

## MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF HEPATIC STEM CELLS

SNORRI S. THORGEIRSSON

*Laboratory of Experimental Carcinogenesis, National Cancer Institute,  
National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892 USA*

The concept that the liver contains epithelial cells that share some of the major properties of stem cells of the well-characterized stem cell-fed lineages found in bone marrow, intestinal epithelium, and epidermis is now well supported. Nevertheless, the population dynamics of the major types of liver epithelial cells, hepatocytes and bile epithelia display a striking difference from the population dynamics of the classic stem cell systems. The focus of the presentation will be on recent studies on the activation and expansion of liver stem cells in vivo, and the role that these cells may play in regeneration of the liver. The requirement for a selective and sustained

expression of growth factors during the early stages of the stem cell activation will be highlighted. In addition, results will be presented supporting the hypothesis that following loss of liver mass both the quiescent stem cells, as well as the residual differentiated hepatocytes and bile duct epithelial cells, are activated to proliferate. However, a significant contribution of the stem cells to the regeneration process only occurs under circumstances in which the residual differentiated cells are functionally compromised and/or cannot proliferate. In addition, recent advances on the cellular and molecular biology of hepatic stem cells/progenitors will be discussed.

-----

## LA PORTADA

Susana Fedrano. **El Ala**, 1991.

Oleo sobre tela, 100 x 100 cm. Cortesía de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Predio TANDAR, Centro Atómico Constituyenes. Presidente de la Comisión Organizadora de la exposición Permanente: Dr. A. J. G. Maroto.

Susana Fedrano nació en Buenos Aires en 1942. Desde 1970 ha expuesto sin interrupción tanto en la Argentina como en otros países, habiendo recibido premios y distinciones nacionales e internacionales, entre ellas el Primer Premio del Salón de Otoño de San Fernando 88, el Primer Premio del XVI Salón de Arte Sacro del Museo de Bellas Artes de Tandil, el Premio Punta del Este 95 a la mejor muestra de pintura argentina y el III Premio Reina Sofía. Sus obras figuran en distintos museos, centros de arte y colecciones del país y del extranjero<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Extractado de:* Comisión Nacional de Energía Atómica. *Artistas Plásticos con la Ciencia*, 101 Centro Atómico Constituyentes, Predio TANDAR, Buenos Aires, 1999; p. 111.

## DESARROLLO DE LA VASCULATURA RENAL

MARÍA LUISA S. SEQUEIRA LÓPEZ Y R. ARIEL GÓMEZ

El riñón es un órgano sumamente vascularizado: recibe en el adulto normal aproximadamente 20% del gasto cardíaco. Durante el desarrollo renal, el ensamblado preciso en tiempo y espacio de las arteriolas con sus respectivos nefrones es un evento crucial que dirige la formación de un riñón normal preparado para la vida extrauterina. La anatomía apropiada de la microvasculatura renal con los varios segmentos del nefrón es obviamente importante para la regulación de funciones especiales tales como la filtración glomerular, el flujo sanguíneo medular y el mantenimiento del gradiente de concentración medular. Aquí revisamos aspectos salientes del desarrollo vascular renal.

El desarrollo de la vasculatura ocurre por medio de dos mecanismos que a veces se superponen: angiogénesis y vasculogénesis. **Angiogénesis** es el proceso por el cual nuevos capilares brotan a partir de vasos sanguíneos preexistentes<sup>1</sup>. Este proceso implica disolución de la membrana basal, modelado de la matriz extracelular, migración y proliferación de células endoteliales, formación de tubos endoteliales y reclutamiento de células (musculares) perivasculares. Este proceso se observa usualmente durante la organogénesis y acompañando al crecimiento tisular normal y anormal<sup>1</sup>. En adultos sanos la renovación vascular es lenta y por lo tanto la angiogénesis ocurre en pocas ocasiones: en el útero durante el período menstrual, durante la cicatrización de heridas y durante el crecimiento muscular inducido por el ejercicio. En todos estos casos, la angiogénesis se activa por períodos breves. Por otro lado, en situaciones patológicas tales como en el crecimiento de tumores, artritis reumatoidea, psoriasis, o retinopatía asociada con diabetes o prematuridad, la angiogénesis ocurre en forma descontrolada.

**Vasculogénesis** es la formación de vasos sanguíneos in situ a partir de precursores endoteliales tal como

los angioblastos que se diferencian formando canales vasculares, los cuales tras un proceso de remodelado resultan en la formación de vasos sanguíneos. Este proceso es común durante la embriogénesis y en órganos de origen endodérmico como por ejemplo los pulmones. Se desconoce cuál es la relativa contribución de la vasculogénesis versus la angiogénesis en la formación de vasos sanguíneos específicos para un determinado órgano. Según datos de Noden<sup>2</sup>, los angioblastos, independientemente de su lugar de origen en el embrión, formarán canales vasculares apropiados para el sitio donde han sido transplantados. Estos experimentos indican que el control de la diferenciación de los vasos está determinada en gran parte por el tejido mesenquimático local (del órgano en cuestión), más que el lugar de origen de la célula endotelial *per se*.

Ambos procesos, angiogénesis y vasculogénesis, se han postulado durante la formación de los vasos sanguíneos renales. Hasta no hace mucho tiempo, se aceptaba que los vasos renales se originaban por angiogénesis a partir de ramificaciones de vasos extrarrenales preexistentes<sup>3</sup>. Esta hipótesis tenía su base en experimentos de trasplantes realizados entre diferentes especies en los que se transplantaban riñones embrionarios indiferenciados de ratón en la membrana corioalantoidea de perdiz o pollo. Luego de siete días, los riñones transplantados desarrollaban estructuras glomerulares quiméricas que contenían células endoteliales de perdiz, reconocibles por su característico núcleo oscuro con nucleolo prominente. A raíz de estos experimentos se concluyó que la membrana corioalantoidea "vascularizaba" los glomérulos del ratón. Debido a esos experimentos, por mucho tiempo se interpretó que la vascularización del riñón ocurría por angiogénesis a través de brotes capilares de vasos extrarrenales preexistentes (por ejemplo aorta y sus ramas) y no por vasculogénesis (formación de vasos in situ). Sin embargo, experimentos recientes desafían el origen exclusivamente angiogénico, extrarrenal de la vasculatura renal.

Por ejemplo, varios investigadores, utilizando marcadores vasculares específicos identificaron células precursoras vasculares en el riñón embrionario previo a su vascularización<sup>4,5</sup>. Utilizando anticuerpos específicos contra el Flk-1 [uno de los receptores del factor de

---

**Dirección postal:** R. Ariel Gómez, M.D., Genentech Professor of Pediatrics, Associate Chair for Research, Department of Pediatrics, University of Virginia Health Sciences Center, 300 Lane Road, MR4 Building, Room 2001, Charlottesville, VA 22908  
Fax: (804) 982-4328 E-mail: rg@hscmail.mcc.virginia.edu

crecimiento vascular endotelial (VEGF), presente en angioblastos y en células endoteliales diferenciadas], se demostró la presencia de precursores de células endoteliales en el riñón embrionario de rata previo al desarrollo vascular<sup>4,6</sup>. Observaciones similares se han hecho en otras especies, incluyendo ratones<sup>7</sup>. En nuestro laboratorio hemos demostrado que el blastema metanéfrico pre-vascular tanto de rata como de ratones, además de angioblastos, contiene células progenitoras de músculo liso vascular y de células que expresan renina. Estas células progenitoras contribuyen a la formación de las arteriolas del riñón<sup>5</sup>. Estos hallazgos indican que las células progenitoras no sólo se encuentran en el riñón embrionario previo al desarrollo vascular sino que además estas células poseen la capacidad de formar las arteriolas renales *in situ* a través del proceso de vasculogénesis (Fig.1). Esta hipótesis está sustentada por trabajos realizados en varios laboratorios. Abrahamson y sus colegas<sup>8</sup> implantaron riñones embrionarios prevasculares (11-12 días de gestación) dentro de la cámara anterior del ojo de ratones Rosa 26, que expresan  $\beta$ -galactosidasa en todas las células y se tornan azules tras la reacción de Xgal. Luego de 5-7 días *in oculo* los riñones transplantados se desarrollaron conteniendo vasos. De este modo, los investigadores concluyeron que la mayoría de las células endoteliales glomerulares y mesangiales derivan del riñón embrionario transplantado<sup>8</sup>. Los vasos

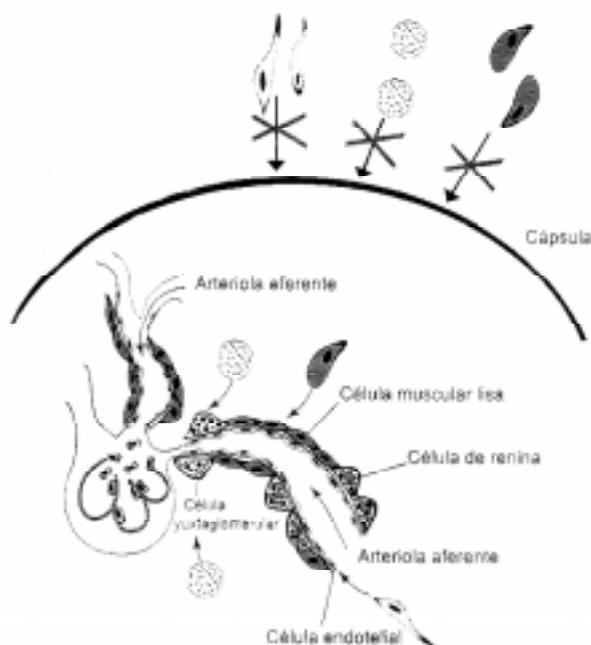


Fig. 1.- Conceptualización de la formación de la arteriola aferente renal mediante el proceso de vasculogénesis. Los precursores de las células que componen la arteriola aferente (células endoteliales, musculares lisas y de renina) se originan y diferencian *in situ* y no a partir de precursores extrarenales.

del huésped son importantes en el establecimiento de conexiones circulatorias adecuadas pero no contribuyen mayormente a la vasculatura glomerular. Resultados similares se obtienen cuando los trasplantes son colocados debajo de la cápsula renal de ratones adultos Rosa 26, o cuando se utilizan riñones embrionarios de ratones Flk-1, que expresan  $\beta$ -galactosidasa en las células endoteliales. Todos estos experimentos, más los realizados recientemente en nuestro laboratorio, sostienen la conclusión que no sólo las células endoteliales sino también las musculares lisas y las productoras de renina se originan y diferencian *in situ*, en el riñón embrionario metanéfrico (Fig. 1)<sup>5</sup>. En cambio, si el riñón huésped es de un ratón recién nacido, cuando todavía está ocurriendo el desarrollo nefrovascular, se forman vasos quiméricos que contienen células endoteliales tanto del donante como del huésped. Estos datos sugieren que los precursores vasculares todavía presentes en la corteza neonatal del riñón del huésped tienen el potencial de diferenciarse e integrarse con la microvasculatura del riñón embrionario en desarrollo<sup>8</sup>. Tufro y colaboradores<sup>9</sup> cultivaron riñones metanéfricos avasculares embrionarios de rata a los 14 días de gestación sobre células endoteliales marcadas y demostraron que las células endoteliales glomerulares invadieron el órgano metanéfrico formando estructuras tipo capilar alrededor y adentro de los nefrones en formación. Este proceso se amplifica con baja concentración de oxígeno (3% O<sub>2</sub>) y se previene con anticuerpos neutralizantes contra el VEGF, sugiriendo que el VEGF producido por los nefrones en diferenciación actúa como un quimioatrayente dirigiendo a los capilares en formación durante el desarrollo metanéfrico *in vitro*<sup>9</sup>. Estos experimentos, más allá de haber sido realizados *in vitro* sugieren que la angiogénesis también es posible bajo ciertas condiciones experimentales. Más aún, pareciera que tanto la angiogénesis como la vasculogénesis son posibles en el desarrollo de la vasculatura renal dependiendo del potencial de desarrollo de las células en cuestión. No es claro todavía cuánto contribuye cada uno de estos procesos en el desarrollo de la vasculatura del riñón en condiciones normales. Sin embargo, pareciera que las arteriolas más pequeñas y los capilares se forman por vasculogénesis mientras que las arterias más grandes lo hacen por angiogénesis.

## Regulación del desarrollo vascular

Los mecanismos involucrados en el desarrollo vascular renal han comenzado a ser dilucidados. En la tabla 1 se muestra una lista parcial de moléculas que se cree que participan en el crecimiento vascular. Se ha demostrado que el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y sus receptores (Flk-1, Fit-1)

participan en el desarrollo de los capilares glomerulares<sup>6,10,11</sup>. Estos receptores están presente en angioblastos del riñón embrionario de rata (E14) previo a la formación de vasos. Los angioblastos parecen formar cordones antes de diferenciarse en células endoteliales. A los 19 días de gestación el VEGF se detecta en células epiteliales glomerulares y tubulares y ambos receptores se expresan en células endoteliales contiguas. Al cultivar riñones embrionarios prevasculares, éstos forman nefrones, pero no desarrollan vasos sanguíneos. Sin embargo, si se trata a los mismos riñones embrionarios con VEGF recombinante humano, los riñones aumentan su masa endotelial, probablemente como un resultado de vasculogénesis<sup>10</sup>. Todos estos datos sugieren que el VEGF tiene un rol crucial en la vascularización del riñón promoviendo la diferenciación de las células endoteliales y la formación de capilares. El crecimiento de los vasos renales parece depender de la regulación que ejerce la concentración tisular de oxígeno sobre el VEGF<sup>10</sup>. Como hemos mencionado anteriormente, cuando los riñones embrionarios se cultivan a la concentración atmosférica de oxígeno habitual, los vasos no se desarrollan, pero al cultivarlos en una atmósfera que contiene 5% de oxígeno, los capilares se desarrollan dentro y fuera de los glomérulos. Este efecto se inhibe con anticuerpos contra el VEGF. La señal que media esta respuesta parece involucrar un aumento en la síntesis del VEGF, que a su vez induce la diferenciación, proliferación y ensamblado de los angioblastos en tubos endoteliales. En estas condiciones *in vitro*, sin embargo, las arteriolas renales no se desarrollan sugiriendo que un mecanismo diferente regula la diferenciación de la pared muscular y ensamblado arteriolar. Como se describe arriba, si los riñones embrionarios prevasculares se transplantan bajo la cápsula renal de otro ratón, el riñón embrionario no sólo desarrolla nefrones sino que también desarrolla un sistema arterial renal similar al del feto cercano a término. Estos experimentos indican que el riñón del huésped provee señales apropiadas para que las arteriolas renales adopten su característica morfología y posición anatómica.

El factor de crecimiento transformador  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ ) ejerce un rol en el desarrollo vascular renal. Se ha demostrado que tras la infusión de anticuerpos neutralizantes contra TGF  $\beta 1$  en los riñones de ratas recién nacidas, las células endoteliales glomerulares no se desarrollan adecuadamente<sup>12</sup>.

Las efrinas son proteínas ancladas al glucosilfosfatidilinositol, ubicadas en la superficie celular (Efrina A) o a través de la membrana celular (Efrina B)<sup>13</sup>. Estos ligandos asociados a la membrana se unen a receptores de la familia de la tirosina quinasa llamados Eph (erythropoietin-producing hepatocellular receptor), y tienen una distribución extremadamente restringida y por ende especificidad. En el riñón neonatal en desarrollo,

el Eph B1 está distribuido en estructuras similares al receptor Flk-1: glomérulos en desarrollo, vasos y angioblastos. En el sistema nervioso central este sistema único regula la dirección hacia dónde (a modo de blanco) se dirigen los axones. La Efrina B1 es inductora *in vitro* del ensamblado de las células de la microvasculatura renal en tubos capilares. La Efrina A1 es angiogénica en la córnea del conejo e inductora de respuestas quimiotáticas en células endoteliales que expresan los receptores Eph A2. Estos datos sugieren que las efrinas pueden mediar la distribución espacial de las células endoteliales luego de haber adquirido su fenotipo diferenciado.

Otro sistema involucrado en el desarrollo vascular es el sistema de las Angiopoyetinas, compuesto por la Angiopoyetina-1 (Ang-1) que actúa a través de un receptor tirosina quinasa (Tie-2 / Tek) expresado únicamente en células endoteliales y en células hematopoyéticas tempranas, y la Angiopoyetina-2 (Ang-2) que también se une al Tie-2 antagonizando a la Ang-1<sup>14,15</sup>. Tie-1 es un receptor huérfano de tirosina quinasa que puede tener un rol en la formación de vasos metanéricos. Los ratones sin este gen mueren hacia el final de la gestación con alteraciones vasculares<sup>16,17</sup>. Ang-1 y Tie-2 se expresan en el glomérulo (Ang-1 fue localizada en la periferia, donde se encuentran los podocitos y Tie-2 dentro del glomérulo, donde residen las células endoteliales y mesangiales) y pueden ser importantes en la formación y / o mantenimiento de los capilares glomerulares y en el desarrollo de los capilares de los vasa recta. Ang-2 se cree que actúa como un antagonista natural de Ang-1 para modular la formación de la microcirculación<sup>15</sup>, pero todavía deberá ser confirmado. Se ha postulado que la Ang-2 tiene una actividad sinérgica con el VEGF colaborando con los brotes vasculares invasores al bloquear la función

TABLA 1.- Principales factores implicados en la vascularización del riñón.

Factores	Receptores
VEGF	Flk-1 Flt-1
TGF $\beta$ 1	ALK-1 ALK-5
Efrinas A 1-2 B	Eph
PDGF-B	PDGF-RB
Familia Ets (Ets-1, TEL)	
Angiopoyetinas 1-2	Tie-2 (Tek)
Sistema renina-angiotensina	

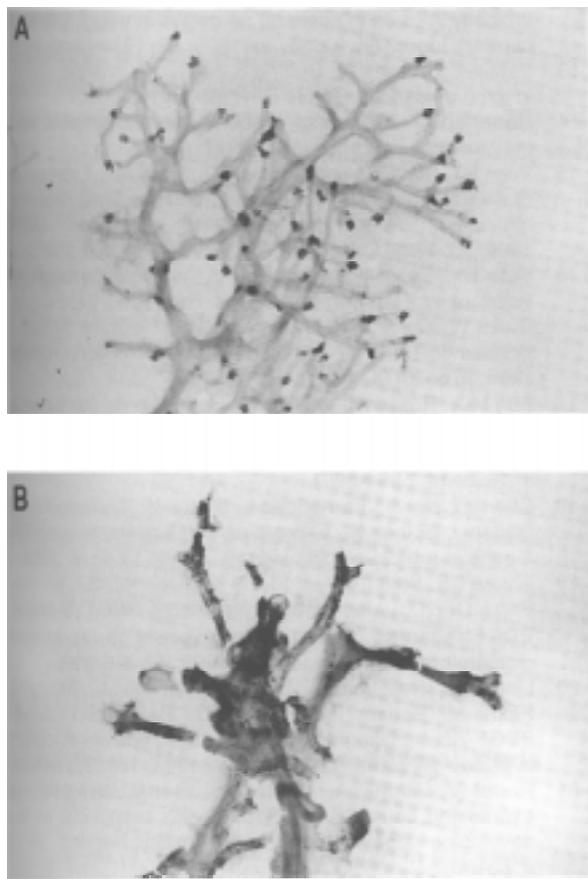


Fig. 2.- Arteriolas preglomerulares renales obtenidas usando microdissección. Las arteriolas están inmunoteñidas para renina (color marrón). A) Vasculatura y distribución de renina en un ratón normal. B) Disminución, engrosamiento y acortamiento de las arteriolas renales con extensión de la renina a lo largo del árbol vascular en un ratón con delección del gen del angiotensinógeno (knock out). (250X)

estabilizadora de la Ang-1, mientras que en ausencia de VEGF, la inhibición de una señal constitutiva de la Ang-1 puede contribuir a la regresión de los vasos.

Ets es una familia de factores de transcripción que regulan una cascada de genes involucrados en hematopoyesis (CSF-1, CDD18), transcripción de renina, diferenciación de la célula endotelial (VEGF, Flk-1, Flt-1) y actividad de proteasa (MMP-1, u-PA). Los ratones con mutaciones nulas del gen Ets-1 presentan varias anomalías renales, predominantemente a nivel de los capilares glomerulares<sup>18</sup>.

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) B se une tanto al receptor de PDGF  $\alpha$  como al  $\beta$ . El PDGFB funciona como señal para reclutar pericitos y otros miofibroblastos hacia los vasos en desarrollo, y se expresa en el riñón humano en desarrollo en células epiteliales del nefrón mientras que el receptor  $\beta$  en cé-

lulas intersticiales y en el mesénquima indiferenciado<sup>19</sup>. Están probablemente involucrados en la diferenciación de las células mesangiales, debido a que los ratones con mutaciones nulas del PDGFB o del receptor  $\beta$  no desarrollan células mesangiales ni capilares glomerulares<sup>20</sup>.

A pesar de los avances significativos que se han realizado para el entendimiento de la morfogénesis de los capilares glomerulares, el proceso de formación de las arteriolas renales no es tan claro aún. Como hemos mencionado anteriormente, las células endoteliales, musculares lisas y de renina, se desarrollan *in situ* a partir de progenitores mesenquimáticos que se encuentran en el blastema metanéfrico. Los mecanismos involucrados en el ensamblado de las arteriolas son aún desconocidos. Es muy probable que las células musculares lisas y de renina sigan al endotelio en desarrollo en respuesta a señales no identificadas aún. Numerosos trabajos han mostrado una relación témporo-espacial entre las células de renina y la ramificación de las arteriolas renales. Estos datos invitan a especular que las células de renina podrían regular este proceso, directa o indirectamente, mediante la generación de angiotensina(s). Nosotros hemos demostrado que el sistema renina-angiotensina participa en la ramificación de las arteriolas renales<sup>21</sup>. El tratamiento de ratas durante el período neonatal (cuando la mayor parte de la ramificación arteriolar está ocurriendo) con inhibidores del sistema renina-angiotensina lleva a una detención en la ramificación de las arteriolas renales (Fig. 2). Además de disminuir en número, las arteriolas son más cortas y gruesas con acumulación concéntrica de células musculares lisas. Hemos especulado que la falta de angiotensina lleva a un desarrollo inmaduro de las células musculares lisas, quienes crecen excesivamente en forma concéntrica como si las células inmaduras hubieran perdido su orientación apropiada. Se han observado anomalías vasculares similares al inactivar ("gene targeting") los genes de la enzima convertidora de angiotensina, de los receptores de angiotensina, de angiotensinógeno y los de renina (Fig. 2). Es interesante que el desarrollo vascular aberrante se acompaña de una variedad de anomalías histológicas incluyendo inmadurez glomerular, formación de quistes y alteraciones de la arquitectura renal. Las alteraciones son similares a las que se encuentran en humanos tratados prenatalmente con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina<sup>22</sup>.

En resumen, se han realizado grandes progresos en la identificación individual de genes, moléculas y señales que participan en el desarrollo vascular del riñón. El próximo desafío será identificar los patrones de activación de los genes y la secuencia de eventos que llevan al ensamblado preciso y arreglo espacial de la vasculatura renal.

## Referencias

1. Risau W. Vasculogenesis, Angiogenesis and Endothelial Cell Differentiation during Embryonic Development. In *Issues in Biomedicine. The Development of the Vascular System*. Eds (Feinberg R.N., Sherer G.K., Auerbach R.) Karger, New York. 1991; Vol 14: 58-68.
2. Noden DM. Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1097-1103.
3. Saxen L. *Developmental and Cell Biology Series: Organogenesis of the Kidney*. Cambridge University Press, 1987; New York. 1-173.
4. Gomez RA, Norwood VF, TufroMc-Reddie A. Development of the kidney vasculature. *J Micro Res* 1996.
5. Sequeira Lopez MLS, Chekuri L, Lindsey J, Pentz RD, Tufro A, Robert B, Abrahamson DR, RA. Origin of the Juxtglomerular (JG) cell. 1999; *JASN* 10: 410 A.
6. Tufro-McReddie A, Norwood VF, Gomez RA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces nephrogenesis and endothelial cell differentiation during kidney development. *JASN* 1995; 6: 779-779.
7. Loughna S, Landels E, Woolf AS. Growth factor control of developing kidney endothelial cells. *Exp.Nephrol.* 1996, 4: 112-118.
8. Abrahamson DR, Robert B, Hyink DP, St. John PL, Daniel TO. Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney Int* 1998; 54: S7-S11
9. Tufro A, R. Gomez R. VEGF spatially directs angiogenesis in metanephric development in vitro. *JASN* 199; 9: 369A.
10. Tufro-McReddie A, Norwood VF, Aylor K, Botkin S, Carey RM, Gomez RA. Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. *Dev Biol* 1997; 183: 139-149.
11. Kitamoto Y, Tokunaga H, Tomita K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: Glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99: 2351-2357.
12. Liu A, Dardik A, Ballerman BJ. Neutralizing TGF- $\beta$ 1 antibody infusion in neonatal rat delays in vivo glomerular capillary formation. *Kidney Int* 1999; 56: 1334-1348.
13. Varela-Echavarria A., Guthrie S. Molecules making waves in axon guidance. *Genes Dev* 1997, 11: 545-557.
14. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
15. Yuan HT, Suri C, Yancopoulos GD, Woolf AS. Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and the Tie-2 receptor tyrosine kinase during mouse kidney maturation. *JASN* 1999; 10: 1722-1736.
16. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases tie-1 and tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70-74.
17. Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinases TIE is required for the integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 1995; 14: 5884-5891.
18. Chernavvsky D, Fernandez L, Barton K, Muthusamy N, Leiden J, Gomez R. Expression and function of the ETS-1 gene in the developing kidney. *JASN* 1999; 9: 360A.
19. Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, JohnsonRJ, Bowen-Pope DF. Developmental patterns of PDGF B-chain, PDGF-receptor, and  $\alpha$ -actin expression in human glomerulogenesis. *Kidney Int.* 1992; 42: 390-399.
20. Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, Karlsson L, Pekny M, Pekna M, Soriano P, Betsholtz C. Paracrine PDGF-B/PDGF-RB signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* 1998; 125: 3313-3322.
21. Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, Gomez RA. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 63-71.
22. Shotan A, Widerhorn J, Hurst A, Elkayam U. Risks of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition During Pregnancy: Experimental and Clinical Evidence, Potential Mechanisms, and Recommendations for Use. *Am J Med* 1994; 96: 451-456.