UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS FERREIRA DE ALMEIDA

Influência da Vitamina D no desenvolvimento renal em ratos

Ribeirão Preto - SP
2021

LUCAS FERREIRA DE ALMEIDA

Influência da Vitamina D no desenvolvimento renal em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências (área de concentração: Fisiologia). Versão corrigida.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Terezila Machado Coimbra

Ribeirão Preto - SP
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Almeida, Lucas Ferreira de

Influência da Vitamina D no desenvolvimento renal em ratos / Lucas Ferreira de Almeida; orientadora: Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra. - 2021.

Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Versão Original

Nome: ALMEIDA, Lucas Ferreira de

Título: Influência da Vitamina D no desenvolvimento renal em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
doutor em Ciências (área de concentração: Fisiologia).

Aprovado em: __/__/__

Banca examinadora:

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, **Jaime Pinto Ferreira e
Tereza Marques Ferreira.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos vários amigos e colegas que tive o privilégio de conhecer durante esses anos de jornada.

Ao incentivo da minha orientadora Prof^ª Dr^a Terezila Machado Coimbra, que foi fundamental, dando-me a oportunidade e coragem necessária para embarcar neste longo projeto; sua generosidade e carinho para comigo e minha pesquisa serão especialmente lembrados. Obrigado pela aposta, pelo incentivo, pelo suporte e pela confiança, por ter me dado esta chance única de ingressar no laboratório e ter me ensinado muito durante esses anos, dando a oportunidade de aprender e sempre cobrando a responsabilidade que um pesquisador tem que ter em sua carreira; sem dúvida carregarei esse ensinamento comigo por toda a minha vida como pesquisador. Obrigado por me permitir voar, experimentar, errar e acertar. A você meu profundo respeito e admiração.

Gostaria também de agradecer a Dr^a Heloisa Della Coletta Franscscato, que trabalhou ao meu lado durante o decorrer desse trabalho, sempre me ensinando e me apoiando, e com a generosidade e a paciência de ensinar. Torço muito pelo seu sucesso.

À Cleonice Giovanini, que sem sua ajuda certamente a conclusão deste trabalho seria muito difícil, pois você sabe as dificuldades que tive na realização deste trabalho.

À amizade da Beatriz, Amanda e da Cláudia como companheiras de laboratório e colaboradoras de grande aprendizado durante esses anos.

Ao Dr. Roberto Silva Costa, por todo o suporte e apoio prestados durante alguns procedimentos do trabalho e avaliação criteriosa dos resultados dos estudos histológicos.

Ao Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, por ter concordado com as minhas idéias e ter colaborado ativamente para esse estudo, serei sempre muito grato por essa colaboração.

Aos funcionários do laboratório de Patologia da FMRP-USP, pelo suporte técnico prestado durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários e queridos colegas do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, por todo o auxílio e incentivo.

Aos funcionários da secretária do Departamento de Fisiologia, da FMRP-USP pelo auxílio prestado durante a realização do projeto.

Ao Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues *e* ao Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes *e* aos alunos *do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica* da FMRP-USP, pela dedicação a este projeto e pela oportunidade de colaboração.

Ao Prof. Dr. Boye L Jensen por me receber em seu Departamento e me ensinar tanto durante meu intercâmbio. À Profa. Dra. Kirsten Madsen por me abrir as portas de seu Laboratório e por estar sempre presente, um exemplo de cientista cuja a ciência sempre foi o norte da sua carreira.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por me receberem nesses 7 anos e me cederem subsídios e estrutura para a realização desse estudo.

Ao Department of Cardiovascular and Renal Research da University of Southern Denmark e todo o corpo de funcionários por me receberem muito bem e me cederem subsídios e estrutura para a realização desse estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2017/07118-8 e 2019/02490-, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo indispensável auxílio financeiro desse estudo, o que o tornou possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

“A seleção natural é o maior guindaste de todos os tempos. Ela elevou a vida da simplicidade primeva a altitudes estonteantes de complexidade, beleza e aparente desígnio que hoje nos deslumbram”.

Richard Dawkins

RESUMO

Almeida, L.F. **Influência da Vitamina D no desenvolvimento renal em ratos**

2021 Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A vitamina D (Vit. D) está envolvida na proliferação e diferenciação celular e na regulação do gene da renina que são eventos importantes da nefrogênese e quiescência, fundamentais para a saúde renal na idade adulta. Este estudo avaliou os mecanismos angiogênicos envolvidos em distúrbios renais de longo prazo induzidos pela deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal e sua consequência na idade adulta em ratos. A prole de ratos Wistar Hannover de primeira geração de mães alimentadas com dieta controle (grupo controle, GC) ou dieta deficiente em Vit. D (grupo Vit. D-) foi avaliada. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida mensalmente durante os primeiros 6 meses após o nascimento e amostras de sangue e urina foram coletadas para avaliar a função renal no 3º e no 6º mês de idade. Foram quantificados óxido nítrico (NO), angiotensina II (ANGII), corticosterona, oxitocina, peptídeo natriurético atrial, vasopressina, hormônio da paratireoide, cálcio e Vit. D nessas amostras. Os rins foram então removidos para estudos morfométricos, imunoistoquímicos, dosagem de NO, e *Western blot*. Avaliamos também a expressão do fator de crescimento vascular e das angiopoietinas 1 e 2 e seus receptores no tecido renal, uma vez que este eixo renal intrínseco é responsável pela quiescência endotelial. Comparado ao GC, o grupo Vit. D- apresentou aumento da PAS, maiores níveis plasmáticos de ANG II, e aumento na expressão de renina e do receptor do tipo 1 de ANG II no tecido renal. Foram observados rarefação capilar e desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos. Esses dados indicam a participação importante da Vit. D durante o desenvolvimento renal para a manutenção da integridade da função renal na idade adulta.

Palavras-chave: Angiotensina II. Deficiência de vitamina D. Desenvolvimento renal. Vasculatura renal.

Abstract

Almeida, L.F. **Influence of Vitamin D on renal development in rats.** 2021 Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Vitamin D (Vit.D) is involved in cellular proliferation and differentiation and regulation of the renin gene, which are important events of nephrogenesis and quiescence of maintaining renal health in adulthood. This study evaluated the angiogenic mechanisms involved in long term renal disturbances induced by Vit.D deficiency during the renal development persistent in adulthood in rats. First-generation male Hannover offspring from mothers fed either with a control diet (control group, CG) or Vit.D-deficient diet (Vit.D- group) were evaluated. Systolic blood pressure (SBP) was measured monthly during the first 6 months after birth, and blood and urine samples were collected to evaluate renal function. Nitric oxide (NO), angiotensin II (ANGII), parathyroid hormone (PTH), calcium, and Vit.D were measured in serum samples. The kidneys were then removed for morphometric, NO, immunohistochemical, and Western blot studies. We also evaluated the expression of vascular growth factor (VEGF) and angiopoietins 1 and 2 and their receptors in renal tissue since this intrinsic renal axis is responsible for endothelial quiescence. Compared to CG, the Vit.D group presented higher SBP, ANG II plasma levels, renin expression, and AT1 receptor expression levels. Capillary rarefaction was observed, as well as an imbalance between pro- and anti-angiogenic factors. The present findings support the role of Vit.D in the renal development for maintaining the integrity of renal microcirculation.

Keywords: Angiotensin II. Vitamin D deficiency. Renal development. Renal Vasculature.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 Desenvolvimento normal dos rins.....	27
1.2 Fatores pró e anti-angiogênicos.....	29
1.3 Sistema renina-angiotensina no desenvolvimento renal.....	31
1.4 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal e seus efeitos adversos.....	34
2. HIPÓTESE.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivos gerais.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Animais e dieta.....	41
4.2 Delineamento experimental.....	41
4.3 Protocolos experimentais adicionados.....	43
4.4 Avaliação do peso corporal e da ingestão de líquidos e ração.....	44
4.5 Pressão arterial sistólica (PAS).....	44
4.6 Dosagem de AVP e OT.....	45
4.7 Dosagem de corticosterona.....	46
4.8 Dosagem de ANG II e ANP.....	47
4.9 Dosagem de Vit. D e cálcio sérico.....	47
4.10 Avaliação da função renal.....	48
4.11 Quantificação da carga excretada de albumina.....	48

4.12 Determinação indireta de NO plasmático e tecidual pela dosagem de nitrato.....	48
4.13 Coleta tecidual para quantificação de NO.....	49
4.14 Dosagem de proteína total.....	49
4.15 Estudos histológico e morfométrico.....	49
4.16 Imunoistoquímica.....	50
4.17 Análises por Western blot.....	51
4.18 Análise dos dados.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1 Dados maternos e da prole.....	55
5.2 Dados de ganho de peso da prole durante a lactação.....	57
5.3 Peso corporal, ingestão de líquidos e consumo de alimentos na prole com 3 e 6 meses de idade.....	57
5.4 Quantificação de 25(OHD3), parâmetro (PTH) e Cálcio (Ca ²⁺).....	58
5.5 Função renal e excreção urinária de albumina.....	59
5.6 Análises histológicas e morfométricas.....	60
5.7 Efeito da deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal na bordadura em escova e no receptor de cubulina das células dos túbulos renais nas proles de 3 e 6 meses de idade.....	61
5.8 Estudo da barreira de filtração glomerular.....	62
5.9 Participação da Vit. D no desenvolvimento e na diferenciação da microvasculatura renal.....	63
5.10 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal e comprometimento no sistema do eNOS-NO na vida adulta.....	65
5.11 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal ocasionou distúrbio no sistema renina angiotensina na vida adulta.....	67

5.12 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal e níveis plasmáticos de corticosterona, oxitocina e peptídeo natriurético atrial.....	68
5.13 Desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos em resposta a deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal.....	69
6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS.....	88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Desenvolvimento renal.

Figura 2- Participação dos fatores pró e anti-angiogênicos no desenvolvimento vascular renal.

Figura 3- Sinalização das Angiopietinas 1 e 2 com seu receptor Tie-2.

Figura 4- Desenvolvimento vascular renal.

Figura 5- Imagem representativa do protocolo experimental.

Figura 6- Imagem representativa do protocolo experimental.

Figura 7- Sistema utilizado para a determinação da PAS por pletismografia de cauda.

Figura 8- Ganho de peso corporal das ratas dos grupos controle e dieta sem Vit. D (S/VITD) durante o período de gestação (21 dias) e lactação (21 dias).

Figura 9- Níveis séricos de vitamina D (25OHD), logo após a lactação, de ratas que receberam dieta padrão (DP) e dieta sem Vit.D (S/VITD).

Figura10- Peso corporal em gramas, do nascimento ao final da lactação das proles de mães que receberam dieta padrão e proles de mães que receberam dieta S/VITD.

Figura 11- Níveis séricos de vitamina D (25OHD), na prole de ratas que receberam dieta padrão (DP) e dieta sem Vit. D (S/VITD) com 3 e 6 meses de idade.

Figura 12- Avaliação da pressão arterial sistólica por pletismografia.

Figura 13. Efeito da deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento na estrutura renal durante a vida adulta.

Figura 14- Imunolocalização e escore para o receptor de Vit. D, cubulina, no túbulo proximal dos grupos controles e experimentais.

Figura 15- Imunolocalização para sinaptopodina nos glomérulos dos grupos controles e experimentais.

Figura 16- Imunolocalização para JG12 e quantificação dos vasos positivos para marcação endotelial (JG12) no tecido renal dos animais dos grupos controles e experimentais.

Figura 17- Efeito da deficiência de Vit. D na diferenciação da microvasculatura renal.

Figura 18- Efeitos da deficiência de Vit. D na expressão da renina, ANGII e receptor AT1 no tecido renal e plasma.

Figura 19. Efeitos da deficiência de Vit. D nos níveis plasmáticos de corticosterona (CO), oxitocina (OT), peptídeo natriurético atrial (ANP) e vasopressina (AVP).

Figura 20- Desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos provocas pela deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal.

Figura 21. Alterações ocasionadas pela deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das dietas usadas no protocolo experimental.

Tabela 2- Escores utilizados para análise imuno-histoquímica.

Tabela 3- Composição da Dieta Padrão: ratas lactantes com ingestão de dieta padrão (Grupo Controle, GC) e da Dieta S/Vit.D: ratas lactantes com ingestão de dieta sem Vit.

Tabela 4- Peso corporal, ingestão de líquidos e consumo de alimentos na prole com 3 e 6 meses de idade

Tabela 5- Níveis de 25(OHD3), paratormônio (PTH) e Cálcio (Ca^{2+}) no plasma.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANGII	Angiotensina II
Angpt-1	Angiopietina 1
Angpt-2	Angiopietina 2
Angpts	Angiopietinas
AT ₁	receptor de angiotensina II do tipo 1
AT ₂	receptor de angiotensina II do tipo 2
α -SMA	<i>alpha-smooth-muscle actin</i>
ANOVA	Análise de Variância para Comparações Paramétricas
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de ANG II
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FGF-23	<i>Fibroblast Growth Factor-23</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
IAA	Iodoacetamida

IEF	<i>Isoelectric Focusing</i>
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein-3</i>
IL-6	Interleucina 6
kDa	kiloDalton
mA	Miliamper
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFkB	Fator nuclear-kappa B
PAS	Pressão arterial sistólica
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superóxido dismutase
ATF	Ácido trifluoroacético
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
VDR	Receptor nuclear da Vitamina D
VDBP	Proteína carreadora da Vitamina D

VDREs	Elementos responsivos da Vitamina D
Vit.D-	Dieta sem Vitamina D
7-DHC	7-deidrocolesterol

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	Cálcio
dL	Decilitro
g	Gramas
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
K^{+}	íon potássio
Kg	Kilograma
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmol
n	Número
Na^{+}	íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	micrômetro
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius

1. INTRODUÇÃO

O processo através do qual os efeitos adversos de um insulto ambiental no início da vida, especialmente no útero, podem predispor à doença durante a vida adulta é conhecido como "programação fetal" ou plasticidade do desenvolvimento (Nejad *et al.*, 2006). A "programação fetal" refere-se à constatação de que um estímulo ambiental adverso experimentado durante um período crítico do desenvolvimento intra-útero e/ou na infância causa alterações estruturais e funcionais no desenvolvimento do organismo, que persistem ao longo da vida (Nejad *et al.*, 2006).

O conceito de "programação" foi primeiramente descrito por David Barker e Clive Osmond no final da década de 80, que observaram que o aumento do surgimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 na vida adulta está relacionado ao baixo peso do recém nascido (Barker & Osmond 1988; Barker 1996). Esse conceito sugere que o feto se adapta ao ambiente intrauterino, moldando estrutura e função dos órgãos em desenvolvimento, promovendo alterações fisiológicas que permanecem durante a vida (Bebenko *et al.*, 2015).

A associação entre eventos intrauterinos e doenças renais tem sido citadas nos últimos anos (Moritz *et al.*, 2003). Diversos estudos tem demonstrado que a redução do número de nefros está associada com perturbações que ocorrem durante o desenvolvimento renal, levando a consequências na vida adulta, como o aumento da pressão arterial e doença renal (Louey *et al.*, 2002; Dodic *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2003). A relação é aplicável a recém-nascidos que experimentam restrições de crescimento intrauterino e, portanto, são pequenos para a idade gestacional e tem sido associada a, por exemplo, restrição de proteína na dieta (Khorram *et al.*, 2007), exposição a altos níveis de glicocorticóides (Khorram *et al.*, 2014) e alterações no sistema renina-angiotensina (SRA) (Naddem *et al.*, 2015; Cragan *et al.*, 2015.).

1.1 Desenvolvimento normal dos rins

Nos humanos, os rins se desenvolvem até a 36^o semana gestacional e qualquer déficit de néfro ou alterações vasculares nessa fase serão permanentes. Os rins se desenvolvem através de 3 estágios: pró, meso e metanefros, sendo que este último dará origem ao rim permanente. O desenvolvimento dos néfros no rim permanente começa na 5^o semana gestacional e aproximadamente no dia embrionário (E) 11–12 nos roedores (McMahon, 2016.; Little, & McMahon., 2012). O broto uretérico (BU) induz o mesênquima a se transdiferenciar em epitélio

tubular e glomerular, enquanto o mesênquima induzido estimula o crescimento e a ramificação contínuos do BU (Schell *et al.*, 2014) (Figura 1). O mesênquima induzido condensa em torno da extremidade dos ramos do BU, dando origem primeiro a uma vesícula (*renal vesicle*) e depois uma estrutura em forma de vírgula (*comma-shaped body*) e em seguida é formado um corpo em forma de S (*S-shaped body*) (Figura 1). Nesse estágio, os túbulos distais e proximais podem ser distinguidos e o prolongamento dos túbulos continua como uma convolução dos mesmos. Em humanos, a nefrogênese é concluída no período anterior à semana 36, enquanto continua até os dias 7 a 10 pós-natal (P) em roedores (Madsen *et al.*, 2010). O BU e o mesênquima nefrogênico estromal expressam receptor do tipo 1 (AT1) da angiotensina II (ANGII) em roedores (Iosipiv & Schoeder, 2003). A ramificação inicial do BU depende do receptor AT1 e dos receptores do fator de crescimento epidermal (EGFRs) (Iosipiv & Schoeder, 2003) e indução de fatores de crescimento vascular (Kolatsi-Joannou, *et al.*, 2001; Satchell, *et al.*, 2002.)

Figura 1. Desenvolvimento renal. (A) Em mamíferos, o rim se desenvolve a partir do mesênquima metanefrítico após a invasão do botão ureteral para fora do ducto nefrítico. (B e C) O botão ureteral começa a se ramificar dentro do mesênquima metanefrítico em crescimento. (D) O mesênquima condensa ao redor das pontas do botão ureteral, formando o mesênquima. (E) As vesículas renais se formam a partir do mesênquima da capa condensada. (F) Uma fenda se desenvolve nos corpos em formato de vírgula. (G) Os progenitores de podócitos começam a atrair angioblastos no corpo em forma de S. (H) O néfron em desenvolvimento se conecta ao duto coletor (Schell *et al.*, 2014).

1.2 Fatores pró e anti-angiogênicos durante o desenvolvimento renal

Um dos fatores de crescimento vascular bastante conhecido durante o desenvolvimento renal é da família das angiopoietinas (Angpts), sendo o mais bem estudado a angiopoietina 1 (Angpt-1), que se liga e fosforila a tirosina do seu receptor endotelial Tie-2, também conhecida como receptor de tirosina kinase (RTKs ou TEK) (Papapetropoulos *et al.*, 1999). Outro membro da família das Angpts é a angiopoietina 2 (Angpt-2) que regula negativamente a sinalização do receptor Tie-2 induzida pela Angpt-1 (Maisonpierre *et al.*, 1997). Esses fatores de crescimento são fundamentais para o processo de angiogênese e vasculogênese durante o desenvolvimento renal e permitem a estabilização e quiescência endotelial ao longo da vida (Hanahan, 1997). Durante o desenvolvimento renal os capilares metanéfricos expressam genes Tie-2, enquanto o mesênquima metanéfrico, os túbulos em maturação e os podócitos maduros expressam Angpt-1, fornecendo assim um mecanismo de ajuste fino para sinalização através deste receptor (Woolf *et al.*, 2008) (Figura 2). É importante ressaltar que os efeitos biológicos *in vivo* das Angpts também dependem dos níveis do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A). No que diz respeito às ações de Angpt-2, a regressão dos vasos ocorre quando o VEGF-A está ausente, enquanto a desestabilização do vaso é seguida por angiogênese quando o meio local é rico em VEGF-A (Hanahan, 1997). De forma integrada, o equilíbrio desses fatores pró- e anti-angiogênicos são fundamentais para o desenvolvimento da microcirculação renal gerando respostas integradas que modulam a angiogênese e vasculogênese (Tufro-McReddie *et al.*, 1997; Eremina, *et al.*, 2003).

Figura 2. Participação dos fatores pró-e anti-angiogênicos no desenvolvimento vascular renal. Durante o estágio de alça capilar, os podócitos expressam VEGF-A, que induz a migração de precursores de células endoteliais positivas para receptor de VEGF (VEGFR) no mesênquima renal. Células endoteliais migram para a fenda vascular, proliferam e se diferenciam em associação íntima com os podócitos produtores de VEGF. As células mesangiais expressam receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1) e são atraídas para o desenvolvimento do tufo glomerular por células endoteliais glomerulares que expressam angiopoietinas 1 e 2 (Angpt-1 e 2). As conexões com o sistema tubular foram omitidas para clareza. Esquema proveniente de acervo próprio.

A angiogênese, isto é, o surgimento de novos vasos a partir da vasculatura existente, é um processo rigidamente controlado que desempenha um papel chave no desenvolvimento inicial do endotélio (Suri *et al.*, 1996). Embora o potencial para angiogênese seja mantido ao longo da vida de um organismo, uma vez que a vasculatura tenha sido estabelecida, o endotélio permanece quiescente no adulto. Essa quiescência vascular ocorre através de um equilíbrio entre os fatores de crescimento. A ligação da Angpt-1 ao receptor Tie2 promove a integridade dos vasos, inibe o vazamento vascular e suprime a expressão de genes inflamatórios (Thomas *et al.*, 2009). A Angpt-2 é armazenada nos corpos de *Weibel-Palade* e é rapidamente secretada e induzida sob estimulação, enquanto a Angpt-1 é expressa constitutivamente por pericitos e células do músculo liso vascular (Fiedler *et al.*, 2006). A ligação de Angpt-2 antagoniza, interrompendo completamente a sinalização protetora da Angpt-1/Tie2, levando assim à desestabilização e rarefação vascular no organismo adulto (Figura 3).

Figura 3: Sinalização das Angiopoietinas 1 e 2 com seu receptor Tie-2 (Medizenesche Hochschule Hannover). A Angpt1 é secretada constitutivamente pelas células murais perivasculares. A ligação do ligante de Angpt-1 ao receptor Tie-2 induz o sequestro da tirosina quinase e, assim, estabelece a expressão estável de VE-caderina na superfície da célula endotelial, mantendo a junção célula-célula. A Angpt-2 é armazenado em corpos *Weibel-Palade* e quando liberada se liga ao receptor Tie-2, atuando como um antagonista da Angpt-1, o que resultará na internalização da VE-caderina. Além disso, a sensibilização de células endoteliais para ligantes direcionados ao fator nuclear- κ B (NF- κ B), como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou fator de necrose tumoral- α (TNF- α), resulta na expressão de moléculas de adesão (selectinas, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM), molécula-1 de adesão de células vasculares (VCAM), que facilita a adesão de leucócitos, levando a rarefação vascular.

1.3 Sistema renina-angiotensina no desenvolvimento renal

Uma cascata de eventos durante o desenvolvimento renal é rigidamente regulada pelos receptores de ANGII, que são altamente expressos nos rins durante este período (Millan *et al.*, 1989). Assim, a integridade do SRA desempenha um papel fundamental na saúde fetal (Almeida & Coimbra, 2019). O desenvolvimento do rim é um processo altamente complexo que exige uma regulação precisa da proliferação, diferenciação e apoptose celular (Almeida & Coimbra, 2019; Moore *et al.*, 2020). A distribuição temporal e espacial dos receptores de ANGII do tipo 1 e 2 e seus RNAm durante o desenvolvimento renal tem sido estudado (Gao *et al.*, 2005; Norwood *et al.*, 1997; Kakuchi *et al.*, 1995). Um aumento no RNAm para AT1 pode ser detectado em glomérulos renais, vasos e córtex em ratos recém-nascidos, quando a

proliferação e diferenciação celular ocorrem simultaneamente (figura 4) (Almeida *et al.*, 2020). Kakuchi *et al.* (1995) relataram a presença do RNAm para AT2 em camundongos na região intersticial, que está em contato com os ductos coletores e, em menor extensão, com o mesênquima nefrogênico, evidenciando sua participação na diferenciação mesenquimal-epitelial e na apoptose, importantes eventos durante o desenvolvimento renal. A relação entre apoptose e a presença desses receptores resulta na remoção do excesso de mesênquima durante o desenvolvimento renal (Almeida & Coimbra, 2019). Song *et al.* (2011) hipotetizaram que o desenvolvimento anormal do sistema coletor em camundongos com deficiência de AT2 é, pelo menos parcialmente, devido à desregulação da morfogênese da ramificação do BU, bem como proliferação anormal de células do BU e apoptose. A ausência de estimulação do AT1 interfere no equilíbrio proliferação/apoptose por diferentes vias. Foi observado que o tratamento neonatal com bloqueador de AT1 em ratos leva a um aumento da apoptose (Balbi *et al.*, 2008; Marin *et al.*, 2013) e da proliferação celular, avaliada pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), na idade adulta (Almeida *et al.*, 2017). Além de estimular diretamente o crescimento celular, uma série de evidências experimentais têm demonstrado a importância da ANGII via AT1 no controle da síntese de vários fatores de crescimento para o desenvolvimento renal normal, bem como a expressão do VEGF e das Angpts e seus receptores (Almeida *et al.*, 2020) (Figura 4).

Svitok *et al.* (2019) analisaram diretamente os efeitos do aumento da ANGII durante o período pré-natal na prole. A ANGII foi administrada em ratas grávidas por meio de minibombas osmóticas e o desenvolvimento pós-natal foi analisado por meio do controle da pressão arterial. Os animais exibiram hipertensão e diminuição da sensibilidade ao sal em comparação com os controles. O tratamento pré-natal com ANGII levou ao aumento dos níveis de aldosterona e diminuição da atividade da renina plasmática, sugerindo uma complexa resposta fisiológica a ANGII. Esses efeitos levam a maior ativação do SRA durante o desenvolvimento, exercendo uma influência de longo prazo sobre a saúde da prole.

O SRA pode regular positivamente a sinalização da Angpt-2/Tie-2 e pode até mesmo permitir que Angpt-2 exerça sua atividade ainda que na ausência de Tie-2 por meio de sinalização após a Angpt-2 se ligar e ativar as integrinas, levando a formação vascular renal prejudicada e desestabilização endotelial na idade adulta (OTANI *et al.*, 2001). Assim, a integridade do SRA durante o desenvolvimento renal é de suma importância, e um desequilíbrio desse sistema, pode ocasionar diversas anormalidades no desenvolvimento renal (Marin *et al.*, 2013; Madsen *et al.*, 2010).

Figura 4. Desenvolvimento vascular renal. ANG II exerce um efeito estimulador do crescimento (hipertrofia, proliferação e migração) através da ativação dos receptores AT1. Em contraste, a ligação da ANG II aos receptores AT2 pode induzir apoptose, um evento importante durante o desenvolvimento renal, para remover o excesso de matriz extracelular e células indiferenciadas. Outra função da ANG II é a indução de fatores de crescimento vascular, tais como as Angiopoietinas 1 e 2, VEGF e seus receptores. ANG II também estimula componentes da matriz extracelular e adesão molecular. Sua expressão coordenada é um pré-requisito para um desenvolvimento vascular. A Vit. D modula negativamente o SRA suprimindo o gene da renina, apresentando também papéis diretos e indiretos no ciclo celular e na proliferação, diferenciação e apoptose celular, eventos importantes para um desenvolvimento renal adequado. Esquema proveniente de acervo próprio.

1.4 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal e seus efeitos adversos

A deficiência de Vit. D está aumentando nas sociedades ocidentais e ressurgindo como um problema de saúde pública (Holick, 2007;). Globalmente, estima-se que cerca de 1 bilhão

de pessoas tenham insuficiência ou deficiência de Vit. D (Holick, 2007; Holick, 2008). A deficiência de Vit. D em mulheres grávidas se tornou um fenômeno muito comum (Mulligan *et al.*, 2010; Bardonoso *et al.*, 2016; Triunfo *et al.*, 2016).

Vit. D tem efeitos pleiotrópicos que vão além de seu papel tradicional na homeostase do cálcio e fósforo. Mais de 200 genes com elementos de resposta ao receptor de Vit. D (VDREs) influenciam direta ou indiretamente o ciclo celular, como proliferação, diferenciação e apoptose celular, eventos importantes durante o desenvolvimento renal (Ramagopalan *et al.*, 2010).

O primeiro estudo correlacionando a deficiência de Vit. D materna e distúrbios renais na prole foi conduzido por Maka *et al.* (2007). Esse estudo demonstrou que a deficiência de Vit. D materna em ratos leva a alterações no desenvolvimento renal na prole, com retardo da maturação glomerular e aumento do número de glomérulos. Nascimento *et al.* (2012) analisaram as proles de mães deficientes de Vit. D durante a gestação e lactação. Os autores, observaram, nas proles, um aumento da expressão dos componentes do SRA, como a renina e o AT1, evidenciando que os níveis de Vit.D da gestante podem modular o SRA intrarenal do feto. Esses dados corroboram com achados da literatura que demonstram que a Vit. D atua como um modulador negativo do gene da renina (Li *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2007, Freundlich *et al.* 2008) atuando através da inibição da transcrição do CREB (*cAMP response element-binding protein*), que é necessário para a expressão do gene da renina (Li *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2007).

A deficiência de Vit.D provoca aumento da síntese de renina, gerando maior quantidade de ANGII ativando AT1 e AT2, prolongando a fase de proliferação e aumentando a apoptose durante o desenvolvimento renal, respectivamente. Essas alterações, se permanentes, podem provocar diversos distúrbios na vida adulta. Animais deficientes de VitD durante a gestação podem apresentar os túbulos proximais pouco diferenciados o que reduz a reabsorção da Vit.D e síntese da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o componente ativo da Vit.D, pelas células dos túbulos renais desses animais ao longo da vida. O desenvolvimento da microcirculação renal pode ser prejudicado, sendo que o SRA possui papel chave nos fatores pró e anti-angiogênicos (Madsen *et al.* 2010). Embora estudos recentes tenham mostrado que os animais com restrição de Vit.D no período de desenvolvimento renal apresentam na vida adulta alterações glomerulares e vasculares (Nascimento *et al.* 2012, Tare *et al.* 2011), os mecanismos responsáveis por esses distúrbios não foram ainda esclarecidos.

2. HIPÓTESE

Nossa hipótese é de que a deficiência de VitD durante a fase de desenvolvimento renal intra- e extra-útero pode provocar modificações estruturais permanentes nos rins, que não são revertidas na fase adulta, mesmo após a normalização dos níveis de Vit. D pós nascimento. Essas modificações estruturais podem levar a distúrbios fisiológicos, incluindo alteração no SRA, podendo ser uma possível causa de hipertensão arterial. Dessa forma, o presente estudo visa avaliar mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas alterações da microcirculação renal na prole de ratos de mães deficientes de Vit.D durante o período do desenvolvimento renal.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral analisar os mecanismos celulares e moleculares relacionados com o efeito da deficiência de Vit.D durante o período de desenvolvimento renal e suas consequências na vida adulta, avaliando a estrutura e função renal em ratos Wistar Hannover.

3.2 Objetivos específicos

Analisar as alterações de função e estrutura renal que ocorrem na vida adulta (3 e 6 meses de idade) e os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nesse processo na prole de ratas deficientes de Vit.D durante o período de gestação e lactação. Nesses animais foram avaliadas:

- A expressão renal de AT1;
- A concentração plasmática de Vit. D, cálcio, PTH, creatinina, sódio e potássio;
- A osmolalidade plasmática e urinária;
- Albumina e creatinina urinária;
- A microcirculação renal, de forma qualitativa e quantitativa;
- A expressão renal, urinária e plasmática do sistema NO-eNOS;
- A pressão arterial dos animais até os 6 meses de idade;
- O eixo intrínseco renal dos fatores pró e anti-angiogênicos, tais como as Angpt-1 e Angpt-2 e seu receptor Tie-2, e o VEGF e seu receptor VEGFR.
- A diferenciação do túbulo proximal renal, na região apical, através da expressão de cubulina, o receptor responsável pela reabsorção de Vit. D.
- A concentração plasmática de AVP, OT, ANP, CORT, ANGII;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e dieta

Os experimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, protocolo nº 190/2016.

A linhagem utilizada, Wistar Hannover, foi proveniente do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em número máximo de quatro animais por caixa, à temperatura de 22° C, ciclo claro-escuro de 12h, livre de radiação ultravioleta-B (UVB) durante a gestação e lactação, e alimentados, após desmame, com dieta padrão *ad libitum*.

4.2 Delineamento experimental

Fêmeas da linhagem Wistar Hannover foram adquiridas com quatro semanas de idade. Ao completarem seis semanas, as mesmas foram separadas aleatoriamente de acordo com a dieta experimental em: dieta padrão (grupo **DP**) alimentadas com uma dieta feita de acordo com o protocolo AIN93G, incluindo 1.000.0 UI/Kg de Vit.D₃ (Reves e cols 1993) e dieta sem Vit.D₃ (grupo **S/VITD**), alimentadas com a mesma dieta, AIN93G desprovida de Vit.D₃).

A Vit.D₃ foi adicionada separadamente à apenas a dieta do grupo **DP** e foi adicionado uma mistura de vitaminas e minerais a ambas dietas, seguindo a recomendação da AIN93G para ratas gestantes, sendo a falta de Vit.D₃ a única variável entre as dietas. A Tabela 1 abaixo mostra os componentes nutricionais em cada dieta, incluindo a adição de Vit.D₃ na dieta padrão e o mix de vitaminas para ambas dietas. A recomendação mínima de Vit.D₃ para ratas grávidas, de acordo com a AIN93G, é 1.000,0 UI/kg (REEVES, *et al.* 1993). A dieta padrão contém 400.000 IU de Vit.D₃/g ou 0,250 g de Vit.D₃/kg do mix de alimentação, que forneceu os níveis recomendados de Vit.D₃. As dietas foram produzidas por Prag Soluções (Jáu, SP, Brasil).

Tabela 1. Composição das Dietas. Todos os nutrientes correspondem às recomendações da AIN93G roedores.

Nutriente (g/kg)	Dieta Padrão	Dieta sem Vit.D
Amido de milho	397.50	397.50
Caseína	200.00	200.00
Amido dextrinado	132.00	132.00
Sacarose	100.00	100.00
Óleo de soja	70	70
L- Cisteína	3.00	3.00
Colina	2.50	2.50
Mix Mineral	35.00	35.00
Carbonato de Cálcio	357.00	357.00
Mix de Vitamina	10.00	10.00
Vitamina D3	0.25	0.00
Fibra	50.00	50.00

Após seis semanas de dieta, foi realizado o acompanhamento do ciclo estral das ratas, durante um ciclo completo, utilizando o esfregaço vaginal realizado no período da manhã. Os animais que apresentaram o ciclo fisiológico com as 4 fases bem determinadas e que estavam na fase do ciclo fértil, foram então separados. A restrição de Vit. D foi mantida por seis semanas para garantir a redução máxima da vitamina, uma vez que a mesma é lipossolúvel e dispõe de reserva hepática, como descrito anteriormente (Maka *et al.* 2008).

As ratas foram colocadas para acasalamento em sistema de harem (três fêmeas para cada macho), sendo a prenhez constatada pela presença de espermatozoides no conteúdo do esfregaço vaginal (Marcondes *et al.* 2020). A partir deste momento, as ratas prenhas foram mantidas separadas e acompanhadas durante todo o período de gestação e lactação, ambos com duração de 21 dias cada. Durante todo o período de gestação e lactação as ratas continuaram recebendo as dietas **DP** e **S/VITD**. Após 4 dias do nascimento, o sexo dos filhotes foi identificado pelo método da distância ânus-genital (Anderson *et al.* 2015). Após esse

procedimento, cada progenitora recebeu uma ninhada fixada em oito filhotes machos ou completado o número com fêmeas, a fim de aprimorar o processo de lactação. Após a lactação os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo controle (GC): Filhotes machos de mães tratadas com **DP** durante os 21 dias de gestação e lactação (n=10) e analisados com **90 ou 180 dias de idade**.

Grupo sem Vit. D (Vit. D-): Filhotes machos de mães tratadas com dieta **S/VITD** durante os 21 dias de gestação e lactação (n=10) e analisados com **90 ou 180 dias de idade**.

O grupo acompanhado até os 180 dias de idade foi realizado considerando que o efeito da programação fetal pode ser mais acentuada com a idade.

A Figura 2 ilustra o protocolo experimental utilizado nesse estudo.

Figura 5. Imagem representativa do protocolo experimental.

4.3 Protocolos experimentais adicionados

As fêmeas que foram utilizadas para completar o número de 8 animais por ninhada, foram utilizadas em um estudo adicional, já publicado (Anexo 3).

Abaixo segue os 2 grupos utilizados nesse estudo adicional:

Grupo 1: Filhotes fêmeas de mães tratadas com **DP** durante os 21 dias de gestação e lactação (n=10) e analisados aos 90 dias de idade.

Grupo 2: Filhotes fêmeas de mães tratadas com dieta **S/VITD** durante os 21 dias de gestação e lactação (n=10) e analisados aos 90 dias de idade.

A Figura 2 abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado nesse estudo.

Figura 6. Imagem representativa do protocolo experimental.

4.4 Avaliação do peso corporal e da ingestão de líquidos e ração

As mães foram acompanhadas semanalmente, do início ao final da gestação e lactação. As proles tiveram o acompanhamento semanal do peso corporal, ingestão de líquido e ração até o dia da eutanásia.

4.5 Pressão Arterial sistólica (PAS)

A PAS foi determinada nos animais dos grupos controle e deficiente de Vit. D, mensalmente de maneira indireta por pletismografia de cauda (Figura 7) (CODA *Non-Invasive Blood Pressure system*, Kent Scientific Corporation, 2010). Os ratos com idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, foram acondicionados por três dias consecutivos em um tubo cilíndrico de acrílico, no qual a cauda era aquecida e o animal ventilado de maneira adequada para a realização das medidas de PAS. Para tal procedimento, a cauda dos animais era encaixada a um manguito de borracha que foi acoplado à região proximal da cauda e ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captava os sinais a serem enviados e registrados em computador. O experimento só teve início após um período de adaptação dos animais e da estabilização dos sinais de pulso.

e frequência cardíaca (FC). No registro da pressão arterial por pletismografia de cauda ocorre a perda e o retorno dos sinais pulso e FC durante o processo de insuflação e de desinsuflação do manguito. Diante disso a PAS era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso de retorno deste processo. Já para análise da FC foram selecionados intervalos de dez segundos entre os ciclos de insuflar e desinsuflar. A PAS e a FC foram consideradas como a média de no mínimo cinco medidas (Almeida *et al.*, 2017). O sinal era captado e conectado a um amplificador de sinais (RTBP 2000 Rat Tail Blood Pressure System For Rats and Mice, Kent Scientific Corporation) e conectado a um conversor digital (PowerLab/400, ADInstruments, Austrália). A comunicação de dados entre o PowerLab e o computador se dá através de um cabo conectado a uma placa SCSI onde o software Chart for Windows® gerava os registros de pulso, pressão da bomba e frequência cardíaca a partir dos dados enviados pelo amplificador de sinais e conversor analógico digital.

Figura 7. Sistema utilizado para a determinação da PAS por pletismografia de cauda. (Fotografia proveniente de acervo próprio).

4.6 Dosagem de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT)

Os procedimentos foram realizados de acordo com técnicas previamente descritas (Haanwinckel *et al.*, 1995; Elias *et al.*, 1997).

Para as dosagens de AVP e OT, amostras de sangue do tronco foram coletadas em frascos contendo heparina (50 $\mu\text{L/mL}$ de sangue) e centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A extração dos peptídeos foi realizada a partir de 1 mL de plasma (sobrenadante da centrifugação do sangue total), ao qual foram adicionados 2 mL de acetona gelada, procedendo-se agitação vigorosa por 30 segundos e, então, centrifugação a 2500 rpm por 30 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e foram adicionados 2 mL

de éter de petróleo. O tubo foi agitado em vórtex por 30 segundos e mantido em repouso por 5 minutos. A fase superior foi descartada, e a fase inferior liofilizada e utilizada para a realização do radioimunoensaio (RIE).

O princípio do RIE utilizado é a competição entre o hormônio contido na amostra (não-marcado) e o hormônio radioativo adicionado à mesma (traçador) pela ligação com o sítio de ligação do anticorpo primário. Dessa maneira, quanto maior a concentração de hormônio originalmente presente na amostra, menor é a radioatividade do tubo de ensaio (Mantovani, 2011). Para o RIE de AVP e OT, cada amostra liofilizada foi reconstituída em 250 µL de tampão próprio e toda as amostras foram mensuradas em duplicata. Foram utilizados como primeiro anticorpo o anti-AVP (coelho – #RAS8103 – Peninsula Laboratories) e o anti-OT (coelho – #HIC8152 – Peninsula Laboratories) e, além disso, adicionada a cada amostra quantidade conhecida de hormônio marcado com 125I (2000 CPM/100 µL AVP e 4000 CPM/100 µL OT). Após incubação, foi adicionado o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho – produção própria). Ao fim das 24 horas, foi adicionado 1 mL (PEG) a 6,25% aos tubos. O sobrenadante foi descartado, enquanto a fase inferior foi submetida à leitura de radioatividade gama (Packard®). A sensibilidade dos ensaios e o coeficiente de variação intra-ensaio foram 0,1 pg/mL e 5,9% para AVP e 0,1 pg/mL e 1,9% para OT.

4.7 Dosagem de corticosterona

Os procedimentos foram realizados de acordo com técnica previamente descrita por Haack *et al.* (1979).

A extração da corticosterona foi realizada a partir de 25 µL de plasma (obtido do sangue coletado com heparina), aos quais foi adicionado 1 mL de álcool etílico absoluto. As amostras foram agitadas por 30 segundos e, então, centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e liofilizado.

Para o RIE, as amostras foram reconstituídas com 2,5 mL de tampão próprio e cada amostrada foi analisada em duplicata. Foram adicionados anticorpo anti-Corticosterona (coelho – #C8784-100TST – Sigma-Aldrich) corticosterona marcada com 3H (Corticosterona [1,2,6,7-3H(N)] – #ART 0652; American Radiolabeled Chemicals, Sain Louis, MO, EUA). Após a incubação, uma solução de Carvão-Dextran 0,5/0,05% foi adicionada às amostras a fim de se obter a separação da fração ligada ao anticorpo. O sobrenadante foi coletado e a ele foram adicionados 2 mL de líquido de cintilação. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 2 horas em ambiente escuro. A radioatividade foi determinada em um aparelho Tri-Carb® 2910

TR (PerkinElmer). A sensibilidade dos ensaios foi de 31,25 µg/dL, os coeficientes de variação intra-ensaio foram 5,20% e 2,34% e o inter-ensaio foi 3,33%.

4.8 Dosagem de ANG II e ANP

Para a mensuração das concentrações plasmáticas de ANG II e ANP, amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos contendo inibidores de proteases: fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, 1 mM - 10 µL/mL de sangue), pepstatina A (1 mM, 10 µL/mL de sangue), ácido etilenodiamino tetra acético à 10 % (EDTA – 10 µL/mL de sangue), benzoato de para-hidroxi-mercúrio (1 mM, 10 µL/mL de sangue) e fenantrolina (30 mM, 50 µL/mL de sangue). O sangue foi centrifugado (20 minutos, 3000 rpm, 4 °C), o plasma coletado e a extração foi realizada por meio de técnica de cromatografia, a partir de 1 mL de plasma utilizando-se colunas C-18 ativadas com ácido trifluoroacético (C-18 sorbent - Sep-Column – #Y1000; Laboratórios Península, San Carlos, CA, EUA). A 1 mL de plasma foi adicionado 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (solução A), e os tubos agitados em vórtex por 30 segundos e centrifugados a 3000 rpm, 4° C por 15 minutos. As colunas C-18 foram ativadas com 4 mL de acetonitrila à 60% em TFA 0,1 % (solução B) e, logo após, lavadas com 20 mL de solução A. Após a ativação e lavagem da coluna, o sobrenadante proveniente do plasma acidificado e centrifugado foi vertido na mesma. Nesse passo as moléculas de interesse ficaram retidas por adsorção na coluna C-18. Após a finalização da passagem do sobrenadante, a coluna foi lavada novamente com 20 mL da solução A e, então, os hormônios foram eluídos em 3 mL da solução B e o líquido resultante foi coletado, liofilizado e armazenado a -20° C até o momento do ensaio. No dia do ensaio, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 400 µL de tampão específico. As dosagens hormonais foram realizadas através de RIE de duplo-anticorpo, como apresentado anteriormente para OT, AVP e CORT, (Haack *et al.*, 1979; Gutkowska *et al.*, 1984). A sensibilidade dos ensaios e o coeficiente de variação intra-ensaio foram respectivamente 0,75 pg/tubo e 6,91% para ANP e 0,78 pg/tubo e 0,74% para ANGII.

4.9 Dosagem de Vit.D e cálcico sérico

Após o final da lactação, as mães e as proles de 90 e 180 dias tiveram os níveis de vitamina D e cálcio séricos avaliados. A determinação quantitativa de vitamina D na forma 25(OH)D sérica foi realizada pelo teste direto competitivo, por quimioluminescência (CLIA)

(Liaison®). O cálcio sérico foi determinado através de métodos diretos baseados na formação de complexos com moléculas orgânicas. (Labtest®).

4.10 Avaliação da função renal

Amostras de urina de 24 h foram coletadas dos animais aos 90 e 180 dias de idade em gaiolas metabólicas, no dia anterior à eutanásia. Os animais foram anestesiados com tionembutal (40mg/Kg de peso corporal), a aorta foi canulada para a coleta de sangue, que foi transferido a um tubo heparinizado, centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos. O plasma foi aliquotado e armazenado à -20°C até o momento do uso. A dosagem da creatinina plasmática foi realizada por um método colorimétrico (Kit Labtest Diagnóstica S.A) utilizando como cromógeno o ácido pícrico (Junge *et al.* 2004).

O sódio (Na⁺) urinário e plasmático, foi quantificado pela técnica de medição por eletrodos de íons seletivos (9180 Analisador de Eletrólitos, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha, 2004). A osmolalidade urinária e plasmática foi determinada em osmômetro (Model 3250; Advanced Instruments, Norwood, EUA), baseando-se no abaixamento do ponto de congelação.

4.11 Quantificação da Carga excretada de albumina

A excreção de albumina foi avaliada nas amostras de urina coletadas em gaiolas metabólicas nos animais de 90 e 180 dias de idade. As amostras foram conservadas com azida sódica à temperatura de -20°C. O método de dosagem foi o eletroimunoensaio em gel de agarose desenvolvido por Laurell 1972. Foram utilizados, o anticorpo anti-albumina de rato, soluções padrões contendo 0,04, 0,06 e 0,10 mg/ml de albumina, agarose tipo II (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e tampão tris-acetato (pH 8,6).

4.12 Determinação indireta do NO plasmático e tecidual pela dosagem de nitrato

A determinação da concentração de NO plasmático e tecidual foi feita através de uma técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se um analisador de NO (Sievers 280 NO Analyser, Boulder CO. USA).

Alíquotas de 25 µl de amostra foram separadas para desproteinização com 50 µl de etanol absoluto à 4°C e mantido por 30 min em -20°C e submetido à centrifugação (10000 rpm,

5 min) para posterior leitura. Cinco microlitros (5 μ l) do sobrenadante foram colocados na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95°C) que converte nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é dragado para a câmara de quimioluminescência do analisador, que, por sua vez, reage com o ozônio (O_3), formando dióxido de nitrogênio (NO_2^-). O NO_2^- apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. Essa corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações de 5, 10, 15, 25, 50 e 100 μ M.

4.13 Coleta Tecidual para quantificação de NO

Para a dosagem do NO do tecido renal, amostras de tecido renal foram colocadas em 200 μ l de ácido acético (0,1N) gelado. Os tecidos foram homogeneizados com ultrassom e centrifugados a 3.000 rpm/5min, sendo os sobrenadantes separados e estocados a -70°C para posterior dosagens.

4.14 Dosagem de Proteína Total

Alíquotas de 10 μ l (1:2) dos homogenatos de tecido renal foram utilizadas para dosagem de proteínas totais pelo método colorimétrico de Bradford (1976) utilizando-se um esoelectrofotômetro (Microplater Rader, Bio-Rad Laboratories, Inc.) com comprimento de onda de 595nm. Os valores encontrados de proteínas totais foram utilizados para normalizar a concentração tissular de NO tecidual.

4.15 Estudos histológico e morfométrico

O rim esquerdo foi retirado e 2 cortes transversais na região do hilo renal (5 mm de espessura) foram realizados e imersos em solução de methacarn (metanol à 60%, clorofórmio à 30% e ácido acético à 10%) durante 24 horas. Após esse período, a solução foi substituída por álcool à 70%. O tecido renal foi incluído em parafina, cortado em secções de 3 μ m.

Os cortes histológicos (3 μ m de espessura) corados com tricrômio de Masson foram examinados sob microscopia de luz. As lesões túbulo intersticiais (ou áreas de fibrose) do córtex renal foram avaliadas pela quantificação da área intersticial relativa no córtex renal em trinta campos consecutivos (0,1mm² cada) de cada rim. A área intersticial foi circundada

manualmente e, em seguida, determinada por morfometria computacional (Axion versão 4.8.3, Zeiss, Alemanha). Os resultados foram expressos como porcentagem da área total do córtex. Os valores médios por amostra em relação à área total do córtex foram calculados.

A avaliação morfométrica também foi realizada para determinação das áreas correspondentes aos tufo glomerulares de 50 glomérulos por animal em campos consecutivos. As imagens obtidas em nível de microscopia de luz foram captadas por meio de vídeo-câmera e transmitidas ao computador, sendo analisadas também pelo programa computacional (Axion Zeiss 4.8.3).

4.16 Imunoistoquímica

Para os estudos de imunoistoquímica, foram utilizados os seguintes anticorpos:

Anti-fibronectina (1/500), policlonal (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA), incubação *overnight* à 4° C. A fibronectina é um dos principais componentes da MEC, cujo aumento está relacionado com fibrose renal que pode ser consequência do distúrbio do desenvolvimento renal.

Anti-sinaptopodina:(1/2000), policlonal (Santa Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), incubação à temperatura ambiente por 60 minutos. A sinaptopodina é uma proteína associada à actina de podócitos diferenciados.

Anti-cubulina: (1/1500), policlonal (Santa Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) incubação à temperatura ambiente por 60 minutos. A cubulina é um receptor endocítico de Vit.D, localizado na membrana apical do túbulo proximal do rim.

Anti-JG12: (1/800), monoclonal (Santa Cruz, EUA), incubação *overnight* à 4°C. O JG12 é um marcador de célula endotelial.

Anti-renina: (1/800), Biobyte LLC, San Francisco, CA, USA) incubação à temperatura ambiente por 60 minutos.

Os cortes foram lavados com PBS e incubados em seguida, com anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulina G (IgG) de camundongo ou de coelho, de acordo com o anticorpo primário utilizado. O produto da reação foi detectado com o sistema avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e a coloração desencadeada pela adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, EUA), na presença de água oxigenada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primários e secundários com solução de PBS, contendo albumina bovina (1%). A contra coloração foi realizada com *methylgreen* ou hematoxilina de Harris.

A avaliação dos resultados da imunorreação para JG12 positivas por glomérulo ou por área do córtex renal medindo $0,1\text{mm}^2$ cada foi realizada pela contagem da microvasculatura no TI e escore no glomérulo por campo (30 campos) no córtex renal, medula externa, medula interna e por glomérulo (50 glomérulos) para cada animal. A avaliação das demais imunorreações foi realizada determinando um escore médio por área de córtex renal ($0,1\text{mm}^2$ cada) ou por glomérulo, para cada animal, utilizando escores que refletem a extensão da área marcada, sendo atribuído um escore de 0 a 4, como ilustrado na **Tabela 2**. Foram avaliados 30 campos consecutivos do córtex renal, medula externa e interna e 50 glomérulos.

Tabela 2. Escores utilizados para análise imunoistoquímica.

<u>Escores</u>	Análise imunoistoquímica (Kliem <i>et al.</i> 1996)
0	0% a 5% da área
1	Entre 5% a 25 % da área
2	Entre 25% a 50 % da área
3	Entre 50% a 75 % da área
4	Entre 75% a 100 % da área

4.17 Análises por *Western blot*

As expressões renais de eNOS, CD34, VEGF, VEGFR, Angp1, Angp2, Tie2 e AT₁ foram avaliadas por *Western blot*. Os tecidos renais das proles de 90 e 180 dias de idade foram homogeneizados em tampão de lise: Tris-HCL (50 Mm, pH 7,4), NaCl (150 mM), triton X-100 (1%), dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,1%), aprotinina (1 µg/mL), leupeptina (1 µg/mL), fluoreto de sódio (25 Mm), ácido etilenodiamino tetrapirofosfato de sódio (1mM), fluoreto de sódio (25Mm), ácido etileno diamino tetraacético (EDTA 0,001 M, pH 8), à 4 °C (Francescato *et al.*, 2019). Após a incubação por 5 min, os lisados foram centrifugados à 4 °C por 15 min à 10.000 rpm. Amostras do sobrenadante do lisado renal, contendo 30 µg de proteína, foram solubilizadas em tampão da amostra [Tris-HCL (62,5 Mm, pH, 6,8), glicerol (10%), SDS (2%), β-mercaptoetanol (5%) e azul de bromofenol], aquecidas à 100°C por 5 min e então aplicadas em gel de poliacrilamida 10 ou 12%. A dosagem de proteínas nas amostras de lisado renal foi realizada pelo método de Bradford (1976). As amostras contendo proteínas foram transferidas

do gel para membrana de nitrocelulose, após a aplicação de corrente elétrica e as membranas foram incubadas por 1 h tampão de bloqueio [TBSt: NaCl (0,15 M), trizma base (0,05M), Tween 20 (0,1%, pH 8,0) e leite desnatado (5%)]. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBSt e incubadas com os anticorpos primários: anti-AT₁ (1/400, policlonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-eNOS (1/200, policlonal, Stressgen, EUA); anti-CD34 (1/200, policlonal, Stressgen, EUA) anti-Angpt1 (1/500, policlonal, Bioss, EUA); anti-Angpt2 (1/500, policlonal, Bioss, EUA); anti-VEGF (1/300, policlonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-VEGFR (1/500, policlonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA); anti-Tie2 (1/400, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA) e ou anti-tubulina (1/200, monoclonal, Sigma Chemical Company, EUA) como controle da quantidade transferida e incubados por 18 h à 4 °C. Posteriormente, as membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho (1/20.000) ou camundongo (1/10.000) ligado a peroxidase (Dako, Dinamarca) por 1 h em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente e o resultado da reação detectado pelo Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, EUA) e capturado em sistema computadorizado. As imagens obtidas foram escaneadas e a análise da densitometria das bandas foi realizada pelo programa Image J e expressas em unidades arbitrárias.

4.5 Análise dos Dados

Comparações entre os grupos (Dieta padrão vs Dieta Sem Vit. D) foram analisadas usando *test-t de Student*, não pareado ou o não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o GraphPad Software Prism versão 9 (GraphPad, CA, EUA). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Esses dados foram expressos como medianas e interquartil intervalos (25–75%). Para os dados que apresentaram distribuição normal, usamos análise de variância com o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Esses dados foram expressos como a média $\pm$ S.E.M. Um valor de $*p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Dados maternos e da prole

As ratas mães apresentaram ganho médio de peso corporal de $189,79 \pm 24,65$ DP vs $180,79 \pm 49,65$ gramas S/VITD entre o início e o final da gestação (Figura 8), com uma ninhada média de $12,53 \pm 2,38$ vs $14,13 \pm 2,68$ filhotes, sendo 57,6 % machos no grupo DP e 53,7 % machos no grupo S/VITD.

Durante o período da lactação (21 dias), não houve diferença dos pesos corpóreos entre os grupos DP e S/VITD ($F_{1;7} = 3,52$; $p = 0,10$). A dieta S/VITD não afetou o peso corporal das ratas mães ao longo do tempo ($F_{20;110} = 0,58$; $p = 0,92$) (Figura 8).

Não foi observado mortalidade nos grupos entre o 21º dia (final lactação) até o 3º e 6º mês de idade.

Figura 8. Ganho de peso corporal das ratas mães dos grupos controle e dieta sem Vit. D durante o período de gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão da média.

Não houve diferença na variação no consumo de ração e na ingestão hídrica pelas mães, durante os 21 de gestação e lactação entre os animais do grupo controle e os S/Vit. D (tabela 3).

Tabela 3. Dieta Padrão: ratas lactantes com ingestão de dieta padrão (Grupo Controle, GC) e Dieta S/Vit. D: ratas lactantes com ingestão de dieta sem Vit. D (Grupo S/Vit. D).

GRUPOS	Volume ingerido (mL/24 h)	Consumo ração (g/24 h)
Controle	40,23 ± 2,18 (n=7)	36,23 ± 7,34 (n=7)
S/Vit.D	43,72 ± 3,60 (n=8)	33,72 ± 5,20 (n=8)

Foram determinados os níveis séricos de vitamina D (25OHD) e cálcio, nas ratas, logo após a lactação, para constatar que o tratamento com a dieta S/VITD e a luz livre de ultravioleta B, durante as seis semanas que antecederam o acasalamento e todo o período de desenvolvimento renal (gestação e lactação), estivesse provocando a depleção de vitamina D sérica. Como pode ser observado na Figura 9, a dieta deficiente de Vit. D, provocou a depleção de Vit. D nas ratas mães, sem afetar os níveis de cálcio.

Figura 9. Níveis séricos de vitamina D (25OHD) e cálcio (Ca²⁺), logo após a lactação, de ratas que receberam dieta padrão (DP) e dieta sem Vit. D (S/VIT.D). Resultados estão expressos em média e erro padrão da média **p* < 0,05 vs DP.

5.2 Dados de ganho de peso da prole durante a lactação

A Figura 10 mostra a variação do peso corporal da prole, do nascimento aos 21 dias de idade. Observa-se que no final da segunda semana a prole de mães que receberam dieta S/VITD apresentaram um ganho corporal menor do que a prole do grupo dieta padrão e que essa diminuição se manteve até o final da lactação.

Figura 10. Peso corporal em gramas, do nascimento ao final da lactação das proles de mães que receberam dieta padrão (DP) e proles de mães que receberam dieta sem Vit. D (S/VIT.D). Resultados estão expressos em média e erro padrão da média * $p < 0,05$ vs DP.

5.3 Peso corporal, ingestão de líquidos e consumo de alimentos nas proles com 3 e 6 meses de idade

Os filhotes de mães do grupo deficiente de Vit.D apresentaram menores pesos corporais ($p < 0,05$) ao final da lactação ($52,3 \pm 2,8$ versus $59,7 \pm 2,1$) e maiores pesos corporais na idade adulta em comparação aos filhotes do GC (Tabela 4).

Tabela 4- Peso corporal, ingestão de líquidos e consumo de alimentos na prole com 3 e 6 meses de idade.

	3 meses		6 meses	
	Controle	Vit.D-	Controle	Vit.D-
	<i>n</i> = 7; <i>m</i> = 3	<i>n</i> = 10; <i>m</i> = 3	<i>n</i> = 7; <i>m</i> = 3	<i>n</i> = 9; <i>m</i> = 3
Peso corporal (g)	358 ± 18	401 ± 15 *	448 ± 19	498 ± 13 *
Ingestão alimentar (mg 100 g ⁻¹)	8.6 ± 1.2	11.9 ± 1.2 *	10.3 ± 1.2	13.6 ± 1.0 *
Ingestão hídrica (mL 100 g ⁻¹)	8.3 ± 1.2	11.3 ± 1.8 *	9.8 ± 1.2	13.9 ± 1.2 *
V (mL 100 g ⁻¹)	6.3 ± 1.8	8.5 ± 2.45 *	7.2 ± 1.8	9.8 ± 2.3 *
U (mOsm kg H ₂ O ⁻¹)	1.458 ± 135	1.270 ± 108 *	1.711 ± 145	1.250 ± 129 *
U Na ⁺ /Cr	2.8 ± 0.8	3.4 ± 0.5 *	2.9 ± 0.6	3.9 ± 0.7 *
U K ⁺ /Cr	3.6 ± 0.3	4.3 ± 0.4*	3.7 ± 0.3	4.5 ± 0.4*
ALB (μg 24 h ⁻¹)	0.4 (0.3; 0.6)	0.6 (0.3; 0.7)	0.6 (0.4; 0.6)	0.7 (0.5; 0.8)

Tabela 4. Peso corporal (g), ingestão alimentar (mg 100 g⁻¹), ingestão hídrica (mL 100 g⁻¹), volume urinário de 24 h (V), osmolalidade urinária (U), excreção urinária de sódio (U Na⁺), excreção urinária de potássio K⁺ (U K⁺) e albuminúria (ALB) de filhotes de 3 e 6 meses nos grupos controle e Vit. D-. Os dados são expressos como a mediana e intervalo interquartil (25% – 75%) (ALB) ou a média ± SEM (peso corporal, ingestão alimentar, V, U, U Na⁺ e U K⁺). *n* = número de animais, *m* = número de ninhadas. **p* <0,05 comparado com controles da mesma idade.

5.4 Quantificação de 25(OHD3), paratormônio (PTH) e Cálcio (Ca²⁺)

Os filhotes de mães com dieta depletada de Vit.D durante o desenvolvimento renal também apresentaram níveis baixos de Vit.D aos 3 e 6 meses de idade em comparação com os controles (Figura 11), sem diferenças nos níveis de Ca²⁺ e PTH (Tabela 5)

Figura 11. Níveis séricos de vitamina D (25OHD), na prole de ratas que receberam dieta padrão (GC) e dieta sem Vit. D (Vit.D-) com 3 e 6 meses de idade. Resultados estão expressos em média e erro padrão da média * $p < 0,05$ vs GC.

Tabela 5- Níveis de 25(OHD3), paratormônio (PTH) e Cálcio (Ca^{2+}) no plasma.

	3 meses		6 meses	
	GC	Vit.D-	GC	Vit.D-
	$n = 7; m = 3$	$n = 10; m = 3$	$n = 7; m = 3$	$n = 9; m = 3$
Ca^{2+} (nmol/L)	$2,37 \pm 0,4$	$2,25 \pm 0,3$	$2,33 \pm 0,2$	$2,27 \pm 0,3$
PTH (pg/mL)	$165,4 \pm 28,59$	$178,8 \pm 39,34$	$144,3 \pm 33,11$	$197,8 \pm 113,1$
Pcreat (mg/dL)	$0,69 \pm (0,53; 0,72)$	$0,72 \pm (0,54; 0,74)$	$0,79 \pm (0,53; 0,82)$	$0,82 \pm (0,51; 0,84)$
Na^+ (mmol/L)	$147,1 \pm 3,2$	$148,3 \pm 2,5$	$146,7 \pm 3,9$	$148,9 \pm 3,5$
K^+ (mmol/L)	$4,1 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,7$	$4,9 \pm 0,8$	$4,7 \pm 0,3$

Tabela 5. Níveis séricos de cálcio (Ca^{2+}), hormônio da paratireoide (PTH), creatinina plasmática (Pcreat), sódio (Na^+) e potássio (K^+). Os dados são expressos como a mediana e intervalo interquartil (25% – 75%) (Pcreat) ou a média $\pm$ SEM Ca^{2+} , PTH, Na^+ e K^+ . n = número de animais, m = número de ninhadas. * $p < 0,05$ comparado com controles da mesma idade.

5.5 Função renal e excreção urinária de albumina

A exposição à dieta deficiente de Vit. D durante o desenvolvimento renal esteve associada com aumento da pressão arterial sistólica ao longo do período experimental (figura 12). A hipertensão nesses animais foi associada a uma diminuição significativa da osmolalidade e

aumento da excreção de sódio e potássio na urina, aumento da ingestão de água e do volume urinário (3 e 6 meses) (Tabela 4). A ingestão alimentar do grupo Vit. D- (3 e 6 meses) foi maior do que a dos ratos do GC. Os ratos Vit. D- apresentaram um aumento da excreção urinária de Na^+ e K^+ (35% e 18%), respectivamente (Tabela 4), mantendo concentrações normais de Na^+ e K^+ no sangue (Tabela 5). Nenhuma diferença foi observada nos níveis de creatinina plasmática (Tabela 5) e albumina urinária (Tabela 4).

Figura 12. Estudo da pressão arterial sistólica por pletismografia. Os valores são expressos em média $\pm$ erro padrão da média e foram testados com *one-way* ANOVA e pós teste de Tukey (* $p < 0.05$). O símbolo ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle (GC).

5.6 Análises Histológicas e Morfométricas

Em comparação com o GC, um aumento acentuado das fibras de colágeno ao longo do interstício e dos glomérulos circundantes no córtex renal foi observado no grupo Vit. D- em ambos os períodos avaliados (3 e 6 meses) (Figura 13a). Os resultados da imunoistoquímica para fibronectina nos glomérulos demonstraram aumento na área mesangial no grupo Vit. D- em relação aos controles da mesma idade (Figura 13a). Esses animais também apresentaram redução da área glomerular média e aumento da fração da área mesangial (Figura 13a e b).

Figura 13. Efeito da deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal no parênquima e glomérulos do córtex renal durante a vida adulta. (a) Imagens representativas coradas com tricômico de Masson e **(b)** análises morfométricas da área fracional intersticial (%) de todos os grupos (GC n=7, Vit.D- n=9). **(b)** Imunolocalização para fibronectina no glomérulo do córtex renal de todos os grupos (GC n=7, Vit.D- n=9). Note a presença mais intensa para fibronectina na área mesangial. **(b)** Resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Barra = 50 μM . * $p < 0,05$ vs controle da mesma idade.

5.7 Efeito da deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal na bordadura em escova e no receptor de cubulina das células dos túbulos renais nas proles de 3 e 6 meses de idade

A expressão de cubulina estava diminuída na bordadura em escova das células dos túbulos proximais dos animais do grupo Vit. D- em comparação com seus respectivos grupos controle, em ambos os períodos avaliados (Figura 14).

Figuras 14. (a) Imunolocalização e **(b)** escore para o receptor de Vit. D, cubulina, no túbulo proximal de ambos os grupos (GC n=7, Vit. D- n=9), nas duas idades avaliadas. Os resultados estão expressos em mediana e percentis. Barra = 50µM. **p* < 0,05 vs controle da mesma idade. A figura esquemática ilustra o metabolismo de reabsorção e ativação da Vit.D. A 25(OH)D₃, acoplada à VDBP (Vitamin D binding protein), é transportada para os rins cujas células dos túbulos proximais possui o aparato endocítico reponsável pela reabsorção e posterior ativação da Vit.D através da enzima 1-α-hidroxilase (CYP27B1), formando a 1-α,25-diidroxi-vitamina D [1,25(OH)₂D ou calcitriol], que é a molécula metabolicamente ativa. A CYP27B1 é expressa nas células dos túbulos renais proximais, onde o calcitriol necessário ao metabolismo sistêmico é sintetizado. A cubulina apresenta uma alta taxa de recaptação de Vit. D pelas células dos túbulos proximais, o que evita perda urinária da vitamina D e concentração da 25(OH)D nos túbulos renais para a conversão em calcitriol.

5.8 Estudo da barreira de filtração glomerular

Os animais dos grupos Vit. D- não apresentaram alterações da albuminúria em relação aos controles quando analisados ambas as idades (Tabela 4). Contudo, a barreira de filtração foi avaliada em estudo de imunoistoquímica, utilizando um marcador específico do componente podocitário (sinaptopodina). Foi observada redução desse marcador nos glomérulos renais, comparados com os grupos controles em ambos os períodos avaliados (Figura 15).

Figuras 15 a, b, c, d: Imunolocalização para sinaptopodina nos glomérulos renais e em **e** escore para sinaptopodina nos glomérulos dos grupos controles (n=7) e experimentais (n=8). **a)** GC 3 meses (Dieta padrão), **b)** Vit. D- 3 meses (Dieta S/Vit. D), **c)** CG 6 meses (Dieta padrão), **d)** Vit. D- 6 meses (Dieta S/Vit. D). Barra = 50μM. Em **(e)** os resultados estão expressos em mediana e percentis * $p < 0,05$ e # $p < 0,05$ vs controle da mesma idade.

5.9 Participação da Vit. D no desenvolvimento e na diferenciação da microvasculatura renal

A imunolocalização específica para células endoteliais (JG12), evidenciou uma redução dos vasos renais na região do córtex renal, medula externa e interna nos animais dos grupos deficientes de Vit. D, comparado aos controles em ambas as idades (Figura 16). A expressão endotelial renal também foi avaliada no rim total por *Western blot* utilizando CD34 como

marcador e os resultados mostram que os grupos Vit. D- apresentam, aos 3 e 6 meses, uma expressão de CD34 reduzida em relação aos controles (Figura 16 f).

Figuras 16 (a), (b) Imunolocalização para JG12 no córtex e medula externa e interna renal dos animais dos grupos controles e experimentais com 3 (a) e 6 meses (b) e **(c), (d) e (e)** quantificação dos vasos positivos para marcação endotelial (JG12) dos grupos controles (GC) e experimentais (Vit. D-) com 3 meses (n=7) **(a)** e 6 meses (n=9) **(b)** de idade. Em **(f)** análise da densitometria das bandas de CD34 nos grupos controles e Vit. D- de 3 e 6 meses de idade. Em **(g)** expressão para o marcador CD34 (120 kDa) avaliada por *western blot* no tecido renal dos grupos controles (n=7) e Vit. D- (n=8) de ambas as idades. A razão densitométrica entre as bandas de CD34 e as de GPDH foram calculadas e os dados estão expressos em comparação ao controle, com valor médio designado como 100%. Resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Barra = 50µM. * $p < 0,05$ vs controle da mesma idade.

5.10 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal e comprometimento no sistema do eNOS – NO na vida adulta

Na região da medula interna e externa, também foi observado alteração da distribuição dos feixes e arranjos vasculares nas duas idades estudadas (3 e 6 meses de idade) comparados com os controles. Os feixes vasculares apresentam se dispersos ao longo do eixo da medula em direção à papila (Figura 17a). Pode-se observar também, uma diminuição para imunolocalização da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), nessa mesma região, para os grupos Vit. D- comparados com os controles de ambas as idades (figura 17 a). O estudo por *Western blot* também demonstrou uma redução para expressão da eNOS tecidual (Figura 17b). A avaliação do NO do tecido renal evidenciou que o grupo Vit. D- tem uma redução do NO

renal, que foi mais acentuada com a idade (Figura 17c). Ao analisar, de maneira conjunta, o NO plasmático nos animais dos grupos Vit. D-, pode se observar uma redução comparados aos controles da mesma idade (Figura 17d).

Figuras 17. Efeito da deficiência de Vit. D na diferenciação da microvasculatura renal. (a) Imunolocalização para vasos positivos para células endoteliais (JG12) e óxido nítrico sintase (eNOS) na medula interna renal dos animais com 6 meses de idade (GC n=7, Vit. D- n= 8). Note que os círculos em amarelo demonstram os pacotes dos arranjos morfológicos dos vasos e, no grupo Vit. D- esses arranjos morfológicos estão dispersos e em menor número. Observa-se nos círculos vermelhos, a marcação para eNOS, demonstrando a integridade dos vasos no grupo controle, em Vit. D- essa marcação é reduzida, com severa dispersão, demonstrando o comprometimento desses vasos renais na síntese da eNOS no grupo Vit. D-. Em (b) análise da densitometria das bandas de eNOS nos grupos controles e Vit. D- de 3 e 6 meses de idade, e expressão para o marcador eNOS (140 kDa) avaliada por *western blot* no tecido renal dos grupos controles e Vit. D- de ambas as idades (GC n=7, Vit. D- n= 8). A razão densitométrica entre as bandas de eNOS e as de GAPDH foram calculadas e os dados estão expressos em comparação ao controle, com valor médio designado como 100%. Óxido Nítrico (NO) plasmático (c) e no tecido renal (d) (GC n=9, Vit. D- n= 10). Resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Barra = 50 μ M. * $p < 0,05$ vs controle da mesma idade e # $p < 0,05$ vs controle da mesma idade.

5.11 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal ocasionou distúrbio no sistema renina angiotensina na vida adulta

A figura 18 a e d mostra a expressão de renina no aparelho justaglomerular e no tecido renal estão aumentados e em b os níveis plasmáticos de ANGII também demonstra aumento nos animais do grupo Vit.D-. A expressão do receptor AT1 analisada por *western blot* (Figura 18 c), mostra aumento da expressão do receptor AT1 nos grupos VitD- com 3 e 6 meses comparados com os controles.

Figura 18. Efeitos da deficiência de Vit.D na expressão da renina, ANGII e receptor AT1. Em (a) imagens representativas de imuno-histoquímica para renina do córtex renal de todos os grupos (GC n=5, Vit.D- n= 5). As flechas indicam arteríolas aferentes glomerulares na região justaglomerular. Barra = 50 μ M. (b) Níveis plasmáticos de ANGII de todos os grupos (GC n=9, Vit.D- n= 11). (c) *Western blot* do tecido renal para AT1 de todos os grupos (GC n=5, Vit.D- n=5). (d) *Western blot* do tecido renal para renina de todos os grupos (GC n=5, Vit.D- n=5). A razão densitométrica entre as bandas de AT1R, renina e as de GAPDH foram calculadas e os dados estão expressos em comparação ao controle, com valor médio designado como 100%. Resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle da mesma idade.

5.12 Deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal não alterou os níveis plasmático de corticosterona, oxitocina e peptídeo natriurético atrial

Como pode ser observado na Figura 19, independentemente do período avaliado, a deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal não alterou os parâmetros séricos de corticosterona, oxitocina, peptídeo natriurético e vasopressina nas duas idades estudadas.

Figura 19. Efeitos da deficiência de Vit.D nos níveis plasmáticos de corticosterona (CO), oxitocina (OT), peptídeo natriurético atrial (ANP) e vasopressina (AVP). Concentrações plasmática de corticosterona (a), oxitocina (b), peptídeo natriurético atrial (c) e vasopressina (d) dos grupos controles e VitD- de ambas as idades (GC n=9-11, Vit.D- n= 9-12). Não houve diferenças entre os grupos nas duas idades estudadas para nenhuma dessas dosagens.

5.13 Desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos em resposta à deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal

Os resultados observados na figura 20, em amostras de tecido renal avaliados por *western blot*, mostram que a deficiência de Vit. D no período do desenvolvimento renal compromete a integridade do SRA, aumentando a expressão da Angpt-2 e reduzindo da Angpt-1. A expressão de VEGF também se apresentou reduzida nos grupos Vit. D- comparados com os controles, a expressão do VEGFR permaneceu inalterada em ambos os grupos.

Figura 20. Desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos em resposta à deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal. Em (a), análise da densitometria das bandas de Angpt-, em (b) Angpt-2, e em (c) do receptor Tie2 dos grupos controles (n=7) e VitD- (n=7) de 3 e 6 meses de idade. Em (d) expressão para o marcador VEGF (27 kDa), e (e) VEGFR2 (68 kDa) avaliada por *western blot* no tecido renal dos grupos controles e VitD- nesse período. A razão densitométrica entre as bandas de Angs1-2/GPDH e VEGF-VEGFR2/GPDH (C, F, I, L) foram calculadas e os dados estão expressos em

comparação ao controle, com valor médio designado como 100%. Resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle da mesma idade.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos os efeitos da deficiência de Vit. D durante o período do desenvolvimento renal e suas consequências na vida adulta e os mecanismos envolvidos nesse processo. Os resultados mostram que a Vit. D contribui para o desenvolvimento renal através da modulação da diferenciação de células renais; isso se deve provavelmente à participação da Vit. D na modulação na atividade do SRA que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento renal.

Em roedores, a Vit. D é estocada no fígado e tecido adiposo e com seis semanas de restrição, os níveis de Vit. D sofrem uma depleção acentuada, sem alterações nos níveis plasmáticos de fósforo e cálcio (Eyles *et al.*, 2003). Além disso, estudos prévios demonstraram que a depleção de Vit. D por esse período asseguram a deficiência de Vit. D durante a gestação (Maka *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2010). Nossos resultados corroboram com a literatura, e confirmam a eficácia do nosso modelo experimental. As ratas gestantes do grupo deficiente de Vit. D foram submetidas ao protocolo de restrição de Vit. D por seis semanas antes da gestação e durante os períodos de gestação e lactação, sendo observada uma severa deficiência de Vit. D. Essas ratas apresentaram valores médios de 10 ng/ml, sendo que valores de <20ng/ml são considerados deficiência de Vit. D (Bell., 2011).

Os filhotes de ratas mães deficientes de Vit. D apresentaram menor peso corporal no final da lactação, confirmando os resultados de estudos anteriores (Boyce *et al.*, 2013). No entanto, esses animais apresentaram um peso corporal maior comparado ao GC na idade adulta (6 meses).

É importante destacar, que a deficiência de Vit. D em humanos, durante o período do terceiro trimestre gestacional, está relacionado com o desenvolvimento de diabetes e obesidade na prole (Pasco *et al.*, 2008). Essas relações podem ser associadas aos potentes efeitos da Vit. D na adiposidade. A restrição materna de Vit. D pode ocasionar a adipogênese na prole (Bispham *et al.*, 2005) embora os mecanismos não estejam totalmente elucidados (Pasco *et al.*, 2008).

Wen *et al.* (2018), demonstraram que a deficiência de Vit. D durante a gravidez estimula a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos, o que pode estar associado à alteração na metilação de genes, como *Vldlr* e *Hif1 α* , levando à obesidade da prole. Além disso, a ingestão inadequada de cálcio tem sido associada à obesidade, uma vez que o cálcio possui efeitos na apoptose dos adipócitos. Assim, tem sido demonstrado que a Vit. D possui um papel importante na indução da apoptose de adipócitos maduros, via ativação da cascata de sinalização Ca^{+2} /calpaína/caspase12 (Serveeg *et al.*, 2015). Assim sendo, o maior peso corporal na prole de animais deficientes de Vit. D poderia ser explicado, pelo menos em parte, por prováveis

alterações no equilíbrio entre adipogênese e apoptose de adipócitos durante a fase de desenvolvimento do tecido adiposo. Contudo, futuras investigações serão necessárias para melhor elucidar esse achado.

A Vit. D desempenha um papel fundamental na homeostase do cálcio e no metabolismo ósseo. Neste estudo, a concentração sérica total de cálcio não diferiu entre os grupos Vit. D- e GC, embora as concentrações séricas de Vit. D fossem marcadamente diferentes entre os grupos.

Nossos achados são semelhantes aos descritos em mulheres grávidas (Morley *et al.*, 2006) e em ratas (Tare *et al.*, 2010), indicando que a concentração total de cálcio não estava relacionada aos níveis de Vit. D. O nível de PTH no grupo Vit. D- não mudou significativamente em comparação com o GC em ambas as idades estudadas. No entanto, no presente estudo, o cálcio total foi avaliado, enquanto o cálcio livre, que é o constituinte biologicamente ativo, não foi examinado. Conforme avaliado neste estudo, o cálcio total inclui o cálcio livre e o carreado pela albumina.

Em relação aos resultados dos níveis de Vit. D na prole durante a vida adulta, foi observado que, mesmo a prole recebendo dieta padrão após a lactação até os 3 e 6 meses de idade, observou-se que os níveis de Vit. D não atingiram os níveis normais. Esses achados podem ser explicados, juntamente com as análises da expressão do receptor cubulina na borda em escova das células do túbulo proximal uma vez que os animais do grupo Vit. D- apresentaram uma redução da expressão desse receptor. A cubulina é um receptor expresso principalmente em células epiteliais polarizadas e medeia a reabsorção e ativação da Vit. D nos túbulos proximais, evitando a perda urinária da Vit. D (Kaseda *et al.*, 2011; Negri *et al.*, 2006; Nykjaer *et al.*, 2001). Uma vez no espaço intracelular, a Vit. D sofre hidroxilação transformando-se em calcitriol (Nykjaer *et al.*, 2001). A falta de diferenciação celular evidenciada pela diminuição na expressão de cubulina pode explicar, pelo menos em parte, os níveis séricos mais baixos de Vit. D nos animais Vit. D- em comparação com o GC.

A função fisiológica do SRA é manter a resistência vascular e a homeostase do volume de fluido extracelular e esse sistema depende das ações regulatórias da ANGII na vasculatura periférica, sistema nervoso central (SNC), rins e coração (Sparks *et al.*, 2014). A secreção e produção de renina são amplamente estimuladas pelo volume ou depleção de sal, reduções na pressão de perfusão vascular renal e atividade nervosa simpática (Hackenthal *et al.*, 1990; Almeida *et al.*, 2019). No presente estudo, observamos que ratos do grupo Vit. D- exibem elevação sustentada da expressão de ANGII e níveis normais de eletrólitos no sangue. A deficiência de Vit.D leva ao aumento de ANGII plasmático, que aumenta a ingestão de água e a absorção renal e intestinal de sal sendo que a ANGII é um potente agente indutor da sede que

atua no SNC e desempenha um papel importante na absorção renal e intestinal de sódio (Skorecki et al., 2016; Fitzsimons, 1980). Observamos que os animais do grupo Vit. D- excretam mais água e sódio para manter o volume e a homeostase eletrolítica. A ANGII é um potente vasoconstritor cujo aumento também leva ao desenvolvimento de hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca em camundongos *knockout* para VDR (Li et al., 2002). A Vit. D desempenha um papel protetor no sistema cardiovascular, suprimindo a atividade de SRA independente dos níveis de cálcio e fósforo extracelular (Zhou et al., 2008). Vários estudos têm demonstrado que a Vit. D modula negativamente o SRA e que sua deficiência aumenta a pressão arterial em humanos e animais (Li et al., 2002; Zhou et al., 2008; Nascimento et al., 2012; Tare et al., 2010). Portanto, um novo estado estacionário para o SRA está presente em ratos Vit. D- onde a expressão basal de ANGII é maior.

O rim possui uma estrutura altamente organizada contendo redes vasculares complexas que são críticas para sua função (Madsen et al., 2013; Chade et al., 2013; Chade et al., 2017). No presente estudo, ratos do grupo Vit. D- apresentaram rarefação nos vasos renais medulares e nos compartimentos tubulointersticiais do córtex renal, o que também foi observado nos capilares glomerulares. Esses resultados indicam um provável distúrbio na maturação dessa rede vascular renal. A quiescência dessas estruturas vasculares e do parênquima medular renal é fundamental para o manuseio normal de sódio e excreção urinária (Madsen et al., 2013). Além disso, vários estudos experimentais em roedores mostraram uma correlação entre fluxo sanguíneo medular renal e hipertensão (Roman et al., 1988; Cowley et al., 1992; Lu et al., 1994).

Estudos clínicos têm demonstrado uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos de Vit. D e a função endotelial avaliada por vasodilatação mediada por fluxo em pacientes (Tarcin et al., 2009). Tare et al. (2011) demonstraram que ratos jovens com deficiência de Vit. D durante e após o desenvolvimento, apresentam alterações endoteliais, tais como resistência para vasodilatação devido à liberação deficiente de NO. Alguns estudos clínicos têm mostrado melhora da função endotelial com suplementação de Vit. D (Kumar et al., 2017; Chitalia et al., 2014). A função endotelial foi melhorada devido ao aumento da expressão da atividade da eNOS e maior produção de NO, juntamente com a inibição do aumento do estresse oxidativo causado pela ANGII aumentada (Mollnau et al., 2002). Nossos resultados demonstram que ratos com deficiência de Vit. D apresentam um aumento sistêmico de ANGII, aumento da expressão de renina no tecido renal, e diminuição da produção de NO e eNOS, e essas alterações foram mais intensas com o avançar da idade. No endotélio vascular, a eNOS, também conhecida como óxido nítrico sintase (NOS3), é uma enzima responsável pela síntese do NO (Rafikov et al., 2011). Os níveis diminuídos de NO observados nos tecidos renais em nosso estudo podem ser devidos à

diminuição da expressão de eNOS, que pode levar ao aumento da vasoconstrição em animais Vit. D- e deve contribuir para o aumento da PAS, conforme observado por nossos resultados.

A hipótese formulada foi de que o desenvolvimento renal depende da integridade do SRA modulando a angiogênese que está alterada nos animais com deficiência de Vit. D. Portanto, a rarefação da microvasculatura renal, pode ser pelo menos em parte provocada pelo desbalanço entre fatores pró- e anti-angiogênicos regulados pelo SRA. Portanto, analisamos o eixo intrínseco renal, relacionados com a angiogênese, vasculogênese e manutenção da integridade do endotélio vascular (Rizkalla *et al.*, 2003). Esse eixo é formado por duas grandes vias, a ANGII/VEGF-VEGFR, e ANGII/Angpt1-Angpt2 e seu receptor de tirosina kinase (Tie2 ou Tek) (Rizkalla *et al.*, 2003). Hanahan e Folkman (1996) propuseram que esses fatores atuam em sincronia durante a resposta angiogênica. Nossos resultados demonstram que os animais Vit. D- (3 e 6 meses) tiveram aumento na expressão da Angpt-2 e diminuição da Angpt-1 comparado aos controles, o que pode explicar a rarefação vascular observada nos animais dos grupos Vit. D.

Otani *et al.* (2001) demonstraram que ANGII estimula a expressão de Angpt-2, mas não a expressão de Angpt-1, em células endoteliais microvasculares da retina, principalmente via receptor AT1. Em contraste com a sinalização Angpt-1/Tie2, a ativação da sinalização Angpt-2/Tie2 leva à perda dos complexos juncionais célula-célula e desestabilização vascular (Biel *et al.*, 2016). Esses achados explicam o efeito do aumento da expressão do receptor AT1 e ANGII em distúrbios relacionados à angiogênese. Essas alterações levam a anormalidades da microvasculatura que persistem na vida adulta.

Estudos anteriores demonstraram que o VEGF também estimula a expressão da eNOS em células endoteliais, resultando na geração de NO bioativo (Lobov *et al.*, 2002, Mollnau *et al.*, 2002). A diminuição da expressão de eNOS observada no grupo Vit. D- pode estar relacionada à diminuição da expressão de VEGF nesse grupo em comparação com o GC. Nossos resultados mostram também que essas alterações aumentam com a idade, indicando uma acentuação dos distúrbios pré-existentes, com o envelhecimento.

A deficiência materna de Vit. D observada no nosso estudo pode contribuir também para o aumento no número de glomérulos, gerando, como consequência, glomérulos imaturos quando comparado aos animais do grupo controle. Correlações inversas entre o número de néfrons e o tamanho glomerular foram previamente descritas em estudos experimentais (Maka *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*; 2012). Esses achados de glomérulos imaturos, podem explicar, em partes, o aumento da PAS observada nos animais do grupo Vit. D-. Estudos anteriores, reportaram uma correlação negativa entre o número de glomérulos e a pressão arterial em humanos (Keller *et al.*, 2007) e em roedores (Villar-Martini *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2017).

Em conjunto, os resultados, tendo em vista as robustas evidências obtidas, comprovam a participação da Vit.D na regulação da microcirculação renal durante o desenvolvimento. Um dos meios pelos quais a Vit.D exerce esse efeito é através da modulação do SRA que está relacionada com a liberação dos fatores pró- e anti-angiogênicos.

Outras análises por meio de quantificações estereológicas, como o comprimento, volume e / ou área de superfície da vasculatura renal tanto no córtex quanto na medula, devem ser realizadas para melhor avaliação desse processo. Concluindo, com todas as limitações envolvendo modelos experimentais, o atual estudo pode contribuir para o maior entendimento sobre os mecanismos através dos quais a deficiência de Vi. D durante o desenvolvimento renal provoca diversos distúrbios na vida adulta, como hipertensão e insuficiência renal.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que a deficiência de Vit.D durante o período de desenvolvimento renal causa alterações permanentes na estrutura e função renal em ratos Wistar Hannover, sendo as seguintes alterações observadas:

- A deficiência de Vit. D durante o desenvolvimento renal ocasionou alterações na prole na vida adulta, tais como:
- Aumento de ANGII plasmática e aumento da expressão de AT1 no tecido renal;
- Diminuição do nível sérico de Vit. D;
- Falta de diferenciação do túbulo proximal renal, tais como a região apical, como diminuição na expressão cubulina, o receptor responsável pela reabsorção de Vit.D;
- Diminuição na habilidade de concentração urinária;
- Aumento da pressão arterial sistólica;
- Comprometimento na expressão renal e plasmática do sistema NO-eNOS;
- Distúrbios no eixo intrínseco renal dos fatores pró e anti-angiogênicos, tais como as Angiopietinas 1 e 2 e seu receptor Tie-2, e o VEGF e seu receptor VEGFR;
- Rarefação da microvasculatura renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. F.; COIMBRA, T. M. When Less or More Isn't Enough: Renal Maldevelopment Arising from Disequilibrium in the Renin-Angiotensin System. **Front Pediatr**, v. 7, n. 296, Jul 2019.

ALMEIDA, L. F.; TOFTENG, S. S.; MADSEN, K. JENSEN, B. L. Role of the renin-angiotensin system in kidney development and programming of adult blood pressure. **Clin Sci**, v.134, n. 6, p. 641-656, Mar 2020.

ANDERSON, L. C., FOX, J. G., OTTO, G., M., PRITCHETT-CORNING, K. R., & WHARY, M., T. **Laboratory animal medicine – 3rd Edition – Elsevier**, 2015.

Babenko, O.; Kovalchuk, I.; Metz, G. A. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 48, p.70-91, Jan 2015.

BALBI, A. P. C.; MARIN, E. C. S.; FRANCESCATO, H. D. C.; COSTA, R. S.; COIMBRA, T. M. MAPK and angiotensin II receptor in kidney of newborn rats from losartan-treated dams. **Pediatr Nephrol**, v. 23, p. 1433-1444, Jan 2008.

BARDONOSO, S. Maternal micronutrient deficiency during the first trimester among Indonesian pregnant women living in Jakarta. **JKI**, v. 4, p. 76-81, 2016.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Low birth weight and hypertension. **BMJ**, v. 297, n. 6641, p. 134-135, Jul 1988.

BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. *Br.Heart J.*, v. 69, n. 3, p. 195-196, Mar 1993. BARKER, D. J. The fetal origins of hypertension. **J.Hypertens.Suppl**, v. 14, n. 5, p. S117-S120, Dec 1996.

BELL, D. S. Protean manifestations of vitamin D deficiency, part 1: the epidemic of deficiency. **South Med J**, v.104, n. 5, p. 331-334, May 2011.

BIEL, N. M.; SIEMANN, D. W. Targeting the Angiopoietin-2/Tie-2 axis in conjunction with VEGF signal interference. **Cancer Lett.** v. 380, n. 2, p. 525-533, Oct 2016.

BOYCE, A. C.; PALMER-ARONSTEN, B. J.; KIM, M.Y.; GIBSON, K. J. Maternal vitamin D deficiency programmes adult renal renin gene expression and renal function. **J Dev Orig Health Dis**, n. 4, v.5, p. 368-376, Oct 2013.

BISPHAM, J.; GARDNER, D. S.; GNANALINGHAM, M. G.; STEPHENSON, T.; SYMONDS, M. E.; Budge, H. Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: differential effects on messenger ribonucleic acid abundance for uncoupling

proteins and peroxisome proliferator-activated and prolactin receptors. **Endocrinology**, n. 9, v. 146, p. 3943-3949, Sep 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CHADE, A. R. Renal vascular structure and rarefaction. **Comprehensive Physiology**, v.3, n. 2, p. 817-831, Apr 2013.

CHADE A. R. Small Vessels, Big Role: Renal Microcirculation and Progression of Renal Injury. **Hypertension**, v. 69, n. 4, p. 551-563. Apr 2017.

CHITALIA, N.; ISMAIL, T.; TOOTH, L.; BOA, F.; HAMPSON, G.; GOLDSMITH, D.; KASKI, J.C.; BANERJEE, D. Impact of vitamin D supplementation on arterial vasomotion, stiffness and endothelial biomarkers in chronic kidney disease patients. **PLoS ONE** v. 9, e91363, Mar 2014.

COWLEY, A. W., ROMAN, R. J., FENOY, F. J., MATTSON, D. L. Effect of renal medullary circulation on arterial pressure. **J Hypertens Suppl**, v. 10, n. 7, p. 187-193, Dec 1992.

CRAGAN, J. D.; YOUNG, B. A.; CORREA, A. Renin-angiotensin system blocker fetopathy. **J Pediatr**, v. 167, p. 792-794, Oct 2015.

CUI, X. Y., PELEKANOS, M., BURNE, T. H. J., McGRATH, J. J., EYLES, D. W. Maternal vitamin D deficiency alters the expression of genes involved in dopamine specification in the developing rat mesencephalon. **Neurosci. Lett**, v. 486, n. 3, p. 220–223, Dec 2010.

de ALMEIDA, L. F.; FRANCESCATO, H. D. C.; da SILVA, C. G. A.; COSTA, R. S.; COIMBRA, T. M. Calcitriol reduces kidney development disorders in rats provoked by losartan administration during lactation. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 11472, Sep 2017.

DODIC, M.; ABOUANTOUN, T.; O'CONNOR, A.; WINTOUR, E. M.; MORITZ, K. M. Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. **Hypertension**, v. 40, p.729-734, Oct 2002.

ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, P. C.; MOREIRA, A. C. Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 4, p. 1243-7, Apr 1997.

EYLES, D.; BROWN, J.; MACKAY-SIM, A.; McGRATH, J.; FERON, F. Vitamin D3 and brain development. **Neuroscience**, v.118, n.3, p. 641-653, May 2003.

EREMINA, V.; SOOD, M.; HAIGH, J.; NAGY, A.; LAJOIE, G.; FERRARA, N.; GERBER, H. P.; KIKKAWA, Y.; MINER, J. H.; QUAGGIN, S. E: Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. **J Clin Invest**, v. 111, p. 707– 716, 2003.

FREUNDLICH, M.; QUIROZ, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; BRAVO, Y.; WEISINGER, J. R. LI, Y.C.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. **Kidney Int**, v. 74, n. 11, p.1394-1402, Dec 2008.

FIEDLER, U.; AUGUSTIN, H. G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. **Trends Immunol**, v. 27, n. 12, p. 552-558, Dec 2006.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin stimulation of the central nervous system. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol**, v. 87, 117-167, Jun 1980.

FRANCESCATO, H. D. C.; ALMEIDA, L. F.; REIS, N. G.; FALEIROS, C. M.; PAPOTI, M.; COSTA, R. S.; COMIBRA, T. M. Previous Exercise Effects in Cisplatin-Induced Renal Lesions in Rats. **Kidney Blood Press Res**, v. 43, n.2, p. 582-593, Apr 2018.

GAO, X.; CHEN, X.; TAGLIENTI, M.; RUMBALLE, B.; LITTLE, M. H.; KREIDBERG, J. A. Angioblast-mesenchyme induction of early kidney development is mediated by Wt1 and Vegfa. **Development**, v.132, n. 24, p.5437-5449, Nov 2005.

GUNHILD, K., ZIMMER, G., MALL, G., RITZ, E., AMANN, K. Nephron number in patients with primary hypertension. **N Engl J Med**, v. 348, p. 101-108, Jan 2003.

GUTKOWSKA, J.; THIBAUT, G.; MILNE, R. W.; JANUSZEWICZ, P.; SCHILLER, P. W.; CANTIN, M.; GENEST, J. Radioimmunoassay of atrial natriuretic factor (ANF) in rat atria. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 176, n. 2, p. 105-8, Jun 1984.

HAACK, D.; VECSEI, P.; LICHTWALD, K.; VIELHAUER, W. Corticosteroid and corticosteroid metabolite levels in animals immunized against corticosteroids. **J Steroid Biochem**, v. 11, n. 1c, p. 971-80, Jul 1979.

HAANWINCKEL, M. A.; ELIAS, L. K.; FAVARETTO, A. L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7902-6, Aug 1995.

HACKENTHAL, E.; PAUL, M.; GANTEN, D.; TAUGNER, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiol Ver**, v. 70, n. 4, p. 1067-1116, Oct 1990.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, 353–364, Aug 1996.

HANAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science**, v. 277, p. 48–50, 1997.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**, v. 357, n. 3, p. 266–281, Jul 2007.

HOLICK, M. F; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n.4, p. 1080S-6S, Apr 2008.

IOSIVIP, I. V.; SCHROEDER, V. A role for angiotensin II AT₁ receptors in ureteric bud cell branching. **Am J Physiol Ren Physiol**, v. 285, p. 199-207. Aug 2003.

JUNGE, W.; WILKE, B.; HALABI, A.; KLEIN, G. Clin. Chem. Act. v. 344, p. 137-148, Jun 2004.

KAKUSHI, J.; ICHIKI, T.; KITAMA, S.; HOGAN, B. L. M.; FOGO, A.; INAGAMI, T. *et al.* Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. **Kidney Int**, v. 47, n. 1, p. 140-147, Jan 1995.

KASEDA, R.; HOSAJIMA, M.; SATO, H.; SAITO, A. Role of megalin and cubilin in the metabolism of vitamin D(3). **Ther Apher Dial**, V. 15 Suppl 1:14-7, Jun 2011.

KHORRAM, O.; KHORRAM N, MOMENI, M.; HAN, G.; HALEM, J.; DESAI, M.; ROSS, M. G. Maternal undernutrition inhibits angiogenesis in the offspring: a potential mechanism of programmed hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 2, p. 45-53. Aug 2007.

KHORRAM, O.; GHAZI, R.; CHUANG, T. D.; HAN, G.; NAGHI, J.; NI, Y.; PEARCE, W. J. Excess maternal glucocorticoids in response to in utero undernutrition inhibit offspring angiogenesis. **Reprod Sci**, v. 21, n. 5, p. 601-11, May 2014.

KLIEM, V.; JOHNSON, R. J.; ALPERS, C. E.; YOSHIMURA, A.; COUSER, W. G.; KOCH, K. M.; FLOEGE, J. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. **Kidney Int**, v. 49. n. 3. p. 666-678. Mar 1996.

KOLATSI-JOANNOU, M., LI, X. Z.; SUDA, T.; YUAN, H. T.; WOOLF, A. S. Expression and potential role of angiopoietins and Tie-2 in early development of the mouse metanephros. **Dev Dyn**, v 222, p. 120-126, Aug 2001.

KUMAR, V.; YADAV, A. K.; LAL, A.; KUMAR, V.; SINGHAL, M.; BILLOT, L.; GUPTA, K. L.; BANERJEE, D.; JHA, V. A randomized trial of vitamin D supplementation on vascular function in CKD. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 28, n. 10, p. 3100-3108, Jun 2017.

LI, Y. C.; KONG, J.; WEI, M.; CHEN, Z. F.; LIU, S. Q. CAO, L. P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **J Clin Investig**, v.110, n. 2, p. 229-238, Jul 2002.

LITTLE, M. H.; McMAHON, A. P. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, vol. 4, p. 1-8, May 2012.

SCHELL, C.; WANNER, N.; HUBER, T. B. Glomerular development – Shaping the multicellular filtration unit. **Sem in Cell & Dev Biol**, vol. 36, p. 39-49, Dec 2014.

LOBOV, I. B.; BROOKS, P. C.; LANG, R. A. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 20; n. 17; 11205-11210, Aug 2002.

LOUEY, S.; COCK, M. L.; HARDING, R. Effects of intrauterine growth restriction on postnatal arterial pressure and growth in sheep. **FASEB J**, vol.16, n. 4, Abst 125.11p A103. 37, 2002.

LU, S. H.; MATTSON, D. L.; COWLEY, A. W.. Renal medullary captopril delivery lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 23, p. 337-345, Mar 1994.

MADSEN, K.; MARCUSSEN, N.; PEDERSEN, M.; KJAERGAARD, G., FACEMIRE, C.; COFFMAN, T. M. et al. Angiotensin II promotes development of the renal microcirculation through AT1 receptors. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, p. 448-459, Mar 2010.

MADSEN, K.; TINNING, A. R.; MARCUSSEN, N.; JENSEN, B. L. Postnatal development of the renal medulla; role of the renin-angiotensin system. **Acta Physiol**, n. 208, p. 41–49, Feb 2013.

MAISONPIERRE, P. C.; SURI, C.; JONES, P. F.; BARTUNKOVA, S.; WIEGAND, S. J.; RADZIEJEWSKI, C. COMPTON, D.; McCLAIN, J.; ALDRICH, T. H. PAPADOPOULOS, N.; DALY, T. J.; DAVIS, S.; SATO, T. N.; YANCOPOULOS, G. D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science**, v. 277, p. 55-60, Aug 1997.

MAKA, N.; MAKRAKIS, J.; PARKINGTON, H. C., Tare, M.; MORLEY, R.; BILACK, M. J. Vitamin D deficiency during pregnancy and lactation stimulates nephrogenesis in rat offspring. **Pediatr Nephrol**, v. 23, p. 55–61, Oct 2008.

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol**, vol. 62, n.4a, Nov 2002.

MARIN, E. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; COSTA, R. S.; da SILVA, C. G.; COIMBRA, T. M. The role of oxidative stress in renal injury induced in rats by losartan exposition during lactation. **J. Renin. Angiotensin. Aldosterone Syst**, v. 15, p. 362-377, Feb 2013.

McMAHON, A. P. Development of the mammalian kidney. **Curr Top Dev Biol**, v. 117, p. 31-64, Aug 2016.

MILLAN, M.; CARVALLO, P.; IZUMI, S.; ZEMEL, S.; CATT, K.; AGUILERA G. Novel sites of expression of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus. **Science**, v. 244, p. 1340-1342, Jun 1989.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. The Developing Human: 11th edition Clinically Oriented Embryology. Philadelphia, PA: W.B. Saunders 2020.

MORITZ, K. M.; DODIC, M.; WINTOUR, E. M. Kidney development and the fetal programming of adult disease. **Bioessays**, v. 25, p. 212-230, Feb 2003.

MOLLNAU, H.; WENDT, M.; SZÖCS, K.; LASSÈGUE, B.; SCHULZ, E.; OELZE, M.; LI, H.; BODENSCHATZ, M.; AUGUST, M.; KLESCHYOV, A. L.; et al. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circ. Res.**, v. 90, n. 4, p. 58-65, Feb 2002.

MORLEY, R.; CARLIN, J. B.; PASCO, J. A.; WARK, J. D. Maternal 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone concentrations and offspring birth size. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, n. 3, v. 91, p. 906-912, Mar 2006.

MULLIGAN, M. L.; FELTON, S. K.; RIEK, A. E. Bernal-Mizrachi C. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. **Am J Obstet Gynecol**, v. 202, n. 5, 429, e1-9, May 2010.

NADEEM, S., HASHMAT, S.; DEFREITAS, M. J.; WESTREICH, K. D.; SHATAT, I. F.; SELEWSKI, D. T. *et al.* Renin angiotensin system blocker fetopathy: a midwest pediatric nephrology consortium report. **J Pediatr**. v. 167, n. 4, p. 881-885, Jun 2015.

NASCIMENTO, F. A. M.; CECILIANO, T. C.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-de-LACERDA, C. A. Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e41740, Aug 2012.

NEJAD, K. Z.; LUYCKX, V. A.; BRENNER, B. M. The role of fetal programming. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 502-508, Jan 2006.

NEGRI, A. L. Proximal tubule endocytic apparatus as the specific renal uptake mechanism for vitamin D-binding protein/25-(OH)D3 complex. **Nephrology (Carlton)**, v. 11, n. 6, 510-515. Dec 2006.

NORWOOD, V. F.; CRAIG, M. R.; HARRIS, J. M.; GOMEZ, R. A. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 272, p.662-668, Feb 1997.

NYKJAER, A.; FYFE, J. C.; KOZYRAKI, R.; LEHESTE, JR.; JACOBSEN, C.; NIELSEN, M. S. et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, n. 24, p. 13895-13900, Nov 2001.

OTANI, A.; TAKAGI, H.; Oh, H.; KOYAMA, S.; HONDA, Y. Angiotensin II induces expression of the Tie2 receptor ligand, angiopoietin-2, in bovine retinal endothelial cells. **Diabetes**, v. 50, n. 4, p. 867-875, Apr 2001.

PAPAPETROPOULOS, A.; GARCIA-CARDENA, G.; DENGLER, T. J.; MAISONPIERRE, P. C.; YANCOPOULOS, G. D. SESSA, W. C. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: Evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. **Lab Invest**, v. 79, p. 213–223, Feb 1999.

PASCO, J. A.; WARK, J. D.; CARLIN, J. B.; PONSONBY, A. L.; VUILLERMIN, P. J.; MORLEY, R. Maternal vitamin D in pregnancy may influence not only offspring bone mass but other aspects of musculoskeletal health and adiposity. **Medical Hypotheses**, n. 2, v. 71, p. 266-269, Aug 2008.

RAFIKOV, R.; FONSECA, F. V.; KUMAR, S.; PARDO, D.; DARRAH, C.; ELMS, S.; FULTON, D.; BLACK, S. M. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **J Endocrinol**, v.3, p. 271-284, Sep 2011.

RAMAGOPALAN, S. V.; HEGER, A.; BERLANGA, A. J.; MAUGUERI, N.J.; LINCOLN, M. R.; BURREL, A.; HANDUNNETHI, L.; HANDEL, A.E.; DISANTO, G.; ORTON, S.M.; WATSON, C. T.; MORAHAN, J. M.; GIOVANNONI, G.; PONTING, C. P.; EBERS, G. C.; KNIGHT, J. C. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. **Genome Res**, v. 2, n.10, p.1352-1360, Oct 2010.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. HIESEN, F. H. FAHEY, G. C. Jr. 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. **J Nutr**, v. 123, p. 1939–1951, 1993.

RIZKALLA, B.; FORBES, J. M.; COOPER, M. E.; CAO, Z. Increased renal vascular endothelial growth factor and angiopoietins by angiotensin II infusion is mediated by both AT1 and AT2 receptors. **J Am Soc Nephrol**, v.14, n. 12, p. 3061-3671. Dec 2003.

ROMAN, R. J., KALDUNSKI, M. L. Renal cortical and papillary blood flow in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 11, p. 657-663, Jun 1988.

SATCHELL, S. C.; HARPER, S. J.; TOOKE, J. E.; KERJASCHKI, D.; SALEEM, M. A.; MATHIESON, P. W. Human podocytes express angiopoietin 1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factot. **J Am Soc Nephrol**, vol. 13, p. 544-550, Feb 2002.

SERGEEV, I. N. Vitamin D-Cellular Ca²⁺ link to obesity and diabetes. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v. 164, p. 326-330, Nov 2016.

SKORECKI, K.; CHERTOW, G. M.; MARSDEN, A. P.; TALL, M. W.; YU, A. S. L. Brenner & Rector's the Kidney; **Elsevier: Philadelphia, PA, USA**, 2016.

SONG, R.; PRESTON, G.; YOSYPIV, I. V. Angiotensin II stimulates *in vitro* branching morphogenesis of the isolated ureteric bud. **Mech Dev**, v. 128, p. 359-67, Sep-Dec 2011.

SPARKS, M. A.; CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; MIROTSOU, M.; COFFMAN, T. M. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. **Compr Physiol**. v. 4, n. 3, p. 1201-1228, Jul 2014.

SURI, C.; JONES, P. F.; PATAN, S.; BARTUNKOVA, S.; MAISONOIERRE, P. C.; DAVIS, S.; SATO, T. N.; YANCOPOULOS, G. D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell**, v. 87, p. 1171-1180, Dec 1996.

SVITOK, P.; OKULIAROVA, M.; VARGA, I.; ZMAN, M. Renal impairment induced by prenatal exposure to angiotensin II in male rat offspring. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 11, p.923-931, May 2019.

TARCIN, O.; YAVUZ, D.G.; OZBEN, B.; TELLI, A.; OGNUC, A. V.; YUKSEL, M.; TOPRAK, A.; YAZICI, D.; SANCAK, S.; DEYNELI, O.; et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 94, n. 10, p. 4023-4030, Oct 2009.

TARE, M.; EMMETT, S. J.; COLEMAN, H. A.; SKORDILIES, C.; EYLES, D. W.; MORLEY, R.; Parkington, H. C. Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. **J. Physiol.** , v. 589, n, 19 p. 4777-4786, Oct 2011.

THOMAS, M.; AUGUSTIN, H.G.; The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. **Angiogenesis**, v. 12, n. 2, p.125-137. May 2009.

TRIUNFO, S.; LANZONE, A. Potential impact of maternal vitamin D status on obstetric well-being. **J Endocrinol Investig**, v. 39, p. 37-44, 2016.

TUFRO-McREDDIE, A.; NORWOOD, V. F.; AYLOR, K. W.; BOTKIN, S. J.; CAREY, R. M.; GOMEZ, R. A. Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. **Dev Biol**, v. 183, p. 139- 149, 1997.

VILLAR-MARTINI, V. C.; CARVALHO, J. J.; NEVES, M. F.; AGUILA, M. B, Mandarim-de-Lacerda, C. A. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. **J Hypertens Suppl**,; v. 27, n. 6, p. 47-51, Aug 2009.

WEN, J., HONG, Q., WANG, X., ZHU, L., WU, T., XU, P., FU Z. LIANGHUI, Y, WANG, X, JI, C.; GUO, X. The effect of maternal vitamin D deficiency during pregnancy on body fat and adipogenesis in rat offspring. **Sci Rep**, n. 365, v. 8, Jan 2018.

WOOLF, A. S., GNUDI, L.; LONG, D. A. Roles of angiopoietins in kidney development and disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 2, p. 239-44, Feb 2009.

YUAN, W.; PAN, W.; KONG, J.; ZHENG, W.; SZETO, F. L.; WONG, K. E.; COHEN, R.; KLOPOT, A.; ZHANG, Z.; LI, Y. C. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. **J Biol Chem**, v. 282, n. 41, p. 29821-29230, Oct 2007.

ZHOU, C.; LU, F.; CAO, K.; XU, D.; GOLTZMAN, D.; MIAO, D. Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. **Kidney Int**, v. 74, n. 2, p. 170-179, Jul 2008.

Zimanyi, M.A.; Bertram, J.F.; Black, M.J. Does a nephron deficit in rats predispose to salt-sensitive hypertension? **Kidney Blood Press. Res**, v. 27, p. 239–247, Sep 2004.

Anexo 1

Project title: LONG-TERM CONSEQUENCES IN ADULT LIFE OF IMPAIRED RENAL MEDULLARY MICROVASCULAR FORMATION DURING KIDNEY DEVELOPMENT

Abstract

Adverse events during fetal development are associated with increased risk of hypertension and cardiovascular and metabolic diseases later in life, a correlation known as fetal programming. The kidneys are particularly prone to fetal programming alterations specially when there is a disruption on the renin-angiotensin cascade during development. One of the specific targets of these alterations is the kidney vasculature. A seminal work by Madsen and coworkers reported that treatment of rats for 2 weeks after birth with AT₁ receptor antagonist decreased the surface area, volume, and total length of capillaries, in association with inhibition of the expression levels of the transcription of angiogenic growth factors. The long-term effects of this receptor blockade are still yet to be investigated. Thus, we proposed a collaborative study between the two research groups to explore the long-term effects of the pharmacological blockage of AT₁. We hypothesized that postnatal development of the kidney depends on ANGII-stimulated angiogenesis and that medullary injury after RAS inhibition is caused by impaired development of the microvasculature that persists in adulthood. The hypothesis was addressed *in vivo* by application of unbiased quantitative stereologic methods. Postglomerular microvascular length, volume, and surface area were determined in rat kidneys at P16 after treatment with ANGII type 1 (AT₁) inhibitor during the P7-P15 of postnatal life. The impaired development of the renal medullary microvasculature in the postnatal period independent of glomerular formation leads to functional impairment in adulthood with decreased urine concentrating ability and hypertension.

Introduction

Adverse events during fetal development are associated with increased risk of hypertension and cardiovascular and metabolic diseases later in life, a correlation known as fetal programming. The term "programming" originally coined by Lucas (1991) [1], is used to describe the process by which exposure to specific environmental stimuli or insults during critical phases of development, can trigger adaptations that result in permanent changes to the physiology of the organism [2].

The kidneys are particularly prone to fetal programming alterations specially when there is a disruption on the renin-angiotensin system (RAS) cascade during development [3,4]. The pathophysiological mechanisms are not fully understood but have been associated with impaired nephron endowment. All the components of the RAS are highly expressed in the kidneys during the period of renal development. Human kidney development is completed *in utero* by week 36 [5], whereas in the rat, nephrogenesis continues into the second postnatal week [6]. Rats are born with immature kidneys, and the first 2 postnatal weeks correspond to the second and third trimesters of kidney development in the human fetus. Therefore, the neonatal rat model seems useful for studying the mechanisms of kidney development in the human fetus [7].

We have previously shown that postnatal blockade of RAS during the lactation, a critical window of development (first 3 weeks of life) in rats induces a persistent defect in renal urinary concentrating ability associated with renal histopathological changes, mainly characterized by impaired glomerular maturation, chronic interstitial inflammation and papillary atrophy [7,8]. Although exactly how ANGII-AT₁ signaling is involved in nephrogenesis remains to be elucidated.

The renal medulla contributes significantly to systemic blood control through regulation of sodium excretion and fetal programming includes enhanced salt sensitivity of blood pressure [9,10]. Normal salt excretion is a function that relies partly on unique architecture and close tubulovascular relationship of the renal medulla. However, the contribution of the medullary developmental changes to the programming effect of adult hypertension is not known. Taken together, these studies support an important role of ANGII-AT₁ signaling for development of the cortical/glomerular microvasculature but little information is currently available regarding the medullary microcirculation and vasa recta bundle formation.

The present study was designed to address the hypothesis that ANGII signaling acting through AT₁ receptor in the critical postnatal window of vasa recta bundle formation is necessary

for normal development of the renal medullary microvessels including vascular patterning and expansion of vasa recta bundles.

We hypothesize that impaired development of the renal medullary microvasculature in the postnatal period independent of glomerular formation leads to functional impairment in adulthood with decreased urine concentrating ability and hypertension.

SPECIFIC AIMS

- 1- To establish an animal model of impaired renal medullary microvascular development with intact nephrogenesis and thus an intact number of glomeruli.
- 2- To determine long-term functional effects of impaired development of the renal medullary microvasculature in adult life.

MATERIAL & METHODS

Animals

Experimental series 1

We established an animal model of kidney development driven by the ANGII-AT₁ receptor. In this model, rat pups were treated in two different periods with AT₁ receptor antagonists in the postnatal period, a time period in rodents representing late stages of nephrogenesis, in addition to the development and functional maturation of the renal medulla.

Animals were housed at the Biomedical Laboratory, University of Southern Denmark. Female Sprague-Dawley rats were used for breeding. Dams and pups were kept on a 12:12 light-dark cycle with free access to standard pathogen-free rat chow (2 g/kg Na⁺, 5 g/kg Cl⁻ catalog no.1310; Altromin Lage, Germany) and tap water. To avoid experimental bias, the following principles were applied to all experimental series: 1) litters was reduced to 10 pups within 60 h after birth (this ensures a surplus of mammary glands and thereby equal feeding conditions for all pups), 2) litters were reduced so pups of both gender were equally represented in a balanced way in all litters, preferably five males and five females, 3) all dams and litters were housed in the same room to avoid differences in environmental conditions, and 4) all experimental conditions, were always represented in a balanced way in each and all litters.

To establish an animal model of impaired renal medullary microvascular development with intact nephrogenesis and thus an intact number of glomeruli the rat pups were treated with daily subcutaneous injections of candesartan (1 mg/kg) or vehicle (isotonic saline) from P7-P15 and P10-P15 that represents the sensitive time period with architectural organization and maximal expansion of the vasa recta bundles independent of active nephrogenesis that ceases at P7 (**Figure 1**). Based on previous studies, a number of $n=10$ animals in each experimental group were sufficient for statistically significant results. On P16, rat pups were anesthetized with intraperitoneal injections of pentobarbital sodium (Nembutal 50 mg/kg). The left and right kidney were fixed by systemic perfusion through the left cardiac ventricle with 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for 4 minutes. The kidneys were weighed and immersed in 4% paraformaldehyde for 24 hours before processing for morphological and stereological analyses.

Stereology

Figure 1. Experimental design for series 1.

Quantitative morphological evaluation of the renal medullary microvasculature was analyzed by an unbiased stereological approach.

Fixed kidneys were cut 1 mm thick along the longitudinal axis using a device with parallel razor blades. Every second slice were embedded in paraffin and were cut 4 μ m thick, stained with periodic acid-Schiff, and used for estimation of volume of kidney zones.

The remaining kidney slices were processed for quantitative stereology measurements of total capillary length, capillary surface area, and capillary volume. For these measurements, isotropic orientation of structures of interest is necessary. This was obtained using a modification of the previously published bisector method. Kidney slices were cut into approximately 1×1 -mm large pieces using a scalpel blade and mixed. One sixth of the pieces were systematically randomly chosen and embedded in paraffin (**Figure 2**). Tissue sections were cut $4 \mu\text{m}$ thick and stained with the endothelial cell marker aminopeptidase P (JG12) (eBioscience™) for correct identification of kidney capillaries.

Figure 2. Kidney slices were cut into approximately 1×1 -mm large pieces using a scalpel blade and mixed. One sixth of the pieces were systematically randomly chosen and embedded in paraffin.

Stereologic quantifications was done using a light microscope with a motorized stage table connected to a video camera and a computer using the software Cast 2000 (Olympus). Volume fractions of kidney zones was done at $\times 4$ magnification using point counting, and measurements of postglomerular capillaries was done at $\times 40$ magnification.

Estimations of postglomerular microvessel length [$L_{(\text{cap})}$] were made based on the assumption that the structures of interest are much longer than their diameter and that the density of the kidney tissue is $10^{12} \mu\text{m}^3/\text{g}$. Thus, the formula used was $L_{(\text{cap})} = 2 \times Q_{A(\text{cap})} \times V_v \times \text{weight of the kidney} \times \text{density}$, where $Q_{A(\text{Cap})}$ is the number of capillary profiles per area and V_v is the volume fraction of the region of interest (ROI; cortex or medulla). Surface area of capillaries was calculated by $S_{(\text{cap})} = 2 \times I_{(\text{cap})} \times V_v \times \text{weight of the kidney} \times \text{density}$, where $I_{(\text{cap})}$ is the number

of profile intersections per area. Volume of capillaries was determined by $V_{\text{cap}} = V_{\text{v(cap)}} \times V_v \times \text{weight of the kidney} \times \text{density}$, where $V_{\text{v(cap)}}$ is the volume fraction of the capillaries. Capillary diameter was calculated through $d = 2 \times \sqrt{V_{\text{cap}}/[\pi \times L_{\text{cap}}]}$. The estimations are made assuming that the capillaries are cylindrical. Area was estimated by $A = 1/L_v$ and radius of diffusion by $r = \sqrt{1/(L_v \times \pi)}$, where L_v is the relative length of the capillaries ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$ tissue). The estimations were made based on the assumption that the capillaries are cylindrical and that the area and radius of diffusion are the same in all directions.

Experimental series 2

A group of animals were used to study long-term functional consequences of impaired development of the renal medullary microcirculation. Experimental conditions were as described in detail in series 1. Rat pups are treated with the AT_1 receptor antagonist candesartan (1 mg/kg) or vehicle from P7-P15. N=10 animals were included in both experimental groups. In adulthood (P90), maximal urinary concentration ability and blood pressure were determined (**Figure 3**).

Figure 3. Experimental design for series 2.

Urine concentrating and Osmolality

Rats were placed individually in metabolic cages with daily monitoring of food and water intake in addition to urine and faeces output (**Figure 4**). After a two-day run-in period, baseline urine concentrating ability was tested by measurement of urine osmolality in urine samples collected during a 24-hour period. Thereafter rats were food and water deprived for 24 hours and urine collected during two consecutive 4 and 6 hours periods; (i) prior to administration of 1-desamino-8-D-arginase vasopressin (Ddvp, Minirin^R, Ferring AB, Mamo, Sweden), 24-28 h

after initiating water deprivation, and (ii) following administration of Ddvp ($1\mu\text{g kg}^{-1}$, intraperitoneal [i.p.]), 24-30 h after initiating water deprivation. The osmolality of urine collected after 24-30 h of water deprivation and following dDVAP administration was considered as $U_{\text{osm}_{\text{max}}}$. Urine samples were collected for albumin using the Urinary Proteins Kit (TrioLab A/S) and measured on Cobras Mira Plus (Roche) in accordance with the manufacturer's instructions. Urinary creatinine concentration was determined using the ABX Pentra kit (Horiba ABX SAS) and microlab 300 photometer (Vital Scientific). Urinary osmolality was determined by freeze-point depression (Osmomat 030-D, Gonotec).

Figure 4. The animals were monitored in metabolic cages. Right panel shows difference on the urinary output between control and treated animals.

Blood pressure measurement

Animals were anesthetized with intraperitoneal injections of pentobarbital sodium (Nembutal 50 mg/kg), and chronic indwelling catheters were placed in the femoral artery. The catheter is tunneled to the neck fold and connected to a swivel system to ensure free and unrestrained movement (**Figure 5**). The catheter was connected to a pressure transducer for continuous intravascular blood pressure monitoring in awake and unstressed animals. A recovery period of 5 days was allowed after surgery to ensure full recovery from surgical stress. Afterwards, blood pressure was monitored for a period of 9 consecutive days. From the fourth day on, the animals were exposed to a high salt diet (3.8% Na^+). On P90, rat pups were anesthetized with intraperitoneal injections of pentobarbital sodium (Nembutal 50 mg/kg). The

right renal artery and vein were ligated, the right kidney removed and snap frozen in liquid nitrogen for molecular analyses. The left kidney was fixed by systemic perfusion through the left cardiac ventricle with 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for 4 minutes. The kidney was weighed and immersed in 4% paraformaldehyde for 24 hours before processing for morphological analyses.

Figure 5. We used adult rats (3 months of age) treated with AT₁ receptor antagonist candesartan or vehicle during postnatal life (P7-P16). Chronic indwelling catheters were placed in the femoral artery and vein, and rats were placed in a swivel system to allow continuous blood pressure measurements in awake and unrestrained animals.

RIA for plasma renin concentrations

Plasma renin concentration (PRC) was measured by ultramicroassay of generated ANGI using renin standards as described [11]. Five serial dilutions from the same plasma sample were assayed in duplicate for all samples. Only when at least three of the dilutions were linear was the measurement accepted. Renin concentration is expressed in Goldblatt units (GU) compared with renin standards from the National Institute for Biological Standards and Control (Hertfordshire, UK).

Statistical Analysis

Values were presented as means $\pm$ SEM. Comparison of means between two groups were made by using a standard unpaired t-test. Comparison of means between more than two groups

were made using one-way ANOVA with post hoc unpaired t test with Bonferroni correction. $P < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analysis was done using the GraphPad InStat 7.0 software.

Results

Effects of AT₁ Receptor Antagonist from P7-P15 and P10-P15 on Vasa Recta Bundles Morphology

In the rats treated with candesartan from P10 through P15 and analyzed from P16, the kidney did not exhibit injury of the medulla (**Figure 6**). The vascular bundles formation presented similar with the control animals. Medulla showed no regularly organized vascular bundles and largest distance in tissue from a capillary. Thus, a specific temporal role of the AT₁ receptor to the development of vasa recta bundles in rat kidney was characterized on P7-P15. The following experimental protocols were performed using AT₁ receptor antagonism between P7-P15.

Figure 6. Effect of AT₁ receptor antagonist from P7-P15 and P10-P15 on expansion of vasa recta bundles during postnatal kidney development in rats. The role of ANGII-AT₁ receptor for expansion of vasa recta bundles during postnatal kidney development was analyzed in rat pups treated with candesartan, an antagonist of AT₁ receptor (1 mg/kg body wt per d), or vehicle (isotonic saline). Endothelial cell immunostaining of kidney tissue using a primary antibody specific for JG12 was performed and cross sections of outer medulla were analyzed at postnatal day (P) 16. No significant differences were observed between the control and candesartan P10-P15. In contrast, the candesartan P7-P15 animals showed disrupted of vasa recta architecture and abnormal thickened capillaries. Magnification: X40; scale bar=100 μ m.

Effects of AT₁ Receptor Antagonist from P7-P15 on Renal Morphology

The AT₁ receptor antagonist candesartan was administered to rat pups during the period with maximal expansion and proliferation of medullary bundles from P7-P15. Treatment with candesartan did not affect the animals body weight but kidney/body weight ratio was significantly decreased compared with control animals (**Figure 7**).

Figure 7. Effect of AT₁ receptor antagonism from P7-P15 on body and kidney weight during postnatal kidney development in rats. Blue symbols represent male animals and the red one's females.

PAS staining of kidney tissue revealed no gross morphological changes on the cortex (**Figure 8a, b**). The Aminopeptidase P (JG12) was used as a marker of endothelial cells within the kidney (**Figure 8c**). As show in figure JG12 localized to the peritubular capillaries. The absence of the AT₁ receptor between days P7-P15 did not alter the glomerular and tubular structure of the renal cortex.

Figure 8. (a) Overview of the PAS-labeled kidneys of the control animals and treated with candesartan during P7-P15, analyzed in P16. Original magnification, X4. (b) micrographs show glomerulus with normal characteristic after candesartan treatment, demonstrating that the treatment with candesartan in the window between P7-P15 does not alter the glomerular formation, the tubes were also intact. Original magnification, X40. (c) Immunohistochemical staining of JG12 show that periglomerular capillaries are not affected by treatment with candesartan during days P7-P15. Original magnification, X40.

In control kidneys, α -SMA was associated with preglomerular arteries and arterioles and vasa recta (Figure 9). In the AT₁ blocker group, labeling for α -SMA was associated with spindle-shaped cells that populated the interstitium in outer medulla, in cortical medullary rays (Figure 9).

Figure 9. Immunohistochemical staining of α -SMA in kidney of control and candesartan treatment during P7-P15 and analyzed in P16. Note an intense α -SMA staining of the medullary region of the animals in the candesartan group compared to the control Original magnification, X4/X40.

Candesartan treatment during the critical window for patterning of vasa recta bundles (P7-P15) led to significant growth restriction. Endothelial cell staining of kidney tissue at P16 showed regular vasa recta formation in the outer medulla of control animals (Figure 10). In response to candesartan treatment, vascular bundle assembly was changed, and bundles were observed with fewer vessels and with a reduced number of capillary profiles in surrounding tissue (Figure 10).

Figure 10. Immunohistochemical staining of primary antibody specific for the endothelial cell marker JG12 in kidney of control and candesartan treatment during P7-P15 and analyzed in P16. Visualization of the medullary microvessels showed appearance of vasa recta in control group but poorly defined vascular in candesartan group. Visualization of the renal medullary microvessels showed normal appearance of vasa recta bundles with tubular segments scattered in between microvessels in outer medulla of candesartan. Original magnification, X10/X40.

In the second series of the present study, we followed animals treated with AT₁ receptor antagonist during P7–P15 until adulthood (3 months) to study the effects of AT₁ receptor lack during the formation of renal microcirculation in adulthood.

Candesartan treatment did not affect body weight (375 ± 21 vs 387 ± 11) compared to controls, whereas the kidney weight to body weight ratio decreased (**Figure 11c**). The animals of the candesartan group presented with renal alterations characterized by atrophic papilla (**figure 11a**), tubules with dilated lumens and tubular epithelial flattening, as well as an increase in the relative interstitial area and fibrotic areas on the outer and inner medulla (**Figure 11b,c**).

Figure 11. (a) Macroscopic aspects of kidney slices from control and candesartan treated animals in P7-P15 period. Note the enlargement of the calyceal system due to papillary atrophy. (b) Representative periodic acid-schiff (PAS) staining of histological sections. Inserts represent the corticomedullary junction. Note that the candesartan treated animals present tubules with dilated lumens and tubular epithelial flattening, as well as an increase in the relative interstitial area and fibrotic areas on the outer and inner medulla (c) Kidney/body weight ratio of control and treated animals. Candesartan treated animals showed a significant reduction of this ratio. (d) Representative periodic acid-schiff (PAS) staining of histological sections of the inner medulla in control and candesartan treated animals. Candesartan treated animals presented tubules with dilated lumens and fibrotic areas.

The immunohistochemical analysis for α -SMA, a marker of cell differentiation showed an intense expression in the tubulointerstitial compartment in the outer and inner medulla in animals treated with candesartan (**Figura 12**). In the control group, α -SMA was associated with preglomerular arteries and arterioles and vasa recta.

Figure 12. Immunohistochemical staining of α -SMA in the kidney of control and candesartan treatment during P7-P15 and analyzed at 3 months of age. Note an intense α -SMA staining of the medullary region of the animals from the candesartan group compared to the control. Original magnification, X4/X40.

Fluid handling and $U_{osm_{max}}$

Candesartan-treated rats showed increased water intake (Figure 13a), urine volume (Figure 13b) and a reduction in U_{osm} during baseline conditions (Figure 13c). U_{osm} in candesartan-treated rats remained decreased compared with vehicle-treated rats after 24 hours of water deprivation and subsequent dDAVP administration (Figure 13c). Changes in U_{osm} in response to dDAVP were not significant in candesartan group.

Figure 13. (a) Water intake and (b) urine output collected under baseline conditions when rats had free access to tap water, and during water deprivation (24h) prior to (d) and after (e-f) administration of Ddvp ($1\mu\text{g kg}^{-1}$, intraperitoneal [i.p.]). (c) Graph showing the effects of water deprivation and 1-desamino-8-D-arginine vasopressin (dDVP) on urine osmolality (Uosm) in 8-9-week-old rats treated neonatally P7-P15 with candesartan ($1\text{mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$, $n=9$) or saline vehicle ($n=9$). Urine was collected under basic conditions when rats had free access to tap water, and during water deprivation prior to and after administration of dDVP ($1\mu\text{g kg}^{-1}$, i.p.). Uosm was significantly reduced in candesartan-treated rats throughout the experiment. Uosm increased in both groups after water deprivation but did not increase further after dDVP injections. Values are expressed as mean SEM. * $p < 0.05$ between groups. # $p < 0.05$ compared with basal Uosm value within respective groups.

The high sodium diet provoked to a suppressed in plasma renin and angiotensin I in both groups. However, the candesartan animals showed no difference response when exposed to a high sodium diet compared to control animals.

Figure 14. The effect of dietary sodium on the depressor response to renin plasma activity. The assay runs with a surplus of angiotensinogen. The angiotensin I (ANGI) and renin was significantly reduced in high salt diet in both groups but did not difference between groups. Values are expressed as mean SEM. * $p < 0.05$ between groups. # $p < 0.05$ compared with baseline diet value within respective groups.

AT₁ receptor deficiency during P7-P15 leads to hypertension in adulthood

No differences in the mean arterial pressure (MAP) were observed between males and females; thus, the MAP data measurements of both sexes are combined for analysis. Figure 14 illustrates the overall MAP profiles analyzed for 24 hours, (12 hours day and 12 hours night) in adult animals for 9 days. The candesartan treated rats became progressively more hypertensive when exposed to a high sodium diet. Remarkably, there was only a slight rise in MAP in the vehicle group after high sodium diet. The effects of high sodium diet were highly significant in the candesartan treated group when analyzed by repeated-measures ANOVA (* $p < 0.05$).

Figure 15. Blood pressure trace showing increased mean arterial pressure (MAP) gradually from day 4 to the end of the protocol. (7-8 per group). * $p < 0.05$ relative to control animals.

Discussion

The main of research has been fetal programming of adult hypertension and in specific, we have tested the role of renal medullary microvascular changes for kidney function and blood pressure regulation in adulthood. The “low nephron number” hypothesis with development of a reduced number of glomeruli has been the traditional way of explaining fetal programming of hypertension. However, a low nephron number *per se* does not give rise to hypertension. We therefore hypothesized that developmental changes to the medullary microvasculature can be involved in the programming effect.

Angiotensin II (ANGII) AT_1 receptor inhibition during kidney development leads to both a reduced number of glomeruli and impaired development of the renal medullary vasa recta bundle system. The first aim experimental work has therefore been to establish an experimental animal model with a selective developmental damage to the renal medulla. We have used rats which is the most well described experimental model in the literature. In rats, glomerular development ceases around postnatal day (P) 7, whereas development of the renal medullary microvasculature is established in between P7 and 10. We tested the effect of pharmacological AT_1 receptor inhibition with candesartan (1 mg/kg/day) in rat pups from P10-16. Kidney morphology and vascular abundance has been

analyzed, and the main result is that no developmental changes can be detected in neither cortex nor medulla. In follow up studies, rat pups were treated with candesartan or vehicle from P7-16. In these animals, a distinct developmental phenotype has been detected with marked deterioration of the medullary vasa recta bundle system but with an intact kidney cortex. To our knowledge, this is the first time that programming events can be tested in a model with a selective renal medullary developmental damage.

The second aim of experimental work has been to do functional characterization of this new animal model. Rat pups have been treated with candesartan or vehicle from P7-P16 and then followed into adulthood. In adulthood, urinary concentrating capacity has been tested in metabolic cages under both baseline and water deprivation conditions. These studies have shown a significantly decreased urinary concentrating capacity in candesartan treated animals. Moreover, blood pressure has been measured. We use a method with surgical implantation of chronic indwelling catheters in the femoral artery. Catheters are tunneled to the neck fold and connected to a swirl system that allow for continuous blood pressure recordings in awake, unstressed and freely moving animals. At baseline, candesartan treated animals show a tendency towards higher blood pressure, however these data do not reach statistical significance. When animals are moved to a high salt diet, candesartan treated animals develop salt sensitive hypertension. These data indicate that renal medullary developmental changes are sufficient to “program” adult hypertension. We are currently doing additional experiments that include stereological quantification of the renal microvasculature and plasma and urine analyses. Results will be published in an international peer review journal within the field of nephrology/kidney physiology.

Plans and activities that are currently being developed.

We will continue the work on this model and plan for the following experimental activities:

- Concluding of stereological quantification of the microvascular damage
- Animal experiments for micro CT analysis of kidney tissue
- Further characterization of the phenotype with molecular analyses of blood, urine and tissue samples.
- Writing of a manuscript for publication

References

1. Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: Bock GR, Whelan J, eds. The childhood environment and adult disease. Chichester, United Kingdom: Wiley, 1991:38–55. (CIBA Foundation Symposium 156).
2. Peter D. Gluckman and Mark A. Hanson. Living with the Past: Evolution, Development, and Patterns of Disease. *Science*, 2004: 1733-1736.
3. Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, et al. Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int.* 1994;45(2):485-492.
4. Guron G, Adams MA, Sundelin B, Friberg P. Neonatal angiotensin-converting enzyme inhibition in the rat induces persistent abnormalities in renal function and histology. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 1):91-97.
5. Seely JC. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. *J Toxicol Pathol.* 2017;2:125-133.
6. Cha JH, et al. Cell proliferation in the loop of Henle in the developing rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2001, 12:1410-1421.
7. de Almeida LF, Francescato HDC, da Silva CGA, Costa RS, Coimbra TM. Calcitriol reduces kidney development disorders in rats provoked by losartan administration during lactation. *Sci Rep.* 2017;7(1):11472.
8. Deluque AL, de Almeida LF, Francescato HDC, et al. Effect of Calcitriol on the Renal Microvasculature Differentiation Disturbances Induced by AT₁ Blockade During Nephrogenesis in Rats. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:23.
9. Justin Yuan and Thomas L. Pannabecker. Architecture of inner medullary descending and ascending vasa recta: pathways for countercurrent exchange. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010, 299: 265-272.
10. K Madsen. AR Tinning, N Marcussen and BL Jensen. Postnatal development of the renal medulla, role of the renin-angiotensin system. *Acta Physiol.* 2013, 208:41-49.
11. Lykkegaard S and Poulsen K. Ultramicroassay for plasma renin concentration in the rat using the antibody trapping technique. *Anal Biochem* 75:250-259, 1976.

Anexo 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Efeito da deficiência de Vitamina D no desenvolvimento renal em ratos*", registrado com o número **190/2016**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Tercila Machado Coimbra**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de janeiro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 15 ratos Wistar fêmeas pesando 200g; 08 ratos Wistar machos pesando 250g e 40 ratos Wistar machos pesando 60g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/01/2017 a 12/12/2019.

We certify that the Protocol nº 190/2016, entitled "*Effect of vitamin D deficiency in the renal development in rats*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 01/30/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 15 female Wistar rats weighing 200g, 08 male Wistar rats weighing 250g and 40 male Wistar rats weighing 60g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/12/2019.

Ribeirão Preto, 30 de janeiro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA - FMRP - USP

Anexo 3

*Journal of Developmental
Origins of Health and
Disease*

cambridge.org/doh

Brief Report

Cite this article: Almeida LF, Francescato HDC, Silva RS, Silva CGA, Antunes-Rodrigues J, de Paula FJA, Coimbra TM. (2019) Renal developmental disturbances and their long-term consequences in female pups from vitamin D-deficient mothers: involved mechanisms. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 20: 491–501. doi: 10.1017/S2046174418000900

Received: 15 August 2018
Revised: 4 October 2018
Accepted: 9 October 2018
First published online: 6 February 2019

Key words:
kidney development; renin angiotensin system; vitamin D deficiency

Address for correspondence:
T. M. Coimbra, Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School/USP, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil. E-mail: tcoimbra@usp.br

Renal developmental disturbances and their long-term consequences in female pups from vitamin D-deficient mothers: involved mechanisms

L. F. Almeida¹, H. D. C. Francescato¹, R. S. Silva², C. G. A. Silva¹,
J. Antunes-Rodrigues¹, F. J. A. de Paula³ and T. M. Coimbra¹

¹Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ²Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil and ³Internal Medicine of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

The mechanisms involved in kidney disturbances during development, induced by vitamin D₃ deficiency in female rats, that persist into adulthood were evaluated in this study. Female offspring from mothers fed normal (control group, $n = 8$) or vitamin D-deficient (Vit.D-, $n = 10$) diets were used. Three-month-old rats had their systolic blood pressure (SBP) measured and their blood and urine sampled to quantify vitamin D₃ (Vit.D₃), creatinine, Na⁺, Ca²⁺ and angiotensin II (ANGII) levels. The kidneys were then removed for nitric oxide (NO) quantification and immunohistochemical studies. Vit.D- pups showed higher SBP and plasma ANGI levels in adulthood ($P < 0.05$) as well as decreased urine osmolality associated with increases in urinary volume ($P < 0.05$). Decreased expression of jG12 (renal cortex and glomeruli) and synaptopodin (glomeruli) as well as reduced renal NO was also observed ($P < 0.05$). These findings showed that renal disturbances in development in pups from Vit.D- mothers observed in adulthood may be related to the development of angiogenesis, NO and ANGI alterations.

Introduction

The association between intrauterine events and subsequent renal diseases has been recognized for the last few years.^{1,2} Several reports have shown that changes in the number of nephrons and/or renal corpuscles that occur during renal development have consequences in adulthood, such as hypertension and kidney disease.^{3,4}

Vitamin D (Vit.D) is mostly known for its role in the regulation of calcium homeostasis and bone metabolism.⁵ However, recent studies have shown that Vit.D is also involved in the homeostasis of several other cellular processes, including inflammation, blood pressure control,^{6,7} cell proliferation and differentiation⁷ and renin gene regulation, which are all important events in kidney development.⁸ Song *et al.*⁹ demonstrated that the renin angiotensin system (RAS) contributes to increased proliferation and branched ureteric buds *in vivo* and stimulates renal vessel formation during kidney development.⁹ Pups from mothers subjected to a vitamin D₃ (Vit.D₃)-deficient diet during pregnancy and lactation exhibit changes in kidney development associated with alterations in the RAS.^{10,11} This study investigates the influence of Vit.D₃ deficiency on changes in kidney development in female rats, the morphological and functional consequences in adulthood and the mechanisms involved in this process.

Methods

Animals and experimental design

The experiments were performed in accordance with the ethical principles for animal experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and the Animal Experimentation Committee of the University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School approved the study protocol (COBEA/CETEA/FMRP-USP, protocol no. 190/2016).

Female Hannover rats 6-week-old ($n = 9$) were separated into two groups that received standard rat chow (SC) (made according to the AIN93G protocol, including 1000.0 IU/kg of Vit.D₃) or a vitamin D-deficient (Vit.D-) chow (made according to the same AIN93G protocol

© Cambridge University Press and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease 2019.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Anexo 4

nutrients

Article

Imbalance of Pro- and Anti-Angiogenic Factors Due to Maternal Vitamin D Deficiency Causes Renal Microvasculature Alterations Affecting the Adult Kidney Function

Lucas Ferreira de Almeida ^{1,*}, Heloísa Della Coletta Francescato ¹, José Antunes-Rodrigues ^{1,2}, Francisco José Albuquerque de Paula ^{2,3}, Cleonice Giovanni Alves da Silva ¹, Roberto Silva Costa ³ and Terézila Machado Coimbra ¹

¹ Department of Physiology of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

² Department of Internal Medicine of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

³ Department of Pathology of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

* Correspondence: lucas_fedamada@hotmail.com; Tel: +55-16-3315-3021; Fax: +55-16-3315-0221

Received: 28 July 2019; Accepted: 14 August 2019; Published: 16 August 2019

Abstract: Vitamin D (Vit D) is involved in cellular proliferation and differentiation and regulation of the renin gene, which are important aspects of nephrogenesis and quiescence of renal health in adulthood. This study evaluated the angiogenic mechanisms involved in long term renal disturbances induced by Vit D deficiency persistent in adulthood in rats. First-generation male Hannover offspring from mothers fed either a control diet (control group, CG) or Vit D-deficient diet (Vit D- group) were evaluated. Systolic blood pressure (SBP) was measured monthly during the first 6 months after birth, and blood and urine samples were collected to evaluate renal function. Nitric oxide (NO), angiotensin II (ANGII), parathyroid hormone (PTH), calcium, and Vit D were measured. The kidneys were then removed for morphometric, NO, immunohistochemical, and Western blot studies. We evaluated the expression of vascular growth factor (VEGF) and angiopoietins 1 and 2 and their receptors since this intrinsic renal axis is responsible for endothelial quiescence. Compared to CG, the Vit D- group presented higher SBP, ANG II plasma levels, renin expression, and AT1 receptor expression levels. Capillary rarefaction was observed, as well as an imbalance between pro- and anti-angiogenic factors. Collectively, the present findings support the role of Vit D for maintaining the integrity of renal microcirculation.

Keywords: angiogenesis; renin-angiotensin system; renal microcirculation; vitamin D deficiency

1. Introduction

Changes in the intrauterine environment provoked by pharmacologic or genetic deletion of components of the renin-angiotensin system (RAS), maternal dietary manipulation, and sleep restriction during development result in cardiovascular, renal, and metabolic disorders that persist into adulthood in the resulting offspring [1–4]. This predisposition towards adult disease is known as developmental origins of health and disease (DOHaD) or developmental programming [5,6].

The occurrence of vitamin D (Vit D) deficiency is increasing in Western societies and re-emerging as a public health issue [7,8]. Globally, approximately 1 billion people are estimated to have Vit D

Anexo 5

MINI REVIEW
published: 17 July 2019
doi: 10.3389/fped.2019.00296

When Less or More Isn't Enough: Renal Maldevelopment Arising From Disequilibrium in the Renin-Angiotensin System

Lucas Ferreira de Almeida* and Terezila Machado Coimbra

Department of Physiology, Fiterio Prato Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana Cristina Simões E. Silva,
Federal University of Minas
Gerais, Brazil

Reviewed by:

Rosely Paz Scott,
Northwestern University, United States
Vera Hermine Koch,
University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Lucas Ferreira de Almeida
lucas_fedemachado@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Pediatric Nephrology,
a section of the journal
Frontiers in Pediatrics

Received: 20 May 2019

Accepted: 04 July 2019

Published: 17 July 2019

Citation:

de Almeida LF and Coimbra TM
(2019) When Less or More Isn't
Enough: Renal Maldevelopment
Arising From Disequilibrium in the
Renin-Angiotensin System.
Front. Pediatr. 7:296.
doi: 10.3389/fped.2019.00296

Environmental and nutritional factors during fetal and neonatal life can have long-lasting effects on renal functions and physiology and susceptibility to kidney disease in adulthood. All components of the renin-angiotensin system (RAS) are highly expressed in the kidneys during the period of renal development. The RAS plays a central role in the regulation of various cellular growth factors and stimulates adhesion molecules and cellular migration. The use of antagonists of this system during fetal development represents a major risk factor for hypertension, renal vascular dysfunction, and kidney medulla atrophy in adulthood. The inappropriate activation of the RAS by vitamin D (VitD) deficiency has been studied in recent years. Clinical and experimental studies have demonstrated an inverse relationship between circulating VitD levels and blood pressure, plasma and renin activity, and an increase in angiotensin II and the receptor AT₁. These data raise new questions about the importance of the integrity of the RAS during development since RAS pathway inhibitors and VitD deficiency have opposing functions. This is a literature review on the possible mechanisms by which antagonists of the RAS and VitD deficiency during fetal development provoke disturbances in kidney structure and function. Potential mechanisms are presented and discussed, and the possible pathways by which an imbalanced maternal RAS may negatively impact fetal development and have consequences in adulthood are also explored.

Keywords: angiotensin II, fetal programming, kidney development, renin-angiotensin system, vitamin D deficiency

KIDNEY DEVELOPMENT: HUMANS AND RODENTS

Several histologic studies (1–6) provide the basis for our contemporary knowledge about human renal development. These works demonstrated the appearance of key anatomical features and provide a comparative histological view derived from cross-species studies of the kidneys in humans, cats, chicks, mice, and other mammals (1–6). These anatomical studies emphasized the conserved evolutionarily features of mammalian renal developmental as well as the differences between species. Some studies performed in rodents (mice and rats) have provided a mechanistic framework for mammalian renal development (7–9).

In humans, renal development is initiated at approximately 4 weeks of pregnancy and is completed late in gestation. Most (60–65%) nephrons are formed during the third trimester of pregnancy (10). After this period, no new nephrons are formed throughout the lifetime of the individual. Despite that Rodriguez et al. (11), have reported that the kidney continues to form

Anexo 6

Clinical Science (2020) 134 641–656
<https://doi.org/10.1042/CS20190765>

Review Article

Role of the renin–angiotensin system in kidney development and programming of adult blood pressure

Lucas F. Almeida^{1,2}, Signe S. Tofteng¹, Kirsten Madsen^{1,3} and Boye L. Jensen¹

¹Department of Cardiovascular and Renal Research, University of Southern Denmark, Odense, Denmark; ²Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ³Department of Pathology, Odense University Hospital, Odense, Denmark

Correspondence: Boye L. Jensen (bjensen@health.sdu.dk)

Adverse events during fetal life such as insufficient protein intake or elevated transfer of glucocorticoid to the fetus may impact cardiovascular and metabolic health later in adult life and are associated with increased incidence of type 2 diabetes, ischemic heart disease and hypertension. Several adverse factors converge and suppress the fetal renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS). The aim of this review is to summarize data on the significance of RAAS for kidney development and adult hypertension. Genetic inactivation of RAAS in rodents at any step from angiotensinogen to angiotensin II (ANGII) type 1 receptor (AT₁) receptors or pharmacologic inhibition leads to complex developmental injury to the kidneys that has also been observed in human case reports. Deletion of the 'protective' arm of RAAS, angiotensin converting enzyme (ACE) 2 (ACE-2) and G-protein coupled receptor for Angiotensin 1–7 (Mas) receptor does not reproduce the AT₁ phenotype. The changes comprise fewer glomeruli, thinner cortex, dilated tubules, thicker arterioles and arteries, lack of vascular bundles, papillary atrophy, shorter capillary length and volume in cortex and medulla. Altered activity of systemic and local regulators of fetal–perinatal RAAS such as vitamin D and cyclooxygenase (COX)/prostaglandins are associated with similar injuries. ANGII–AT₁ interaction drives podocyte and epithelial cell formation of vascular growth factors, notably vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins (Angpt), which support late stages of glomerular and cortical capillary growth and medullary vascular bundle formation and patterning. RAAS-induced injury is associated with lower glomerular filtration rate (GFR), lower renal plasma flow, kidney fibrosis, up-regulation of sodium transporters, impaired sodium excretion and salt-sensitive hypertension. The renal component and salt sensitivity of programmed hypertension may impact dietary counseling and choice of pharmacological intervention to treat hypertension.

Fetal 'programming' of adverse cardiovascular outcome in adults

The association between low birth weight ('light for date') and adult cardiovascular and metabolic diseases has been known and described across populations and ethnicities for decades [1–3]. The data point to a role for not only intrauterine but also infant growth impairment as an important factor determining disease in adult life of the offspring. Specifically, diabetes, hypertension and ischemic heart disease are predicted by growth impairment. Accumulated epidemiological data show an inverse relation between birth weight and blood pressure in adults first shown by Barker et al. [4]. The concept states that the adverse intrauterine environment will 'program' the adult organism to cope better with a hostile environment but at the expense of higher risk for cardiometabolic disease. Programming is understood as

Received: 10 December 2019
 Revised: 10 March 2020
 Accepted: 10 March 2020

Version of Record published:
 27 March 2020