

# ANÁLISE BIOMÉTRICA E MORFOLOGIA DO RIM DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA GESTACIONAL

## BIOMETRIC ANALYSIS AND KIDNEY MORPHOLOGIC OF RATS SUBMITTED TO GESTATIONAL PROTEIN RESTRICTION

Ariana Lobato Chaves\*, Rodrigo Neto Ferreira\*\*, Vinicius Novaes Rocha\*\*\*, Veronica Clemente Villar Martini\*\*\*\*

### RESUMO

Restrição proteica gestacional em ratos está associada ao desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e hipertensão na idade adulta. O objetivo deste estudo foi desenvolver modelo em ratos para o desenvolvimento de hipertensão através da restrição proteica durante a gestação e avaliar a relação da mesma com o baixo peso ao nascer e a morfologia renal. Foram estudados filhotes de ratos, machos e fêmeas, divididos em grupos controle e restrito nas seguintes idades: dia do nascimento, 10 dias, 3 e 6 meses pós-natais. Os animais restritos durante a gestação nasceram com massa corporal e volume renal menor do que os animais que tiveram dieta normoproteica durante a gestação, além de apresentar lesão renal na idade adulta o que provocou desenvolvimento da hipertensão arterial.

### PALAVRAS-CHAVE

Hipertensão. Nefropatia. Restrição Proteica. Gestação. Ratos Wistar.

### ABSTRACT

Gestational protein restriction in rats is associated with development of chronic diseases like diabetes and hypertension in adulthood. The aim of this study was to develop model in mice to develop hypertension by protein restriction during pregnancy and assess similar relationship with low birth weight and renal morphology. We studied rats, male and female, divided into control group and low protein to the following day of birth, 10 days, 3 and 6 months postnatal. The restricted animals during pregnancy were born with body mass and renal volume smaller than the animals that had normal protein diet during pregnancy, besides having kidney damage in adults what causes the development of hypertension.

### KEYWORDS

Hypertension. Nephropathy. Protein Restriction. Pregnancy. Wistar Rats.

## 1 INTRODUÇÃO

Evidências experimentais em modelos de desnutrição fetal demonstram que proles com baixo peso ao nascimento desenvolvem hipertensão na idade adulta. Em ratos, a restrição tanto protéica quanto calórica (30%), durante a gestação, provoca redução de 33% do peso

da prole quando comparada com seus respectivos controles, e aumento da pressão sistólica 5 a 8 mmHg na idade adulta (WOODALL et al., 1996). Um modelo moderado de restrição protéica durante a gestação, comparável ao que ocorre na população humana (9% de proteína), resulta em pequena diminuição do peso ao nascer e retardo no crescimento dos órgãos do tronco, sem, entretanto, afetar o cérebro. Em estudos prévios animais apresentaram significativo aumento da pressão arterial a partir de 4 semanas de idade (LANGLEY et al., 1994) que persistiu até a idade adulta (LANGLEY; JACKSON, 1994).

Em ratos o surgimento da hipertensão difere entre os sexos, pois as fêmeas só se tornam hipertensas se suas mães forem submetidas à restrição protéica severa (5% de proteína) (MANNING; VEHASKARI, 2001). Ao contrário dos machos que mesmo na restrição protéica moderada (8,5% de proteína) tornam-se hipertensos. Esta diferença parece ser justificada por uma maior sensibilidade dos machos a este tipo de restrição protéica, já que eles apresentam seu número de néfrons reduzido na restrição moderada (JOSHI et al., 2003; WOODS et al., 2004).

Correspondence Author: Professora Drª. Veronica Clemente Villar Martini. Centro de Ensino Superior de Valença – CESVA. Núcleo Biomédico, Rua Sargento Victor Hugo, 161, Bairro de Fátima – Valença, RJ. (0xx24)2453-1888. veve.villar@ig.com.br.

\* Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária. Centro de Ensino Superior de Valença- CESVA. arianalobatochaves@hotmail.com.

\*\* MSC Doutorando em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Professor Adjunto de Anatomia e Coordenador Adjunto do Núcleo Biomédico do Centro de Ensino Superior de Valença- CESVA. rnetferreira@hotmail.com.

\*\*\* MSC Doutorando em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Professor Assistente de Histologia e Embriologia do Centro de Ensino Superior de Valença- CESVA. vnrocha@hotmail.com.

\*\*\*\* PhD, BSC. Professora Titular de Histologia e Embriologia e Coordenadora do Núcleo Biomédico do Centro de Ensino Superior de Valença – CESVA. veve.villar@ig.com.br.

Received: 04/2011

Accepted: 06/2011

É possível que a restrição protéica altere a cronologia dos eventos da nefrogênese e/ou a capacidade formadora de néfrons. Há algum tempo se sabe que a patogênese da hipertensão essencial humana está relacionada à diminuição do número de néfrons (BRENNER et al., 1988). Assim também acontece no rato, onde foi identificado que nos ratos geneticamente hipertensos há menor número de néfrons que nos ratos Wistar normotensos (SKOV et al., 1994). Sendo assim o objetivo deste trabalho é programar ratos para o desenvolvimento de hipertensão através da restrição protéica durante a gestação e avaliar a relação da mesma com o baixo peso ao nascer e possíveis alterações morfológicas renais.

## 2 MATERIAIS E MÉTODO

Neste estudo foram utilizados 80 ratos Wistar, gerados por mães restritas ou normais, sendo 40 machos e 40 fêmeas (N=80). O protocolo experimental foi submetido à análise do Comitê de Ética Animal da UERJ. Os animais foram criados no biotério do Laboratório de Morfologia e Morfometria Cardiovascular (LMMC) onde a temperatura e a umidade foram controladas ( $21 \pm 1$  °C e  $60 \pm 10\%$ , respectivamente, média  $\pm$  DP). Sendo mantidos sob ciclo de luz dia/noite de 12 h (luz fria artificial de 7h às 19hs) e ciclo de exaustão de ar de 15 min/h.

Tabela 1: Composição das dietas pré-natais (ambas as dietas são isocalóricas). Um mix de vitaminas e minerais foi formulado de acordo com recomendações para roedores da American Institute of Nutrition AIN 93G. Abreviações: NP = dieta normoproteica, LP = dieta hipoproteica.

Nutrientes (g/100g)	Dieta prenatal	
	NP	LP
Carboidratos		
Amido de milho	33.5	47.65
Sacarose	20.0	20.0
Caseína	19.0	5.0
Cistina	0.3	0.15
Colina	0.2	0.2
Gordura (óleo de soja)	16.0	16.0
Fibra (celulose)	5.0	5.0
Mix de mineral (AIN-93G)	1.0	1.0
Vitamin mix (AIN-93G)	5.0	5.0
Energia (kJ/100g da dieta)	1,900	1,900

As ratas foram acasaladas e o dia 0 da gestação foi considerado quando o plug vaginal foi expelido. As matrizes selecionadas aleatoriamente para um dos 2 grupos de estudo: grupo controle (NP, recebeu dieta padrão com 19% de proteína durante toda a gestação de acordo com a AIN93-G, Nuvital, Nuvilab, Paraná, Brazil) (REEVES et al., 1993), e grupo restrito (LP, recebeu dieta hipoproteica com 5% de proteína durante toda a gestação) As dietas NP e LP foram isocalóricas, e a diferença energética entre as duas dietas foi corrigida com a adição de carboidratos (amido de milho) (tabela1).

No nascimento, o gênero foi determinado pela distância ano-genital e o número de filhotes na prole foi padronizado em 6 por matriz (3 machos e 3 fêmeas). Neste dia também foram analisados o tamanho da ninhada, o comprimento naso-anal (NAL) e a massa corporal (BM) dos animais.

Os animais dos grupos 3 e 6 meses de idade tiveram a pressão sanguínea (BP) da artéria da cauda aferida semanalmente por pletismografia (Letica LE 5100, Panlab, Barcelona, Spain) a partir do 3º mês.

Nos dias estipulados para a eutanásia, os animais foram avaliados biometricamente e anestesiados profundamente com Thiopental ( $15 \text{ mg/Kg}^{-1}$  intraperitonealmente). Após a anestesia profunda o coração foi exposto para coleta de sangue através de punção do átrio direito. Em seguida o ventrículo esquerdo foi cateterizado para a perfusão dos tecidos com solução salina a 0,9%. Depois de perfundidos os rins foram retirados e seus volumes foram determinados por deslocamento de líquido (método de Scherle) (SCHERLE, 1970).

Após a coleta, o sangue foi centrifugado (120g por 15 min) à temperatura ambiente ( $21 \pm 2$ °C). Depois de centrifugado o soro foi guardado individualmente a  $-20$ °C até a análise. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária de Valença. Sendo obtidas pelo método enzimático colorimétrico, onde foi utilizado o espectrofotômetro Benfer modelo 240. Nestas análises dosamos uréia e creatinina sérica, sendo que em todas as dosagens utilizamos os Kits da Labtest.

Para microscopia de luz o fixador utilizado foi a formalina de Millong (formaldeído 4% peso/volume em tampão fosfato 0,1M pH 7,2), nesta solução os rins esquerdos permaneceram por até 48 horas. Sendo posteriormente processados para inclusão em Paraplast plus seccionados com  $5 \mu\text{m}$  de espessura corados por hematoxilina e eosina.

Alguns cortes foram utilizados para imunomarcagem. Para identificação dos vasos utilizamos o anticorpo anti- $\alpha$  actina de músculo liso (DakoCytomation), na diluição de 1:200. A membrana basal foi marcada com anticorpos para laminina

(Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA), na diluição 1:200, colágeno IV, diluição de 1:200 (DakoCytomation). A proliferação celular foi marcada pelo anticorpo PCNA na diluição de 1:200. Na microscopia de luz os cortes foram inicialmente incubados com os anticorpos primários descritos acima, alguns por 2 horas e outros por até 24 horas. Utilizamos neste protocolo de processamento a tripsina na recuperação antigênica e peróxido de hidrogênio diluído em metanol para inibir a peroxidase endógena. Na revelação da reação imune utilizamos o Kit LSAB da Dako, este Kit utiliza um anticorpo secundário biotinizado conjugado com a enzima estreptavidina, sendo esta revelação feita com 3,3 – diaminobenzidina tetrahydrocloride (cromógeno) como substrato. Depois de revelada a imunomarcação os cortes foram corados com Hematoxilina Mayer.

A estatística descritiva foi calculada. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM). Na análise do número de recém-nascidos por mães nos grupos de estudo utilizamos o teste  $\chi^2$ . As diferenças nos parâmetros biométricos foram testadas por análise de variância *one-way* e pós-teste de Tukey. Em todos os casos foi usado o índice de significância  $\alpha = 0,05$  (ZAR 1999).

### 3 RESULTADOS

O tamanho da ninhada não diferiu significativamente entre os grupos NP e LP, onde no grupo NP a média foi de  $10,25 \pm 1,33$  e no LP de  $8,37 \pm 1,61$ .

A tabela 2 mostra os dados como média e erro padrão da média. A massa corporal no 0d foi menor na prole LP do que na NP. Aos 10d a massa corporal foi somente diferente entre as fêmeas dos grupos estudados. Nas idades 3 e 6 meses a massa corporal diferiu somente entre os gêneros, mas não entre os grupos LP e NP. Em relação ao comprimento naso-anal, os animais de 0d e 10d foram menores no grupo LP do que no grupo NP. Aos 3 meses somente as fêmeas foram diferentes entre os grupos LP e NP. E na idade 6 meses só foram observadas diferenças entre os gêneros do grupo controle.

A pressão sanguínea foi maior em ambos os gêneros do grupo LP do que do grupo NP nas idades de 3 e 6 meses. Sendo em média 120 mmHg nos animais NP e 150 mmHg nos animais LP aos 3 meses de idade. Aos 6 meses 155 mmHg nos animais LP e 125 mmHg nos animais NP. As fêmeas tiveram as pressões 5mmHg mais baixas do que os machos em ambos os grupos porém estas diferenças não foram significativas.

O córtex renal do grupo restrito foi diferente do grupo controle nas idades 3 e 6 meses. No grupo restrito aos 3 meses observamos, alguns túbulos atrofiados e corpúsculos obsoletos e aos 6 meses além

Tabela 2: Dados biométricos (média±EPM). Abreviações: BM = massa corporal, F= fêmeas, LP = grupo hipoproteico, M= macho, NAL = comprimento naso-anal, NP = grupo normoproteico. \* $P<0.05$  quando comparados com o grupo NP, \*\* $P<0.05$  quando comparados com o grupo de machos.

Grupos	Gênero	BM (g)	NAL (cm)
Dia 0			
NP	M	8.0±0.4	5.7±0.1
	F	7.4±0.3 **	5.4±0.4
LP	M	5.0±0.5 *	4.9±0.4 *
	F	3.8±0.5 *	4.5±0.4 *
Dia 10			
NP	M	21.5±2.5	8.5±0.9
	F	20.1±1.9	7.9±0.4
LP	M	17.1±3.0	7.6±0.6 *
	F	14.4±5.8 *	7.0±1.1 *
3 meses			
NP	M	331.8±37.0	22.8±1.3
	F	220.4±22.8 **	20.4±0.4
LP	M	332.8±31.3	21.4±1.1
	F	208.0±33.6 **	18.5±0.8 *
6 meses			
NP	M	416.4±56.0	23.5±1.0
	F	240.4±47.8 **	20.6±1.1 **
LP	M	451.2±30.4	22.8±0.7
	F	262.8±28.8 **	20.2±0.8

da atrofia tubular observamos glomeruloesclerose com presença de uma grande área de infiltrado inflamatório (Figura 1).

A imunohistoquímica foi utilizada para analisarmos qualitativamente as alterações ocorridas no rim de proles NP e LP. Quanto à marcação com anticorpo para  $\alpha$ -actina de músculo liso não observamos diferenças entre o grupo NP e LP (Figura 2). Utilizamos os anticorpos anti-colágeno IV e anti-laminina para marcação da membrana basal. Na marcação com colágeno IV não observamos diferenças, porém na marcação com anti-laminina observamos em animais de 3 e 6 meses de idade um aumento na expressão de laminina nos animais do grupo LP (Figura 3). O anticorpo anti-PCNA marca o núcleo das células em proliferação. Nesta análise observamos na prole NP uma grande área nefrogênica com muitos corpúsculos imaturos, já na prole LP a área nefrogênica é menor com poucos corpúsculos presentes na região cortical na idade 0d. Aos 10 dias pós-natais há diminuição na proliferação celular que foi somente observada em algumas células tubulares, porém não observamos diferenças entre os grupos NP e LP (Figura 4).

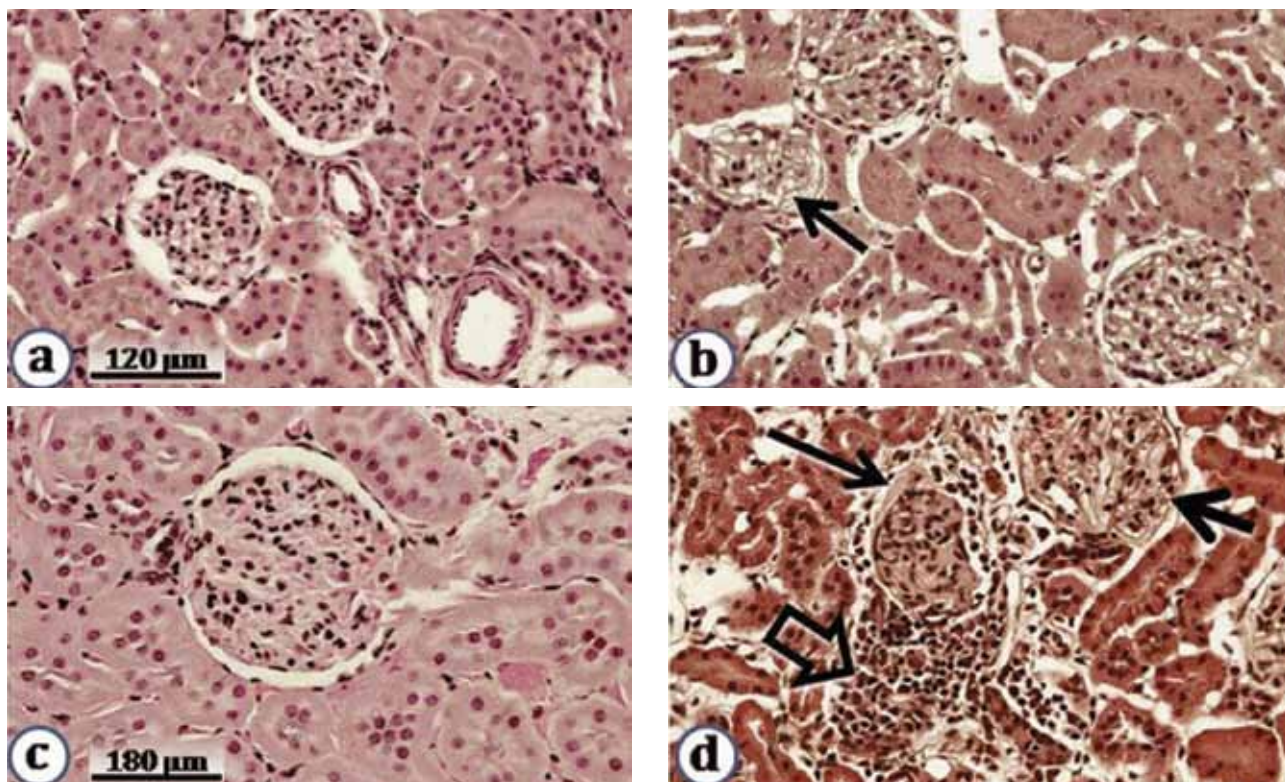


Figura 1: Fotomicrografias do córtex renal (a, b e d com o mesmo aumento, todos corados com HE) aos 3 meses (3m) e 6 meses de idade (6m) das proles de matrizes que receberam dieta normoproteica (grupo NP) e hipoproteica (grupo LP). (a) Prole NP 3m mostrando estrutura normal do córtex renal; (b) Prole LP 3m com glomérulos obsoletos (seta); (c) Prole NP 6m mostrando corpúsculo renal bem preservado com tecido adjacente normal; (d) Prole LP 6m com infiltrado inflamatório (seta aberta), fibrose periglomerular aumentada (seta longa), e glomérulo dilatado (seta).

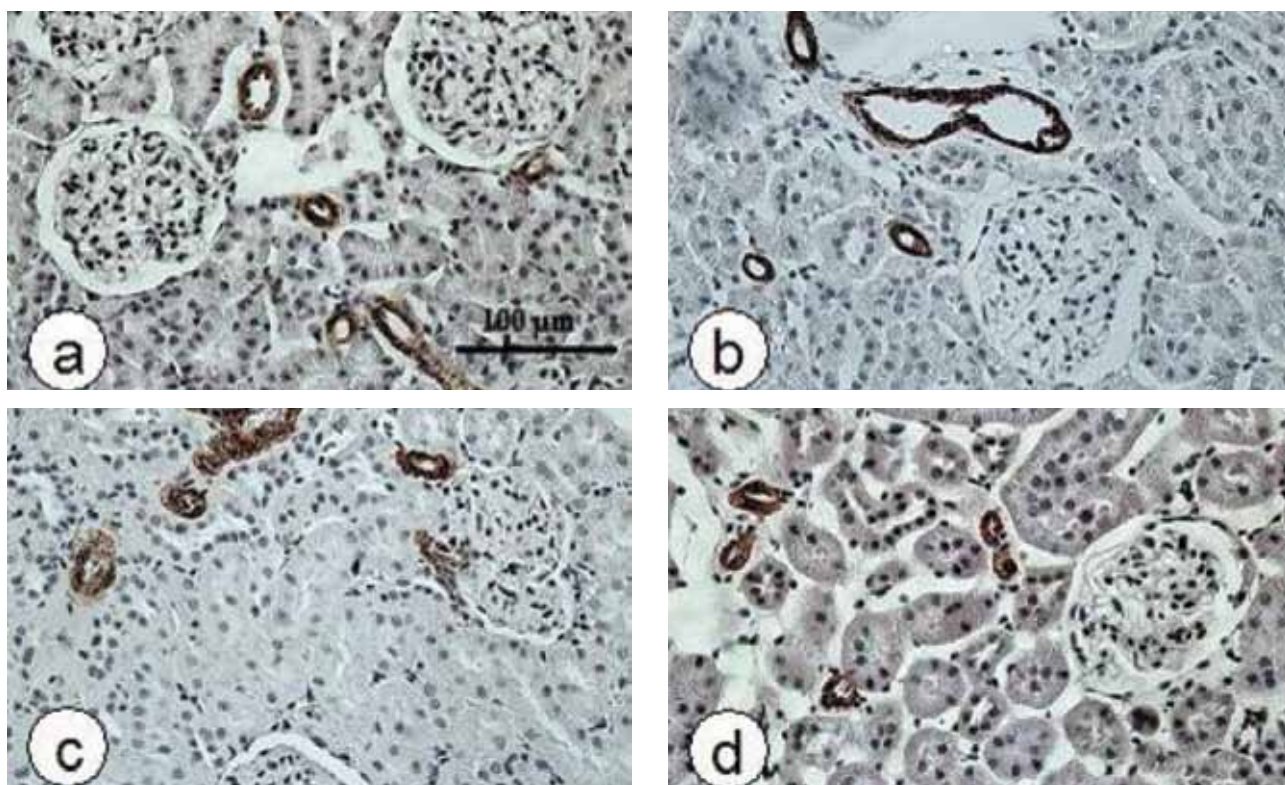


Figura 2: Imunomarcacão com anticorpo anti  $\alpha$ - actina de músculo liso(400x).(a) grupo NP 3m; (b) grupo LP 3m; (c) grupo NP 6m e (d) grupo LP 6m.

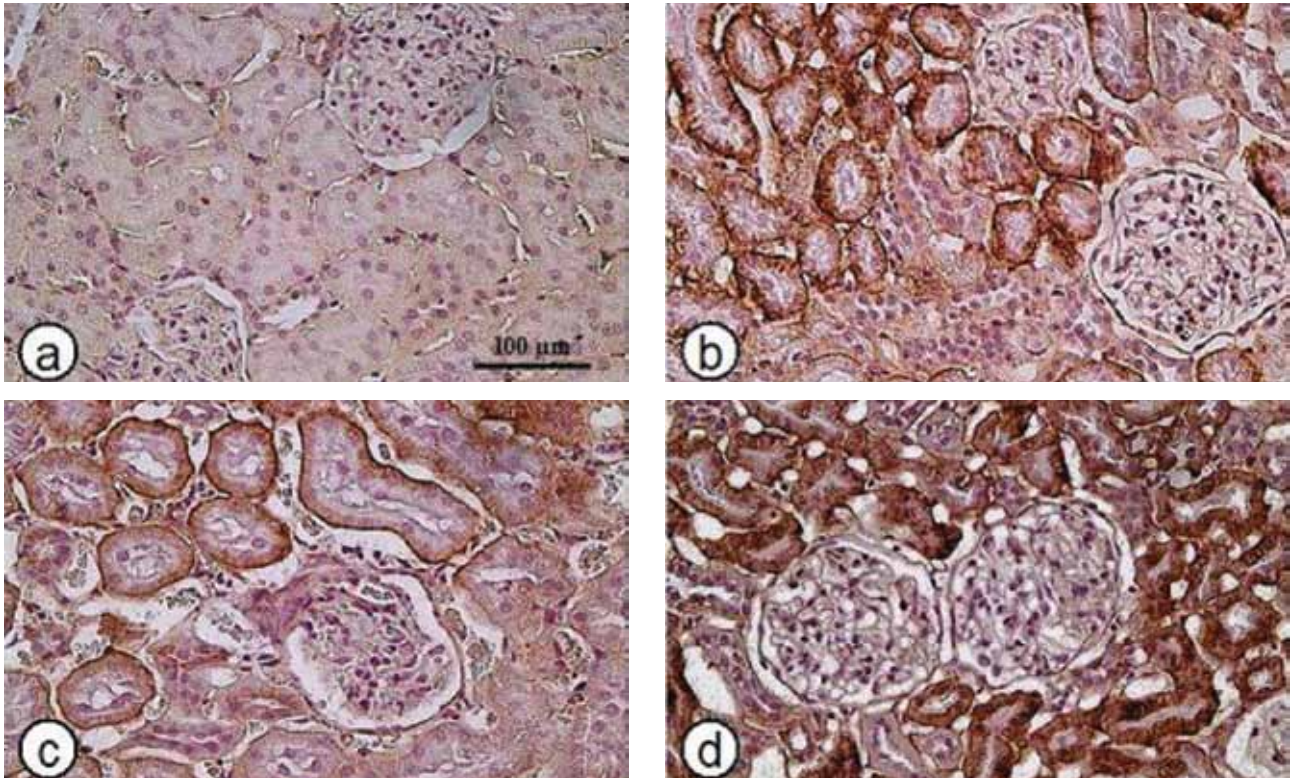


Figura 3: Imunomarcção com anticorpo anti-laminina, nas observamos diferenças entre os grupos LP e NP, onde no grupo LP aos 3 e 6 meses há uma maior expressão de laminina principalmente ao redor dos túbulos renais(400x). (a) grupo NP 3m; (b) grupo LP 3m; (c) grupo NP 6m e (d) grupo LP 6m.

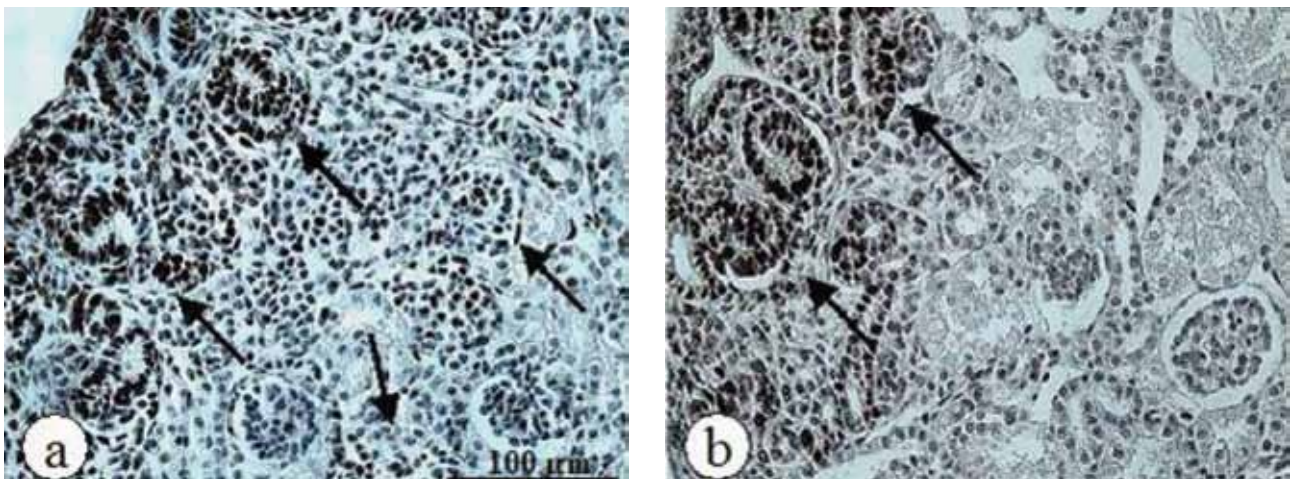


Figura 4: Imunomarcção com anticorpo anti-PCNA,(a) grupo NP 0d, grande área nefrogênica com muitos corpúsculos marcados (seta); (b) grupo LP 0d, pequena área nefrogênica e poucos corpúsculos marcados (seta) (objetiva 40x).

#### 4 DISCUSSÃO

Os animais foram estudados nos dias 0d, 10d, 3 meses e 6 meses. Diferente dos humanos, a organogênese de roedores (inclusive a nefrogênese) não está completa ao nascimento, com o processo de proliferação celular estendendo-se até o primeiro 1/3 da lactação (IINO et al., 2005). Dessa forma a primeira

semana de vida em roedores é um período crítico para o estudo da nefrogênese normal ou patológica submetida a diferentes condições (DUONG et al., 2003; KANWAR et al., 2005). Em ratos a nefrogênese esta dividida em dois períodos, o período de formação glomerular que se inicia aos 17 dias e meio de gestação e o período de proliferação celular, que ocorre depois do nascimento até aproximadamente o 10º dia pós-natal. Então,

entendemos que roedores nascem com um desenvolvimento equivalente ao terceiro trimestre gestacional de humanos (QUINN, 2005). Os animais foram estudados com diferentes idades, desde o nascimento até os seis meses de idade.

Quando estudamos os animais ao nascimento sabíamos que seus rins estavam ainda em nefrogênese, com néfrons em proliferação. Aos 10 dias do período pós-natal os rins deveriam estar formados com os néfrons totalmente diferenciados (LARSSON et al., 1996). As idades de 3 e 6 meses foram escolhidas também para análise porque correspondem a ratos na maturidade sexual (90 dias) e adultos maduros (180 dias) (QUINN, 2005), que são períodos muito relevantes para analisar.

Progressos têm sido realizados para demonstrar que a hipertensão pode ser programada no período pré-natal pela manipulação da dieta materna e alguns dos mecanismos envolvidos têm sido identificados. Portanto, já se sabe que a prole de mães submetidas à restrição protéica durante a gestação são programadas para doenças crônicas na idade adulta (BARKER, 1998). Em humanos, 1-kg de aumento da massa corporal ao nascimento está associado a uma redução de aproximadamente 3mmHg na pressão sistólica (BARKER, 2006). Em nosso estudo, quando a restrição protéica materna cessa, a prole tem um rápido ganho de massa corporal com aumento do tamanho renal demonstrando o prejuízo da nefrogênese devida à restrição protéica materna, que deve certamente ter um forte impacto ao longo da vida no controle das funções renal e cardiovascular (LANGLEY-EVANS et al., 1999).

A hipertrofia compensatória dos glomérulos existentes associada com o número reduzido de néfrons tem sido relatada com a grande suscetibilidade para doença renal (DOUGLAS-DETRON et al., 2006), dando consistência a hipótese de que as adaptações que ocorrem para manter a função hemodinâmica renal proveniente do prejuízo durante a nefrogênese fetal resulta em um progresso acelerado da glomerulosclerose e aumento da pressão intrarenal mediada pela aumento da resistência vascular (NWAGWU et al., 2000). A diminuição do número de néfrons causada por fatores nutricionais é amplificada pelo rápido ganho de peso na infância que pode provocar um aumento na razão de filtração glomerular e consequente dano ao longo da vida, como esclerose e perda glomerular. Estas alterações resultam da grande sobrecarga excretora imposta ao rim por um grande corpo (BARKER, 2006). Em nosso trabalho os animais adultos apresentaram atrofia tubular aos 3 meses de idade e glomerulosclerose aos 6 meses sugerindo que estas alterações glomerulares são resultados da hiperfiltração de poucos néfrons existentes.

Estudos experimentais mostram que, em ratos desnutridos com 18 meses de idade, há aumento da esclerose glomerular e lesões túbulos intersticiais com alta expressão de fibronectina, desmina e L-actina no glomérulo, na cápsula de Bowman e algumas regiões no interstício

renal (REGINA et al., 2001). Além disso, estudos de função renal mostram que a restrição protéica gestacional induz a um aumento da uremia (NWAGWU et al., 2000) e que a proteinúria começa quando os animais têm 9 meses de idade (REGINA et al., 2001).

Diferenças entre os grupos estudados na bioquímica sanguínea foram encontrados. Porém, mesmo estando aumentados os níveis de uréia e creatinina no grupo LP com 3 e 6 meses de idade, em relação ao grupo NP, os valores ainda estavam dentro dos valores de referência para ratos Wistar (TUCKER, 1997). Alterações dos níveis de uremia ocorre em estados de disfunção renal e hepática, insuficiência cardiovascular congestiva severa, desidratação e aumento do catabolismo de proteínas (NWAGWU et al., 2000). Embora o aumento da uréia observada no grupo LP esteja dentro dos padrões de normalidade, isto pode indicar início de lesão renal que estaria acelerado pela restrição fato este que concorda com os resultados observados na microscopia de luz.

A  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) no rim normal é expressa nos vasos e ao redor dos túbulos nos processos citoplasmáticos de miofibroblastos intersticiais. Quando há fibrose renal, há um aumento importante da expressão da  $\alpha$ -SMA indicando que miofibroblastos intersticiais podem ser a via central no processo de fibrose em glomerulonefrites (THIJSSSEN et al., 2007). Não observamos diferenças na marcação com  $\alpha$ -SMA entre os grupos LP e NP, também não observamos fibrose peritubular, sendo a expressão de  $\alpha$ -SMA quase que restrita aos vasos. Este resultado é compatível com ausência de fibrose intersticial significativa na prole restrita aos 6 meses de idade, mesmo tendo-se observado um início de lesão renal que poderia evoluir com o envelhecimento dos animais. Ratos com mais de 12 meses apresentam proteinúria e esclerose glomerular (GIL et al., 2005).

O PCNA é expresso em altos níveis na fase S do ciclo celular, mas diminui drasticamente durante a diferenciação celular terminal. Durante o desenvolvimento renal a expressão de PCNA está restrita à área nefrogênica que é a região subcapsular que contém néfrons primitivos e blastema. Sua expressão é rapidamente diminuída quando as células epiteliais renais adquirem características funcionais (SAIFUDEEN et al., 2002). Em humanos, quando os túbulos renais se tornam diferenciados seus Índices de Proliferação (percentual de células PCNA-positivas) ficam reduzidos (NADASDY et al., 1998) e a atividade proliferativa diminui com a idade nos primeiros dias de vida pós-natal (OKADA et al., 2001), por esta razão a análise da expressão de PCNA é usada para o estudo da maturidade renal. Na análise qualitativa dos rins das proles normais e restritas observaram-se diferenças nas marcações com PCNA. Ao nascimento as proles normais apresentaram forte marcação com PCNA mostrando que nestes animais existem mais corpúsculos em proliferação formando uma grande área nefrogênica, o que não ocorreu nas proles restritas.

Sendo assim de acordo com os resultados encontrados e dados encontrados na literatura, concluímos que a restrição proteica gestacional provoca baixo peso ao nascer e diminuição no tamanho renal o que provoca redução na proliferação de néfrons e lesão glomerular na idade adulta resultando no desenvolvimento de hipertensão arterial.

## 5 REFERÊNCIAS

- BARKER D.J. Birth weight and hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 48, n. 3, p. 357-358, 2006.
- BARKER, D.J. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, London, v. 95, n. 2, p. 115-128, 1998.
- BARKER, D.J. The fetal and infant origins of adult disease. **British Medical Journal**, London, v. 301, n. 6761, p. 1111, 1990.
- BARKER, D.J. The fetal and infant origins of disease. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 25, n. 7, p. 457-463, 1995.
- BARKER, D.J.; BAGBY, S.P.; HANSON, M.A. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, London, v. 2, n. 12, p. 700-707, 2006.
- BRENNER, B.M.; GARCIA, D.L.; ANDERSON, S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other?. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 1, n. 4 Pt 1, p. 335-347, 1988.
- CHALLEN, G.; GARDINER, B.; CARUANA, G.; et al. Temporal and spatial transcriptional programs in murine kidney development. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 23, n. 2, p. 159-171, 2005.
- DOUGLAS-DENTON, R.N.; MCNAMARA, B.J.; HOY, W.E.; HUGHSON, M.D.; BERTRAM, J.F. Does nephron number matter in the development of kidney disease?. **Ethnicity & Disease**, Atlanta, v. 16, n. 2 Suppl 2, p. S2-40-S2-45, 2006.
- DUONG VAN HUYEN, J.P.; AMRI, K.; BELAIR, M.F.; et al. Spatiotemporal distribution of insulin-like growth factor receptors during nephrogenesis in fetuses from normal and diabetic rats. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 314, n. 3, p. 367-379. 2003.
- FALKNER, B. Birth weight as a predictor of future hypertension. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 15, n. 2 Pt 2, p. 43S-45S, 2002.
- GIL, F.Z.; LUCAS, S.R.; GOMES, G.N.; CAVANAL, M.F.; COIMBRA, T.M. Effects of intrauterine food restriction and long-term dietary supplementation with L-arginine on age-related changes in renal function and structure of rats. **Pediatric Research**, Basel, v. 57, n. 5 Pt 1, p. 724-731, 2005.
- IINO, N.; GEJYO, E.; ARAKAWA, M.; USHIKI, T. Three-dimensional analysis of nephrogenesis in the neonatal rat kidney: light and scanning electron microscopic studies. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, v. 64, n. 2, p. 179-190, 2001.
- JOSHI, S.; GAROLE, V.; DAWARE, M.; GIRIGOSAVI, S.; RAO, S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, New York, v. 52, n. 1, p. 13-18, 2003.
- KANWAR, Y.S.; NAYAK, B.; LIN, S.; et al. Hyperglycemia: its imminent effects on mammalian nephrogenesis. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 20, n. 7, p. 858-866, 2005.
- LANGLEY, S.C.; JACKSON, A.A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. **Clinical Science**, London, v. 86, n. 2, p. 217-222, 1994.
- LANGLEY, S.C.; SEAKINS, M.; GRIMBLE, R.F.; JACKSON, A.A. The acute phase response of adult rats is altered by in utero exposure to maternal low protein diets. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 24, n. 9, p. 1588-1596, 1994.
- LANGLEY-EVANS, S.C.; SHERMAN, R.C.; WELHAM, S.J.; NWAGWU, M.O.; GARDNER, D.S.; JACKSON, A.A. Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 27, n. 2, p. 88-93, 1999.
- LARSSON, L.; APERIA, A.; WILTON, P. Effect of normal development on compensatory renal growth. **Kidney International**, New York, v. 18, n. 1, p. 29-35, 1980.
- LI, F.; WANG, X.; CAPASSO, J.M.; GERDES, A.M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 28, n. 8, p. 1737-1746, 1996.
- MANNING, J.; VEHASKARI, V.M. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 16, n. 5, p. 417-422, 2001.
- NADASDY, T.; LAJOIE, G.; LASZIK, Z.; BLICK, K.E.; MOLNAR-NADASDY, G.; SILVA, F.G. Cell proliferation in the developing human kidney. **Pediatric and Developmental Pathology**, New York, v. 1, n. 1, p. 49-55, 1998.
- NWAGWU, M.O.; COOK, A.; LANGLEY-EVANS, S.C. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 83, n. 1, p. 79-85, 2000.

OKADA, T.; IWAMOTO, A.; KUSAKABE, K.; et al. Perinatal development of the rat kidney: proliferative activity and epidermal growth factor. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 79, n. 1, p. 46-53, 2001.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, Burbank, v. 21, n. 6, p. 775-777, 2005.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REGINA, S.; LUCAS, R.; MIRAGLIA, S.M.; ZALADEK, G.F.; MACHADO, C.T. Intrauterine food restriction as a determinant of nephrosclerosis. **American Journal of Kidney Diseases**, New York, v. 37, n. 3, p. 467-476, 2001.

SAIFUDEEN, Z.; MARKS, J.; DU, H.; EL-DAHR, S.S. Spatial repression of PCNA by p53 during kidney development. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 4, p. F727-F733, 2002.

SKOV, K.; NYENGAARD J.R.; KORSGAARD, N.; MULVANY, M.J. Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, London, v. 12, n. 12, p. 1373-1376, 1994.

THIJSSSEN, S.; LAMBRICHTS, I.; MARINGWA, J.; VAN KERKHOVE, E. Changes in expression of fibrotic markers and histopathological alterations in kidneys of mice chronically exposed to low and high Cd doses. **Toxicology**, Amsterdam, v. 238, n. 2-3, p. 200-210, 2007.

TUCKER, M. Diseases of the Wistar rat. 1ed. London: Taylor & Francis, 1997.

WATERLAND, R.A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 2, p. 179-97, 1999.

WOODALL, S.M.; JOHNSTON, B.M.; BREIER, B.H.; GLUCKMAN P.D. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. **Pediatric Research**, Basel, v. 40, n. 3, p. 438-443, 1996.

WOODS, L.L.; WEEKS, D.A.; RASCH, R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. **Kidney International**, New York, v. 65, n. 4, p. 1339-1348, 2004.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. Upper Saddle River: Prentice-Hall., 1999.