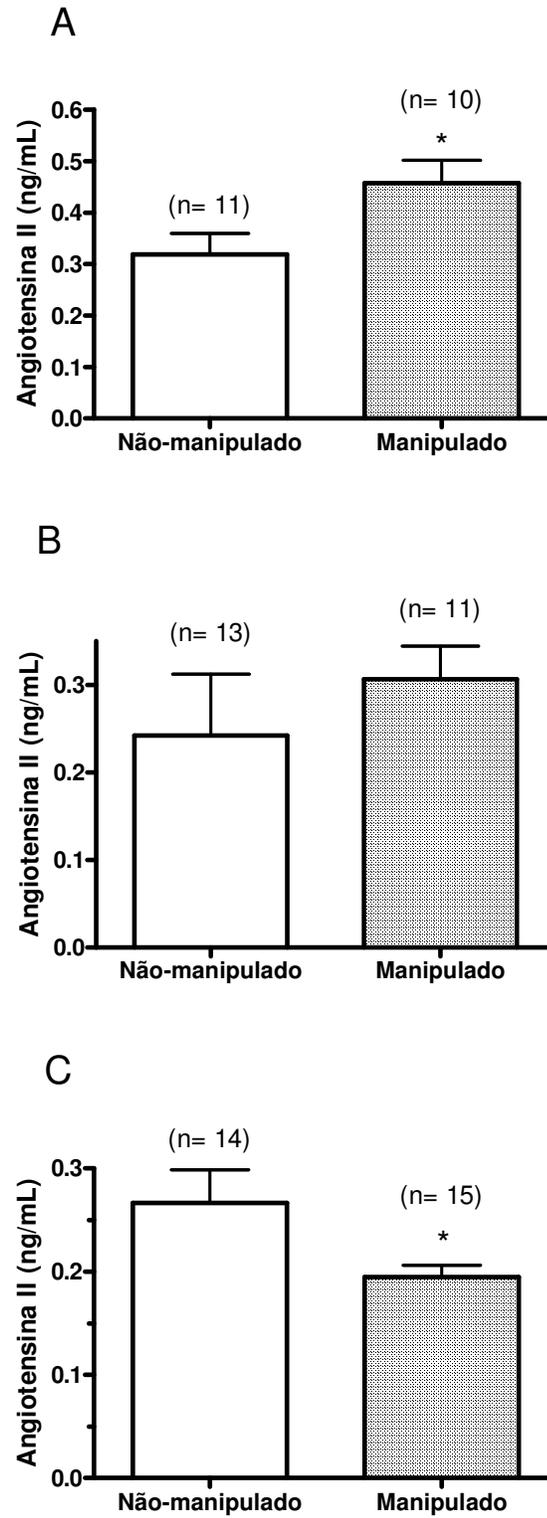
Através da ANOVA de 1 via também observamos diferenças nas concentrações plasmáticas de corticosterona nos animais manipulados entre as diferentes idades [F(2,63)= 51, P= 0,0001]. Observamos um aumento significativo comparando-se os animais de 90 dias ( $39,46 \pm 3,52\text{ng/ml}$ ) ( $p < 0,01$ ) e 45 dias ( $110 \pm 12,2\text{ng/mL}$ ) ( $p < 0,001$ ) com os animais de 11 dias ( $2,52 \pm 0,35\text{ng/mL}$ ). Houve também diferenças entre os animais de 90 e 45 dias ( $p < 0,001$ ), (Fig 11).



**Figura 11:** Concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/mL) em animais do grupo manipulado, em diferentes idades. Letras diferentes indicam diferenças significativas. A  $\neq$  B ( $p < 0,001$ ) e C ( $p < 0,01$ ). B  $\neq$  C ( $p < 0,001$ ).

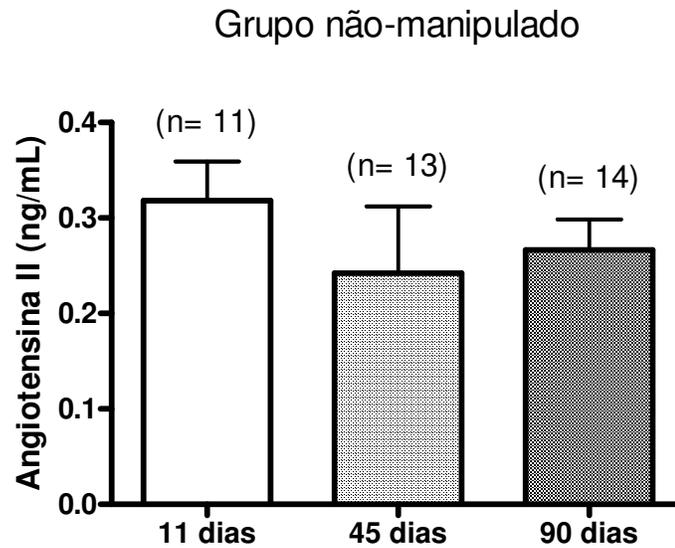
### **5.9.2- Angiotensina II**

Os animais de 11 dias do grupo manipulado apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração plasmática de ang II em comparação ao grupo não-manipulado (11NM:  $0,32 \pm 0,04$  ng/mL vs 11M:  $0,46 \pm 0,04$  ng/mL). O contrário foi observado nos animais de 90 dias, nos quais houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo manipulado (90NM:  $0,27 \pm 0,03$  ng/mL vs 90M:  $0,19 \pm 0,05$  ng/mL). Nos animais de 45 dias não foi observada diferença entre os grupos (45NM:  $0,24 \pm 0,07$  ng/mL vs 45M:  $0,31 \pm 0,04$  ng/mL), (Fig 12).



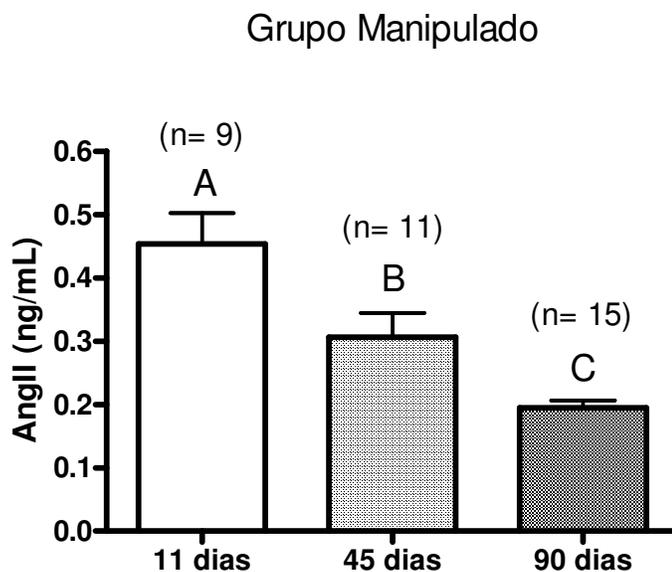
**Figura 12:** Concentrações plasmáticas de angiotensina II (ng/mL) em animais manipulados e não-manipulados. A: animais de 11 dias; B: animais de 45 dias, C: animais de 90 dias. \*  $p < 0,05$ .

Ao analisarmos as concentrações plasmáticas de ang II nos animais do grupo não-manipulado, entre as diferentes idades, não observamos diferenças significativas através da ANOVA de 1 via [ $F(2, 37) = 0,055, P = 0,58$ ], (Fig. 13).



**Figura 13:** Concentrações plasmáticas de angiotensina II em animais do grupo não manipulado, entre as diferentes idades.

Ao utilizarmos a ANOVA de 1 via para analisarmos as diferenças de concentração plasmática de ang II, encontramos diferenças significativas [ $F(2,34)= 17$ ,  $P= 0,0001$ ] entre as diferentes idades dos animais do grupo manipulado. Houve uma redução a partir dos 11 dias ( $0,46 \pm 0,04\text{ng/mL}$ ) até os 45 dias ( $0,31 \pm 0,03\text{ng/mL}$ ) ( $p < 0,05$ ), e deste para os 90 dias ( $0,19 \pm 0,05$ ) ( $p < 0,05$ ), (Fig. 14).



**Figura 14:** Concentrações plasmáticas de angiotensina II em animais do grupo manipulado, entre as diferentes idades. Letras diferentes indicam diferenças significativas.  $A \neq B$  ( $p < 0,05$ ) e  $C$  ( $p < 0,001$ ).  $B \neq C$  ( $p < 0,05$ ).

## 5- RESUMO DOS RESULTADOS

Abaixo, são apresentados os resumos dos resultados obtidos para as análises realizadas em animais das diferentes idades estudadas, grupos não manipulado e manipulado (tabelas 1, 2 e 3). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM, e analisadas através de teste *t* de Student. A significância aceita é de  $p \leq 0,05$ .

**Tabela 1:** Resumo dos resultados obtidos em animais de 11 dias.

Animais de 11 dias	Não manipulado	Manipulado
Peso corporal (g)	20,45 $\pm$ 0,49	21,46 $\pm$ 0,44
Peso renal (g)	0,23 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01
Peso renal/peso corporal (x100)	1,09 $\pm$ 0,27	1,08 $\pm$ 0,27
Peso supra-renais (mg)	6,5 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,2
Corticosterona (ng/mL)	5,26 $\pm$ 0,58	2,52 $\pm$ 0,35 *
Angiotensina II (ng/mL)	0,32 $\pm$ 0	0,46 $\pm$ 0,04 *

**Tabela 2:** Resumo dos resultados obtidos em animais de 45 dias.

Animais de 45 dias	Não manipulado	Manipulado
Peso corporal (g)	1,65 $\pm$ 3,4	1,58 $\pm$ 4,1
Peso renal (g)	1,54 $\pm$ 0,04	1,46 $\pm$ 0,05
Peso supra-renais (mg)	46,7 $\pm$ 1,6	43,9 $\pm$ 1,3
Peso renal/ peso corporal (x100)	0,93 $\pm$ 0,24	0,93 $\pm$ 0,23
Ingestão Hídrica (mL)	29,8 $\pm$ 1,3	32,9 $\pm$ 2,7
Volume urinário (mL)	8,1 $\pm$ 0,5	8,1 $\pm$ 0,7
TFG (mL/min)	0,37 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,04
Corticosterona (ng/mL)	98,61 $\pm$ 14,77	110,00 $\pm$ 12,20
Angiotensina II (ng/mL)	0,24 $\pm$ 0,07	31,1 $\pm$ 0,04

**Tabela 3:** Resumo dos resultados obtidos em animais de 90 dias.

Animais de 90 dias	Não manipulado	Manipulado
Peso corporal (g)	322 ± 8,76	328 ± 7,5
Peso renal (g)	2,51 ± 0,07	2,30 ± 0,0 *
Peso supra-renais (mg)	58,8 ± 1,88	60,75 ± 1,73
Peso renal/ peso corporal (x100)	0,78 ± 0,20	0,71 ± 0,18 *
Ingestão Hídrica (mL)	39,75 ± 1,97	33,68 ± 1,82 *
Volume urinário (mL)	17,27 ± 0,92	13,65 ± 0,88 *
TFG (mL/min)	0,89 ± 0,11	0,36 ± 0,05 *
Corticosterona (ng/mL)	76,14 ± 8,6	39,46 ± 3,52 *
Angiotensina II (ng/mL)	0,27 ± 0,03	0,19 ± 0,05 *

As tabelas 4 e 5 apresentam o resumo das diferenças encontradas nas concentrações plasmáticas de ang II e corticosterona entre os animais do grupo não-manipulado e manipulado, nas diferentes idades. Todos os resultados foram expressos como média ± EPM, e analisadas por análise de variância de uma via (one-way ANOVA). A significância aceita é de  $p \leq 0,05$ .

**Tabela 4:** Resumo das concentrações hormonais dos animais do grupo não-manipulado, em diferentes idades. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Idade (dias)	11	45	90
Ang II (ng/mL)	0,32 ± 0,04	0,24 ± 0,07	0,27 ± 0,03
Corticosterona (ng/mL)	5,26 ± 0,58 <sup>a</sup>	98,61 ± 14,77 <sup>b</sup>	76, 14 ± 8,06 <sup>c</sup>

**Tabela 5:** Resumo das concentrações hormonais do grupo manipulado, entre as diferentes idades. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Idade (dias)	11	45	90
Ang II (ng/mL)	0,45 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,05 <sup>c</sup>
Corticosterona (ng/mL)	2,52 ± 0,35 <sup>a</sup>	110,0 ± 12,20 <sup>b</sup>	39,46 ± 3,52 <sup>c</sup>

## 7- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que um evento ambiental que produz uma ruptura na relação mãe-filhote, representado pela manipulação diária por 1 minuto, pode, na vida adulta, provocar alterações nos mecanismos envolvidos na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, que estão associados às modificações no sistema angiotensinérgico e na função renal na vida adulta.

Os animais que foram expostos à manipulação neonatal apresentaram redução da ingestão hídrica, do volume urinário, do peso renal, da taxa de filtração glomerular (TFG) e também redução nas concentrações plasmáticas de ang II e corticosterona., quando adultos

Uma das alterações possivelmente induzidas pela manipulação neonatal, também analisadas neste estudo, foi a influência sobre o ganho de peso corporal durante o desenvolvimento dos animais. Estudos prévios têm demonstrado que a manipulação neonatal não exerce influência sobre o peso corporal (Young, 2000; Silveira *et al.* 2006; Winkelmann-Duarte *et al.*, 2007), embora Gonzalez e colaboradores (1990) tenham demonstrado um aumento de peso corporal em animais manipulados. Os resultados do presente estudo demonstraram que a estimulação neonatal não produziu diferenças de peso corporal nos diferentes grupos estudados, nas diferentes idades analisadas.

Com relação à função renal, o parâmetro adotado para analisá-la foi o cálculo da taxa de filtração glomerular (TFG) e o volume de urina excretado em 24h, os quais apresentaram redução nos animais adultos. Em associação a isso, observamos que estes animais apresentaram uma concentração plasmática de ang II reduzida em comparação aos animais de mesma idade não-manipulados.

Os efeitos da ang II nos rins são múltiplos. Este hormônio modula o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular através de vasoconstrição renal, nos vasos arteriais e nas células mesangiais, ambos os efeitos produzidos pela ativação de receptores AT<sub>1</sub>. Ela age também sobre as células tubulares, para promover a reabsorção de sódio (Shanmugam & Sandberg, 1996). Realizando microperfusão *in vivo*, em ratos, Quan e colaboradores (2004) demonstraram que a ang II intraluminal regula o transporte tubular proximal. A perfusão luminal com um antagonista de receptor AT<sub>1</sub> para ang II (losartan) ou com um

inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) (enalapril) reduziu o volume reabsorvido no túbulo proximal cerca de 35 - 40%. A redução no transporte observado com o uso de enalapril foi completamente revertida com a adição de ang II. Este estudo demonstra a presença de um sistema renina-angiotensina (RAS) local, nos túbulos proximais renais e o papel destacado da ang II intraluminal e seu estímulo direto sobre o transporte tubular proximal.

A reabsorção de sódio é também mediada indiretamente pela ang II como resultado de sua potente estimulação da secreção de aldosterona pela zona glomerulosa das glândulas supra-renais (Shanmugam & Sandberg, 1996). Donadio e colaboradores (2006) demonstraram que a secreção basal de mineralocorticóides também é influenciada por intervenções ambientais precoces, de modo que animais adultos que foram manipulados no período neonatal apresentam redução na concentração plasmática de aldosterona nos animais adultos. Ao analisarmos o peso das glândulas supra-renais não foi observado diferenças entre os grupos, nas diferentes idades analisadas.

Considerando-se que juntamente com os níveis circulantes de potássio, a ang II é um importante regulador da secreção de aldosterona (Boyd *et al.*, 1971; Shanmugam & Sandberg, 1996), é possível supor que a redução plasmática de Ang II observada em animais manipulados, quando adultos, possa também produzir alterações na osmolaridade urinária.

No presente estudo, devido à concentração plasmática de ang II diminuída observada nos animais adultos manipulados precocemente, poderíamos esperar como efeito um aumento da TFG e do volume urinário, mas constatamos que isso não ocorreu. Segundo Vander (1995), a Ang II é um potente vasoconstritor que age sobre as arteríolas aferentes e eferentes para aumentar a resistência vascular renal, reduzindo o fluxo sangüíneo renal. Desse modo, uma redução da TFG deveria ser secundária ao aumento da concentração de Ang II, e não à redução, conforme foi observado. Portanto, as reduções da TFG e da Ang II estão associadas, mas não é estabelecida uma relação causal. Esse efeito pode ter sido sobreposto por algum outro fenômeno, o qual não foi identificado.

A função renal alterada nos animais adultos manipulados, caracterizada pela redução da TFG, foi acompanhada por uma redução da ingestão hídrica basal. Essa diminuição da

ingestão hídrica pode, portanto, ocasionar redução do volume de líquido extracelular, seguida de redução de fluxo sanguíneo renal e, por fim, reduzir a TFG.

Muitos fatores estão envolvidos na regulação do balanço hidroeletrólítico, incluindo a osmolaridade dos fluidos corporais, as mudanças no volume plasmático e na pressão arterial, e também a influência de diferentes peptídeos com papel regulador (Stricker *et al.*, 2002). O equilíbrio hidroeletrólítico de um organismo depende, além do funcionamento adequado dos rins, do comportamento de ingestão hídrica e dos mecanismos centrais envolvidos neste processo. Nesse aspecto, a ang II é um dos principais reguladores desta função (Fitzsimons, 1998), estimulando a sede através de seus receptores que estão amplamente distribuídos em diferentes áreas do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo núcleos caracteristicamente angiotensinérgicos como o órgão subfornicial (SFO) entre outros como o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o núcleo paraventricular (PVN), o núcleo arqueado (ARQ) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) (Lenkei *et al.*, 1997). Gomes e colaboradores (2006) demonstraram que a estimulação neonatal reduz a densidade de receptores AT<sub>1</sub> de ang II na área pré-óptica medial e no PVN de ratas adultas manipuladas no período neonatal. Da mesma forma, há possibilidade da manipulação neonatal produzir redução na densidade de receptores AT<sub>1</sub> nos rins. Winkelmann-Duarte e colaboradores (2007) observaram uma redução do número de células no PVN e no núcleo supra-óptico em fêmeas de 11 e 90 dias, mostrando que as alterações morfológicas apresentam-se desde fases iniciais do desenvolvimento e persistem na vida adulta. Portanto, um mecanismo central envolvido no controle da sede não deve ser desconsiderado. No presente estudo, a diminuição da ingestão hídrica observada nos animais adultos manipulados no período neonatal pode ser justificada através da reduzida concentração de ang II e também através de possíveis alterações morfológicas e funcionais de origem central. Desse modo, a redução do volume urinário apresenta-se como uma conseqüência da menor ingestão hídrica. Ainda, que essa reduzida concentração de ang II observada nos animais adultos manipulados pode ter origem no período inicial do desenvolvimento destes animais.

Ao analisarmos a presença de uma possível alteração na estrutura renal, decorrente da estimulação neonatal, para tentarmos explicar a origem das reduções do volume urinário e da ingestão hídrica observadas, constatamos que os animais manipulados precocemente

apresentaram, quando adultos, uma redução de peso renal com conseqüente redução na relação peso renal/peso corporal. Para buscarmos explicações para tal achado, analisamos a espessura do córtex renal. Na porção cortical dos rins se encontram os glomérulos, envolvidos pela cápsula de Bowman, formando uma estrutura conhecida como Corpúsculo Renal. O glomérulo é um tufo compacto de alças capilares interconectadas, os capilares glomerulares, que estão envolvidos no processo inicial de formação da urina através da filtração glomerular (Vander,1995). Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas na espessura do córtex renal entre animais manipulados e não manipulados, em nenhuma das três idades analisadas. Em trabalho realizado por Donadio e colaboradores (2006) utilizando-se o mesmo modelo de estimulação neonatal, não houve evidências de lesão renal em ratos adultos manipulados no período neonatal, quando os rins foram submetidos à análise por um patologista experiente.

Considerando-se que roedores apresentam rins e trato urinário ainda imaturos ao nascimento (de modo que a nefrogênese estende-se até meados do 18<sup>o</sup> dia pós-natal), que o período neonatal é crucial para o desenvolvimento renal nestes animais e que esse desenvolvimento depende da integridade de todos os componentes do RAS (Matsusaka *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Lasaitiene *et al.*, 2006), nossa hipótese inicial foi de que a estimulação neonatal e o conseqüente distúrbio provocado na relação mãe-filhote poderiam produzir alterações importantes no processo de desenvolvimento renal e induzir, mais adiante, alterações na função renal. Ainda, que a gênese destas alterações poderia ser atribuída a modificações provocadas no sistema angiotensinérgico, manifestando-se através de possíveis diferenças nas concentrações plasmáticas de ang II.

Ao tentarmos explicar a gênese das alterações observadas em animais adultos, investigamos então a existência de alterações no sistema angiotensinérgico em filhotes de 11 dias e em animais de 45 dias de idade, manipulados precocemente.

Nos filhotes de 11 dias, não foram observadas alterações no peso corporal, no peso renal e no peso das glândulas supra-renais. Não foram avaliadas a ingestão hídrica, o volume urinário nem a TFG, em virtude da impossibilidade técnica de realizar essas avaliações, visto que nessa idade os ratos são ainda lactentes. Ainda, os animais manipulados exibiram, nessa idade, um aumento nas concentrações plasmáticas de ang II.

A ang II é também um importante hormônio de estresse, de modo que suas concentrações circulantes estão significativamente aumentadas em animais aguda e cronicamente estressados (Yang *et al.*, 1996). Relativo à origem da ang II circulante, no estresse, é bem estabelecido que a inervação simpática pode estimular, através das catecolaminas, as células justaglomerulares a liberar renina, que por sua vez eleva os níveis de ang II no plasma (Reid, 1978; Jindra, 1982).

É sabido que há dois mecanismos que modulam as respostas físicas ao estresse: o sistema nervoso simpático (SNS) – medula supra-renal, e o eixo hipotálamo – hipófise – supra-renal (HPA). Primeiramente, neurônios adrenérgicos são amplamente distribuídos pelo SNC (Ganong, 1985). Efeitos da ang II no sistema nervoso central (SNC) incluem excitação de neurônios catecolaminérgicos (Summer & Phillips, 1983). Então, há uma interação entre o RAS e o SNS – medula supra-renal, isto é, os dois sistemas criam um feedback positivo no encéfalo (Yang, 1996). O aumento na concentração de ang II observado nos animais manipulados de 11 dias de idade pode, portanto, ser atribuído ao efeito crônico do estresse produzido pela estimulação neonatal, nos primeiros 10 dias de vida. Ainda, que um eventual distúrbio durante a nefrogênese, manifestado na vida adulta através de alterações na função renal, não poderia ser atribuído a deficiências de ang II no período neonatal.

Em contrapartida, o aumento de ang II no período neonatal poderia provocar uma excessiva estimulação dos receptores do tipo  $AT_2$  no tecido renal. A ang II participa de processos de crescimento e desenvolvimento celular, através de, principalmente, duas classes de receptores,  $AT_1$  e  $AT_2$ , membros de uma superfamília de receptores acoplados à proteína G, com 7 domínios transmembrana e que modulam as ações da ang II. O tecido fetal de ratos expressa alta densidade de receptores de ang II, inclusive os rins. Durante o desenvolvimento da vida fetal e pós-natal, a distribuição dos receptores  $AT_1$  e  $AT_2$  muda drasticamente (Shanmugam *et al.*, 1996). Conforme Lasaitiene e colaboradores (2006) os receptores  $AT_2$  são amplamente expressos em rins de fetos, são paulatinamente diminuídos após o nascimento e estão envolvidos em fenômenos apoptóticos. Ao contrário, os receptores  $AT_1$  são escassos nos rins de fetos, aumentam gradativamente após o nascimento e estão envolvidos em processos de crescimento e proliferação celular. Em suma, o desenvolvimento renal durante a vida fetal e pós-natal depende do equilíbrio

funcional destes principais tipos de receptores. É possível então, que o aumento de Ang II observado em animais manipulados de 11 dias possa ter estimulado demasiadamente os receptores AT<sub>2</sub>, acentuando seus efeitos apoptóticos e conseqüentemente conduzindo a anormalidades no desenvolvimento renal, inclusive nas células justaglomerulares, que são produtoras e secretoras de renina. Haveria então, um efeito cumulativo desse fenômeno, justificando a queda progressiva nas concentrações de ang II nos animais manipulados durante seu desenvolvimento, conforme observamos. Esse mesmo fenômeno não foi observado nos animais não manipulados.

Devemos também considerar os efeitos da estimulação neonatal sobre os hormônios sexuais e as influências destes sobre o RAS. Em fêmeas, a manipulação neonatal produz alterações endócrinas e reprodutivas, representada por reduções drásticas na ovulação, incluindo ciclos anovulatórios (Gomes *et al.*, 1999, 2005). Em machos e fêmeas, observa-se redução de comportamento sexual (Padoin *et al.*, 2001). Benetti e colaboradores (2007) demonstraram, em ratos machos adultos que sofreram estimulação neonatal, uma redução na secreção de prolactina em resposta a estímulos estressores e também redução de comportamento sexual. Esse conjunto de dados pode sugerir que a estimulação neonatal possa ter como efeito, entre outras alterações no sistema reprodutivo e endócrino de ratos machos e fêmeas, alterações sobre a produção, secreção ou sobre os mecanismos de ação dos hormônios androgênicos.

As influências dos androgênicos sobre o RAS têm sido relatadas em diversos estudos, em sua maioria, voltados à investigação das relações dos hormônios sexuais com o desenvolvimento de hipertensão mediada pelo RAS. Doursout e colaboradores (1990) demonstraram que as respostas da pressão arterial e o efeito dipsinogênico à administração central de ang II em cães, são substancialmente maiores em machos do que em fêmeas. Dados de Xue e colaboradores (2004) apontam que a infusão intracerebroventricular de futamida para bloquear os receptores de androgênicos no sistema nervoso central, atenuou significativamente o desenvolvimento de hipertensão arterial induzida por ang II em ratos machos. Estes resultados indicam que receptores centrais para androgênicos podem mediar o efeito hipertensivo de hormônios sexuais durante infusões de ang II em ratos. Os mecanismos envolvidos no papel dos hormônios sexuais masculinos e receptores de androgênicos e as alterações observadas na ativação da ang II no sistema nervoso central e

em outros tecidos específicos ainda precisam ser melhor estudados. Em 1992, Chen e colaboradores também demonstraram que a testosterona aumenta a pressão arterial, renina plasmática e renina renal em ratas fêmeas ovariectomizadas. Enquanto isso, a expressão de angiotensinogênio, atividade da ECA e atividade de renina plasmática são reduzidas em machos castrados. Finalmente, conforme afirmam Fischer e colaboradores (2002), em ratos, o aumento de renina plasmática correlaciona-se positivamente com a dose de testosterona administrada. Este conjunto de informações nos dá suporte para considerarmos as ações do RAS sob influência dos hormônios sexuais.

Ainda, podemos considerar os efeitos dos hormônios sexuais diretamente sobre a função renal, embora os mecanismos que permeiam os efeitos dos androgênios sobre os rins não estão completamente claros. Uma possibilidade é de que os androgênios podem afetar a função vascular renal (Song *et al.*, 2006). Os mesmos autores observaram que andrógenos modulam as respostas vasculares renais à ang II em ratos. A resposta da resistência vascular renal à infusão de ang II foi significativamente menor em ratos machos castrados comparados a animais controle, ou castrados com reposição de testosterona. Ainda, os androgênios têm sido relacionados ao aumento da expressão do RAS tubular renal. A castração de ratos machos reduz a expressão de mRNA para angiotensinogênio em 60%, o que é revertido com a reposição hormonal (Ellison *et al.*, 1989). Além do mais, foi observado que a castração de machos reduz a atividade do trocador Na/H, um transportador de membrana tubular renal que é regulado pela ang II e, da mesma forma, a reposição subsequente de testosterona normaliza o nível de atividade do trocador Na/H (Mackovic *et al.*, 1986). Ratos machos têm maiores níveis de mRNA para angiotensinogênio do que fêmeas, e esse fenômeno é regulado por androgênios, com estimulação do RAS, resultando em um aumento da retenção de sódio e água em machos (Kienitz *et al.*, 2008).

De um modo geral, as variações normais nas concentrações e nos mecanismos de ação de androgênios podem de fato estar alteradas neste modelo de estimulação neonatal, e estas alterações podem ter conseqüências sobre as concentrações plasmáticas de ang II e de outros componentes do RAS, bem como sobre suas ações centrais e renais.

No presente trabalho, também analisamos as concentrações plasmáticas de corticosterona em diferentes idades, nos grupos manipulado e não manipulado.

Os animais manipulados apresentaram, quando adultos, uma reduzida concentração de corticosterona plasmática. Foi demonstrado, já há algumas décadas que, quando adultos, os ratos manipulados apresentam uma atenuação na reatividade da glândula supra-renal a eventos estressores, evidenciada pela menor concentração plasmática de corticosterona (Ader & Grotta, 1969), assim como uma redução da reatividade comportamental, demonstrada pelo aumento do comportamento exploratório em testes de labirinto (Teruel *et al.*, 1991). Ainda, foi demonstrado que ratos adultos manipulados precocemente têm uma maior densidade de receptores glicocorticóides no hipocampo, região conhecida por mediar os efeitos inibitórios dos glicocorticóides sobre a síntese do hormônio liberador de corticotropina (CRF) pelos neurônios da região paraventricular do hipotálamo (PVN) (Meaney *et al.* 1993; Saplosky, 1994). No presente trabalho, a análise das concentrações plasmáticas de corticosterona foi realizada em condições basais, isto é, sem aplicação prévia de qualquer protocolo de estresse. Conforme Levine (1994), as diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do SNC ao mecanismo de retroalimentação negativa dos hormônios das glândulas supra-renais.

Além de uma redução na concentração plasmática basal de corticosterona, os animais que foram estimulados no período neonatal, quando adultos apresentaram reduções nas concentrações de ang II plasmática, conforme discutimos anteriormente. A ang II é um importante hormônio que contribui para a regulação das respostas simpatoadrenais e hormonais ao estresse através da estimulação de receptores AT<sub>1</sub> centrais e periféricos. O aumento da ang II circulante contribui para aumentar a secreção de ACTH pela hipófise anterior durante o estresse (Saavedra, 1992). A ang II ativa vias centrais pela interação com receptores AT<sub>1</sub> localizados em áreas fora da barreira hemato-encefálica, tais como o SFO, e também em áreas localizadas dentro da barreira, como o PVN, onde os receptores estão localizados na porção parvocelular dos neurônios CRF. Há muitas evidências sugerindo que os receptores AT<sub>1</sub> participam da síntese e liberação de CRF no sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, contribuindo por sua vez para a síntese e liberação de ACTH hipofisário e também atuando diretamente sobre a zona fasciculada das glândulas supra-renais, as quais possuem ampla distribuição de receptores para ang II, para a produção e liberação de glicocorticóides (Armando *et al.*, 2007; Yang, 1996). Considerando-se a interação entre o sistema angiotensinérgico e o eixo HPA nas respostas ao estresse, é justificável o

paralelismo observado entre as baixas concentrações de corticosterona e ang II apresentado pelos animais manipulados, em condições basais, quando adultos. Nos animais adultos manipulados, a corticosterona apresenta-se reduzida em comparação aos animais não manipulados. Essa menor concentração de corticosterona também apresenta um paralelismo razoável com a concentração de ang II, reforçando a influência desta sobre a regulação da secreção de glicocorticóides.

Ao analisarmos as concentrações de corticosterona plasmática nos animais de 11 dias, observamos também uma redução nos animais manipulados. Nestes animais, conforme foi discutido, houve um aumento na concentração de ang II, de modo que foi estabelecida uma relação inversa entre as concentrações destes dois hormônios, conforme foi feito com os animais adultos. Uma possibilidade é de que esses dois hormônios, importantes mediadores das respostas ao estresse, apresentam comportamentos temporais diferenciados. Sabe-se que animais manipulados apresentam, além de uma reduzida resposta ao estresse mediada por glicocorticóides, um retorno aos níveis basais mais rápido do que animais não manipulados, quando adultos (Meaney *et al.*, 1993). Sabe-se também que a manipulação neonatal pode produzir alterações estruturais estáveis, como a diminuição no número de neurônios encontrados em diferentes áreas do sistema nervoso central de ratos. Estudos de Winklemann-Duarte e colaboradores (2007) e de Lucion e colaboradores (2003) demonstram que a manipulação neonatal reduz o número total de células no núcleo supra-óptico, na região parvocelular do PVN e no locus coeruleus. Esses achados podem apontar uma possível explicação para os resultados do presente estudo, justificando o fato de que os animais de 11 dias manipulados apresentaram concentrações plasmáticas de corticosterona reduzidas, a despeito da elevação da concentração de ang II e seus respectivos efeitos modulatórios sobre a produção e secreção de glicocorticóides. Esses mesmos dados também poderiam explicar a redução de corticosterona plasmática encontrada nos animais adultos.

Sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, ainda devemos considerar que os animais de 11 dias, tanto manipulados como não manipulados, apresentaram concentrações menores do que os adultos. O eixo hipotálamo-hipófise (HPA) somente funciona coordenadamente e apropriadamente quando todas as partes que o compõe se encontram amadurecidas. Amadurecimento não só da capacidade de síntese e secreção

dos hormônios, mas também da resposta integrada com os tecidos-alvo que articulam a retroalimentação da regulação hormonal. Uma possibilidade é de que a hipófise neonatal seja incapaz de responder à liberação de CRF pelo hipotálamo via sistema porta-hipotalâmico, devido à: 1) inabilidade para sintetizar e estocar ACTH; 2) imaturidade do sistema de receptores CRF ou 3) dissociação entre a estimulação dos receptores de CRF e a secreção de ACTH. Estas considerações foram feitas por Walker e colaboradores (1986), ao observarem que ratos injetados com CRF no período neonatal não produzem o aumento dos níveis de ACTH observado na idade adulta. Os mesmos autores demonstraram que o conteúdo de CRF hipotalâmico, assim como o conteúdo de ACTH, aumentam gradualmente até o 45<sup>o</sup> dia de vida, em ratos. Ao analisarmos as concentrações plasmáticas de corticosterona nas diferentes idades em animais manipulados e não manipulados, de fato observamos um aumento em ambos os grupos, aos 45 dias (não havendo diferenças entre os grupos), com relação aos filhotes de 11 dias, também de ambos os grupos. A partir do 45<sup>o</sup> dia em diante, até o 90<sup>o</sup> dia, houve um decréscimo da concentração de corticosterona, também em ambos os grupos. A diferença encontrada foi na magnitude com que houve essa redução. Os animais manipulados, apresentaram aos 90 dias uma redução mais pronunciada de corticosterona em relação aos animais não-manipulados, mais uma vez sugerindo uma sensibilidade diferencial do SNC desses animais aos mecanismos de retroalimentação negativa das glândulas supra-renais, ou ainda a influência da ang II, conforme discutido anteriormente.

Em relação aos animais de 45 dias, nenhum dos parâmetros analisados apresentou diferenças significativas entre os grupos. Foram analisados o peso corporal, o peso renal, o peso das glândulas supra-renais, a TFG, a ingestão hídrica e o volume urinário de 24h e concentrações plasmáticas de corticosterona e ang II. A ausência de diferenças entre os animais de 45 dias manipulados e não-manipulados, nos diferentes parâmetros analisados, podem indicar, mais uma vez, que as diferenças encontradas nas concentrações plasmáticas de ang II nos animais de 11 dias podem ser considerados fenômenos decorrentes do estresse crônico produzido pela estimulação neonatal. Esses efeitos parecem ser atenuados durante o desenvolvimento, de modo que durante a puberdade não sejam observadas quaisquer alterações. Esses achados sugerem que a manipulação neonatal produz efeitos tardios sobre os mecanismos de regulação do equilíbrio

hidroeletrolítico, manifestando-se somente na vida adulta, em ratos, conforme os resultados observados nos animais de 90 dias de idade.

## 8 – CONCLUSÕES

Como já demonstrado em trabalhos prévios, eventos ambientais ocorridos no período neonatal produzem alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis. O presente estudo demonstra que a manipulação neonatal também produz modificações nos mecanismos envolvidos na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, entre os quais, o sistema angiotensinérgico. Aos 11 dias de idade, a manipulação neonatal produziu um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de ang II comparando-se aos animais de mesma idade não manipulados. Essa alta concentração exibiu um decréscimo progressivo durante o desenvolvimento desses animais, de modo que aos 45 dias de idade já não observou-se diferenças entre os grupos, e aos 90 dias os animais manipulados apresentaram então uma redução de ang II. A essa redução de ang II está associada uma redução significativa da ingestão hídrica, do volume urinário e da função renal (avaliada através da TFG). Esse conjunto de resultados sugere que as alterações produzidas pela manipulação neonatal sobre a regulação do equilíbrio hídrico instalam-se progressivamente durante o desenvolvimento dos animais manipulados, manifestando-se claramente na vida adulta. Não tendo sido encontradas alterações grosseiras na morfologia renal, aquelas alterações observadas nos animais adultos podem ser atribuídas a uma ação da ang II como regulador central da sede, de modo que sua diminuição tenha produzido uma reduzida ingestão hídrica e posteriormente, um menor volume urinário excretado e uma menor TFG.

Ainda, a manipulação neonatal produziu alterações sobre as concentrações plasmáticas basais de corticosterona, mais notoriamente nos animais adultos manipulados, os quais apresentaram redução em sua concentração através de possível associação com a ação mediadora da ang II sobre a produção e secreção de glicocorticóides. Os presentes resultados demonstram que a manipulação neonatal exerce efeitos sobre o eixo HPA e o sistema angiotensinérgico, inclusive em condições basais.

## 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, R. & GROTA, L. J. Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiology & Behavior*, 4: 303-305, 1969.

ARMANDO, I.; VOLPI, S.; AGUILERA, G.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. *Brain Research*, 20 (1142): 92-99, 2007.

BARBAZANGES, A.; VALÉE, M.; MAYO, W.; DAY, J.; SIMON, H.; LE MOAL, M.; MOCCARI, S. Early and later adaptations have different long-term effects on male rat offspring. *The Journal of Neuroscience*, 16 (23): 7783-7790, 1996.

BENETTI, F.; ANDRADE DE ARAUJO, P.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Developmental Psychobiology*, 49 (3): 258-264, 2007.

BERRY, C.; TOUYZ, R.; DOMINICZACK, A.F.; WEBB, R.C.; JOHNS, D.G. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281 (6): 2337- 2365, 2001.

BOYD, N. R.; CHARD, T.; HUDSON, C. N.; EDWARDS, C. R. Release of oxytocin and vasopressin by the human foetus during labour. *Nature*, 5328: 352-354, 1971.

BICKERTON, R.K. & BUCKLEY, J.P. Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 106: 834-836, 1961.

BHATNAGAR, S.; MEANEY, M. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 7(2): 97-108, 1995.

CHEN, Y. F., NAFTILAN, A. J.; OPARIL, S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension*, 19: 456-463, 1992.

CHEN, Y.; LASAITIENE, D.; FRIBERG, P. The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiologica Scandinavica*. 181: 529-535, 2004.

DENENBERG, V. H. Critical periods, stimulus input and emocional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review*, 71: 335-351, 1964.

DENENBERG, V.H.; WYLY, M. V.; BURNS, J. K.; ZARROW, M. X. Behavioral effects of handling rabbits in infancy. *Physiology & Behavior*, 10: 1001-1004, 1973.

DENENBERG, V.H. Commentary: Is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy. *Developmental Psychobiology*, 32 (1): 1-3, 1999.

DONADIO, M.V.; MELO, D.A.S.; DIAS, H. B.; LUCION, A.B.; OLIVEIRA, J.R.; SANVITTO, G.L. Efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento de ingestão hídrica e a função renal em ratos. In: XXII Congresso Latinoamericano y 1ro Iberoamericano de Ciencias Fisiologicas, 2006, Buenos Aires. Anais do XXII Congresso Latinoamericano y 1ro Iberoamericano de Ciencias Fisiologicas, 2006.

DOURSOUT, M. F.; CHELLY, J. E.; WOUTERS, P.; LOWRENCE, C.; LIANG, Y. Y.; BUCKLEY, J. P. Effects of gender in centrally induced angiotensin II hypertension in dogs. *Hypertension*, 15: 117-120, 1990.

ELLISON, K. E.; INGELFINGER, J. R.; PIVOR, M.; DZAU, V. J. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *Journal of Clinical Investigation*, 83: 1941-1945, 1989.

ESTHER, C.R.; HOWARD, T.E.; MARINO, E. M.; GODDARD, J. M.; CAPECCHI, M. R.; BERNSTEIN, K. E. Mice lacking angiotensin-convertin enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Laboratory Investigation*, 74: 953-956, 1996.

FINDLAY, A.L.R.; FITZSIMONS, J.T.; KUCHARCZYK, J. Dependence of spontaneous and angiotensin-induced drinking in the rat upon the estrous cycle and ovarian hormones. *Journal of Endocrinology*, 82: 215-225, 1979.

FISCHER, M.; BAESSLER, A.; SCHUNKERT, H. Renin-angiotensin system and differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 1553 (3): 672-677, 2002.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiology Review*, 78: 583-686, 1998.

FRIBERG, P.; SUNDELIN, B.; BOHMAN, S.O.; BOBIK, A.; NILSSON, H.; WICKMAN, A.; GUSTAFSSON, H.; PETERSEN, J.; ADAMS, M.A. Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to CE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney International*, 45: 485-492, 1994.

GANONG, W. F. The brain renin-angiotensin system. *Annual Review of Physiology*, 46: 17-31, 1985.

GOMES, C.M.; FRANTZ, P.J.; SANVITTO, G.L.; ANSELMO-FRANCI J.A.; LUCION, A.B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 1239-1242, 1999.

GOMES, C.M.; RAINEKI, C.; RAMOS DE PAULA, P.; SEVERINO, G.S.; HELENA, C.V.V.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; SANVITTO G.L.; LUCION, A.B. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *Journal of Endocrinology*, 184: 435-445, 2005.

GOMES, C. M.; DONADIO, M.V.F.; FRANSKOVIKI, I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C.R.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G.L. 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, 2006.

GOMEZ, R. A. & NORWOOD, V.F. Developmental consequences of the renin-angiotensin system. *American Journal of Kidney Disease*, 26: 409-431, 1995.

GONZÁLEZ, A. S.; RODRÍGUEZ ECHANDÍA, E.L.; CABRERA, R.; FÓSCOLO M. R.; FRACCHIA, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology & Behavior*, 47(4): 735-741, 1990.

GOULD, E.; WOOLLEY, C. S.; McEWEN, B. S. Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 304: 408-418, 1991.

GROSS, P.M.; KADEKARO, M.; SOKOLOFF, L.; HOLCOMB, H.H.; SAAVEDRA, J.M. Selective metabolic stimulation of the subfornical organ and pituitary neural lobe by peripheral angiotensin II. *Peptides* 6: 145-152, 1985.

GURON, G.; NILSSON, A.; NITESCU, N.; NIELSEN, S.; SUNDENLIN, B.; FROKIAER, J.; FRIBERG, P. Mechanisms of impaired urinary concentrating ability in adult rats treated neonatally with enalapril. *Acta Physiologica Scandinavica*, 165 (1): 103-112, 1999.

JINDRA, A. Jr.; KVETNANSKY, R. Stress-induced activation of inactive rennin. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 (11): 5997-5999, 1982.

KIENITZ, T. & QUINKLER, M. Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney & Blood Pressure Research*, 31 (2): 71-79, 2008.

KINSLEY, L.R.; SAKAI, R.R.; MA, L.Y.; FLUHARTY, S.J. Ovarian steroid regulation of angiotensin II-induced water intake in the rat. *American Journal of Physiology*, 276: R90-R96, 1999.

LASAITIENE, D.; CHEN, Y.; ADAMS, M. A.; FRIBERG, P. Further insights into the role of angiotensin II in kidney development. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 26: 197-204, 2006.

LENKEI, Z.; PALKOVITS, M.; CORVOL, P.; LLORENS-CORTÈS, C. Expression of angiotensin type-1 (AT<sub>1</sub>) and type-2 (AT<sub>2</sub>) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 18: 383-439, 1997.

LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*, 135: 795-799, 1962.

LEVINE, S. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Development Psychobiology*, 24 (8): 547-58, 1991.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697: 61-69, 1993.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746: 275-293, 1994.

LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; GANTEN, D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, 40: 2-24, 1985.

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSEN, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277: 1659-1662, 1997.

LUCION, A.B.; PADOIN, M. J.; PEREIRA, F.; MANDARDIM-DE-LACERDA, C. A.; SCHNEIDER, F. L. Stimulation of the number of neurons in the medial amygdala and frontal cortex (F2) of rats submitted to neonatal stimulation. In: *29<sup>o</sup> Annual Meeting of Neuroscience*, PART 1, 25: 617,1999.

LUCION, A.B.; PEREIRA, F.M.; WINKELMANN, E.C.; SANVITTO, G.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral Neuroscience* 117: 894–903, 2003.

MATSUSAKA, T.; MIYAZAKI, Y.; ICHIKAWA, I. The renin angiotensin system and kidney development. *Annual Review of Physiology*, 64: 551-561, 2002.

MACKOVIC, M.; ZIMOLO, Z.; BURCKHARDT, G.; SABOLIC, I. Isolation of renal brush-border membrane vesicles by a low-speed centrifugation: effect of sex hormones on Na/H exchange in rat and mouse kidney. *Biochimica et biophysica acta*, 862: 141-152, 1986.

MCKINLEY, M.J.; ALBISTON, A.L.; ALLEN, A.M.; MATHAI, M.L.; MAY, C.N.; MCALLEN, R.M.; OLDFIELD, B.J.; MENDELSON, F.A.O.; CHAI, S.Y. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *International Journal Biochemistry and Cell Biology*, 35: 901-918, 2003.

MEANEY, M.J.; SEEMA, B.; LaROCQUE, S.; McCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V. & PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of the New York Academy of Science*, 697: 70-85, 1993.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE, J.W.; SHARMA, S.; TANNENBAUM, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. The role of serotonin. *Annals of the New York Academy of Science*, 746: 260-273, 1994.

MISTRETTA, C.M. & BRADLEY, R.M. Effects of early sensory experience on brain and behavioral development. In: *Studies in the Development of Behavior and Nervous System*. New York: Academic Press, pp. 215-246, 1978.

NIIMURA, F.; LABOSKY, P. A.; KAKUCHI, J.; OKUBO, S.; YOSHIDA, H. Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *Journal of Clinical Investigation*, 69: 2947-2954, 1995.

NILSSON, A.B.; NITESCU, N.; CHEN, Y.; GURON, G. S.; MARCUSSEN, N.; MATEJKA, G. L.; FRIBERG, P. IGF-I treatment attenuates renal abnormalities induced by neonatal ACE inhibition. *American Journal of Physiology , Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*, 279: 1050-1060, 2000.

NILSSON, A.B.; FRIBERG, P.; BONQUIST, L.; LASAITIENE, D.; MARCUSSEN, N.; CHEN, Y. Growth hormone aggravates renal abnormalities induced by neonatal enalapril treatment. *Pediatric Nephrology*, 18: 878-886, 2003.

OLIVERIO, M. I.; BEST, C. F.; KIM, H. S.; ARENDSHORST, W. J.; SMITHIES, O.; COFFMAN, T. M. Angiotensin II responses in AT1A receptordeficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 272: 515-520, 1997.

PADOIN, M. J.; LUCION, A. B. The effect of testosterone and DOI (1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2aminopropane) on male sexual behavior of rats. *European Journal of Pharmacology*, 277: 1-6, 1995.

PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M.; BARROS H.M.T.; LUCION, A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience*, 115: 1332-1340, 2001.

QUAN, A.; CHAKRAVARTY, S.; CHEN, J. K.; CHEN, JJ. C.; LOLEH, S.; HARRIS, J. C. Androgens augment proximal tubule transport. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 287:0452-459, 2004.

REID, I. A. The renin-angiotensin system. *Annual Review of Physiology*, 40: 377-410, 1978.

SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrinology Review*. 13: 329-380, 1992.

SAPLOSKY, R. M. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of hippocampus. *Annals of the New York Academy of Science*, 746: 294-307, 1994.

SHANMUGAM, S. & SANDBERG, K. Ontogeny of Angiotensin II receptors. *Cell Biology International*, 20: 169-176, 1996.

SMYTHE, J. W.; McCORMICK, C. M.; ROCHFORD, J.; MEANEY, M.J. The interaction between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and female rats. *Physiology & Behavior*, 55(5): 971-974, 1994.

SILVEIRA, P. P.; BENETTI, C. S.; AYRES, C.; PEDERIVA, F. Q.; PORTELLA, A. K.; LUCION, A. B.; DALMAZ, C. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behavioral Brain Research*, 173: 205-210, 2006.

SONG, J.; KOST Jr, C. K.; MARTIN, D.S. Androgens potentiate renal vascular response to angiotensin II via amplification of the Rho kinase pathway. *Cardiovascular Research*, 72: 456-463, 2006.

STRICKER, E. M; HUANG, W.; SVED, A. F. Early osmoregulatory signals in the control of water intake and neurohypophyseal hormone secretion. *Physiology & Behavior*, 80(5): 739-745, 2002.

SUMMER, C. & PHILLIPS, M. I. Central injection of angiotensin II alters catecholamine activity in rat brain. *American Journal of Physiology*, 244: 257-263, 1983.

TERUEL, A. F.; ESCORIHUELA, R. M.; DRISCOLL, P.; TOBENA, A.; BATTIG, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in young roman high-and-low avoidance rats. *Physiology & Behavior*, 50: 563-565, 1991.

TIMMERMANS, P.B.M.W.M.; WONG, P.C.; CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; BENFIELD, P.; CARINI, D.J.; LEE, R.J.; WEXLER, R.R.; SAYE, J.A.M.; SMITH, R.D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*, 45: 205-251, 1993.

TSHUCHIDA, S.; MATSUSAKA, T.; CHEN, X.; OKUBO, S.; NIIMURA, F. Murine double null zygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe

abnormal phenotypes of angiotensinogen null zygotes. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 755–760, 1998.

TUFRO-McREDDIE, A.; ROMANO, L. M.; HARRIS, J. M.; FERDER, L.; GOMEZ, R.A. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *American Journal of Physiology*, 269: 110-115, 1995.

VANDER, A. J. Renal Physiology. *Library of Congress*. 5<sup>th</sup> edition, 1995.

WALKER, C.D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology*, 118 (4): 1445-1451, 1986.

WALKER, S.J.; VRANA, K.E. Pituitary corticotroph function during the stress hyporesponsive period in neonatal rats. *Neuroendocrinology*, 57: 1003-1010, 1993.

WINKELMANN-DUARTE, E. C.; TODESCHIN, A. S.; FERNANDES, M. C.; BITTENCOURT, L. C.; PEREIRA, G. A. M.; SAMIO, V, N.; SCHUH, E. F. S.; ACHAVAL, M. E.; XAVIER, L. L.; SANVITTO, G. L.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; LUCION, A. B. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Research*, 1170: 20-30, 2007.

XUE, B.; SKALA, K.; PAMIDIMUKKALA, J.; HAY, M. Androgens modulate angiotensin II-induced hypertension in conscious male mice. *FASEB Journal*, 18: A649 (Abstract), 2004.

YANAI, K.; SAITO, T.; KAKINUMA, Y.; KON, Y.; HIROTA, K. Renin-dependent cardiovascular functions and rennin-independent blood-brain barrier functions revealed by rennin-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 5-8, 2000.

YANG, G.; WAN, Y.; ZHU, Y. Angiotensin II – An important stress hormone. *Biological Signals*, 5: 1-8, 1996.

YANG, G. Progress in study of angiotensin and atriopeptin. *Bull Physiology Guangdong*, 8: 15-17, 1991.

YANG, G. Renin-angiotensin system in sex organs and uterus. *Program of Physiology and Science*, 3: 244-247, 1992.

YOUNG, J.B. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279: 1745-1752, 2000.