UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

AMANDA LIMA DELUQUE

Efeito do calcitriol nas alterações da microvasculatura renal provocadas pelo bloqueio do receptor AT₁ durante o desenvolvimento em ratos: mecanismos envolvidos

Ribeirão Preto-SP

2019

AMANDA LIMA DELUQUE

Efeito do calcitriol nas alterações da microvasculatura renal provocadas pelo bloqueio do receptor AT₁ durante o desenvolvimento em ratos: mecanismos envolvidos

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof.^a Dra. Terezila Machado Coimbra

Ribeirão Preto-SP

2019

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.

Ficha Catalográfica

Deluque, Amanda Lima

Efeito do calcitriol nas alterações da microvasculatura renal provocadas pelo bloqueio do receptor AT_1 durante o desenvolvimento em ratos: mecanismos envolvidos. Ribeirão Preto, 2019.

81 p: il; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Coimbra, Terezila Machado.

1. Calcitriol. 2. Desenvolvimento renal. 3. Sistema renina-angiotensina. 4. Microvasculatura renal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DELUQUE, A. L. Efeito do calcitriol nas alterações da microvasculatura renal provocadas pelo bloqueio do receptor AT₁ durante o desenvolvimento em ratos: mecanismos envolvidos. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

A minha mãe e minha vó Fia, com amor e gratidão.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a minha mãe Sandra Lima, a mulher mais sensacional e batalhadora que conheço, meu primeiro amor. Agradeço por me mostrar que o mundo está lá fora para ser conquistado por nós. Agradeço pelos ensinamentos, pela educação e por todos os momentos em tua presença. Tu és meu porto seguro, minha base, minha estrutura. Obrigada pelo amor incondicional, por acreditar nesse sonho junto comigo. A toda a família, em especial a vó Fia, que não mede esforços e incentivos para que realize esse sonho, comemorando cada vitória conseguida. Admiro-te muito por ser essa mulher fantástica que és. Ao restante, obrigada pelo apoio.

Gratidão a minha orientadora Prof^a Dr^a Terezila Machado Coimbra, por toda as oportunidades, sabedoria e ensinamentos. Obrigada pela paciência, dedicação e empenho nessa jornada. Por todo incentivo e confiança dados para o meu crescimento acadêmico, científico e como ser humano. Admiro e respeito a mulher que és.

Ao amigo, Lucas Almeida, por todo carinho e amizade que foram construídas durante esses anos. Agradeço os ensinamentos e conversas científicas.

Ao laboratório de Fisiologia Renal e as minhas meninas Heloísa Francescato, Cleonice Giovanini, Beatriz Magalhães e Cláudia Souza que sempre estiveram disponíveis para auxiliar nos experimentos, sabendo as dificuldades da realização desse trabalho e pelo ombro amigo. Adoro trabalhar com vocês, tomar um cafezinho e dar risadas maravilhosas.

A Aline Zanatta, que muito mais que uma amiga, tornou-se uma irmã e companheira de bagunça. Obrigada pela sabedoria, por me mostrar que a vida é leve e intensa e sempre me dizer “vai dar tudo certo”. Eu nem sei mais como é não ter você na minha vida. Só fica!

A minha Karol Magalhães, por tudo, apenas. Obrigada pelo carinho, dedicação e amor. Agradeço-te pelo apoio e pela palavra certa sempre. Você é meu presente pra vida, sim!

A Thaís Costa, por compartilhar os momentos mais lindos e desesperadores comigo. Você é grande mulher!

A Flavia Resende e Ionara Lima, que embora distantes, nunca deixaram de apoiar uma a outra nessa jornada. Obrigada por me mostrarem o verdadeiro significado de uma amizade.

Aos amigos que fiz no departamento durante esses dois anos de mestrado, meu muito obrigada a vocês. Com certeza, vocês fizeram esse período muito mais leve e divertido. Obrigada pelos banhos de sol.

Aos mestres do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP que contribuíram com os ensinamentos e sabedoria. Sou grata a cada um de vocês em minha trajetória, obrigada pelo aprendizado.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia, pelo apoio.

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

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro fornecido durante a execução do trabalho.

*Se, a princípio, a ideia não é absurda,
então não há esperança para ela.*

Albert Einstein

RESUMO

DELUQUE, Amanda Lima. **Efeito do calcitriol nas alterações da microvasculatura renal provocadas pelo bloqueio do receptor AT₁ durante o desenvolvimento em ratos: mecanismos envolvidos.** 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Alterações da vasculatura renal que ocorrem durante a programação fetal, podem provocar distúrbios na estrutura e na função renal que repercutem na vida adulta. Diversos fatores estão envolvidos no processo de angiogênese, como fatores pró e anti-angiogênicos que são expressos na vida embrionária e também em condições patológicas como as angiopoetinas (Angpts)-1 e 2, receptor Tie-2 e óxido nítrico (NO). O calcitriol (vitamina D ativa) tem efeitos na diferenciação, proliferação, manutenção da célula endotelial, eventos importantes no desenvolvimento renal e na modulação do gene da renina. Ratos expostos a antagonistas do sistema renina-angiotensina (SRA) durante a lactação desenvolvem alterações renais, evidenciando sua participação no desenvolvimento dos rins de mamíferos. Este estudo visa avaliar o efeito do calcitriol nas alterações da angiogênese renal provocadas pela exposição ao losartan (antagonista do receptor tipo 1 de angiotensina II [ANGII], AT₁) em ratos no período de lactação e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo. Ratos *Wistar* machos foram divididos em quatro grupos: 1- SAC, filhotes de mães que receberam sacarose 2% durante os 21 dias de lactação; 2- SAC+Calcitriol, filhotes de mães que receberam sacarose 2% durante os 21 dias e após a lactação receberam calcitriol (6 ng/dia) administrado através de mini-bomba osmótica por 4 semanas; 3- LOS, filhotes de mães que receberam losartan (100 mg/kg/dia) durante os 21 dias de lactação; 4- LOS+Calcitriol, filhotes de mães que receberam losartan (100 mg/kg/dia) durante os 21 dias e após a lactação receberam calcitriol (6 ng/dia) administrado através de mini-bomba osmótica por 4 semanas. Os animais dos diferentes grupos foram acompanhados por 60 dias. No 59º dia, a pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada e os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta da urina de 24 horas. No dia seguinte, amostras de sangue foram coletadas para a avaliação da função renal e os rins retirados para realização de estudos histológicos, imunoistoquímicos e de *Western blot*. Os animais do grupo LOS apresentaram aumento da PAS, dos níveis plasmáticos de creatinina, da excreção fracional de sódio (FE_{Na}⁺) e de albuminúria e redução da osmolalidade urinária comparados aos grupos controles. Essas alterações foram menos intensas no grupo LOS+Calcitriol que apresentou aumento dos níveis teciduais de NO. Foram observadas alterações da estrutura renal como, hidronefrose, atrofia papilar e distúrbios da formação dos vasos retos. Os estudos de imunoistoquímica evidenciaram aumento da expressão de marcadores de células mesenquimais (α -SMA e vimentina) e de macrófagos (ED-1) e redução da marcação de células endoteliais (JG12), óxido nítrico endotelial (eNOS) e sinaptopodina (marcador de barreira glomerular). O tratamento com calcitriol atenuou essas alterações induzidas pelo losartan. A expressão de AT₁ foi maior do grupo LOS em comparação com o grupo controle. As expressões de Angpt-1 e Angpt-2 não foram diferentes, contudo, a expressão do receptor Tie-2 estava diminuída no grupo LOS+Calcitriol em comparação ao grupo controle. Os resultados mostram que os animais expostos ao bloqueio do AT₁ no período de lactação apresentaram distúrbios na microvasculatura renal na vida adulta que foram atenuadas pelo tratamento com calcitriol.

Palavras-chave: Calcitriol. Desenvolvimento renal. Sistema renina-angiotensina. Microvasculatura renal.

ABSTRACT

DELUQUE, Amanda Lima. **Effect of calcitriol on disturbances in renal microvasculature in rats caused by AT₁ blockade during development: involved mechanisms**. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Alterations of the renal vasculature that occur during fetal programming can cause disturbances in renal structure and function that affect adulthood. Several factors are involved in the process of angiogenesis, such as pro and anti-angiogenic factors that are transiently expressed in embryonic life and in pathological conditions such as angiopoietins (Angpts) -1 and 2, Tie-2 receptor and nitric oxide (NO). Calcitriol (active vitamin D) has effects on differentiation, proliferation, endothelial cell maintenance, important events in renal development and on the modulation of the renin gene. Rats exposed to renin-angiotensin system antagonists (RAS) during lactation develop renal disorders, evidencing that RAS plays an important role in the development of mammalian kidneys. This study aims to evaluate the effect of calcitriol administration on changes in renal angiogenesis induced by exposure to losartan (angiotensin II receptor antagonist [ANGII], AT₁) in rats during lactation and the cellular and molecular mechanisms involved in this process. Male Wistar rats were divided into four groups: 1 - SUC, pups of mothers who received sucrose 2% during the 21 days of lactation; 2 - SUC+Calcitriol, pups of mothers who received sucrose 2% during the 21 days and after lactation received calcitriol (6 ng/day) administered via mini pumps osmotic for 4 weeks; 3 - LOS, pups of mothers who received losartan (100 mg/kg/day) during the 21 days of lactation; 4 - LOS+Calcitriol, pups of mothers who received losartan (100 mg/kg/day) during the 21 days and after lactation received calcitriol (6 ng/day) administered via mini pumps osmotic for 4 weeks. The animals of the different groups were followed for 60 days. On the 59th day, systolic blood pressure (SBP) was evaluated and the animals were placed in metabolic cages for 24-hour urine collection. The following day, blood samples were collected for the evaluation of kidney function and the kidneys removed for histological, immunohistochemical and *Western blot* studies. The animals in the LOS group presented increased SBP, serum creatinine, fractional sodium excretion (FE_{Na}⁺) and albuminuria levels, as well as tissue levels of NO and reduction of urinary osmolality compared to control groups. These changes were less intense in the LOS+Calcitriol group. Alterations of the renal structure such as, hydronephrosis, papillary atrophy and disorders of vessel formation were also observed. Immunohistochemistry studies showed increased expression of mesenchymal (α -SMA and vimentin) and macrophages (ED-1) markers and reduction of endothelial cell (JG12), endothelial nitric oxide (eNOS) and synaptopodin (marker of glomerular barrier). These changes were less intense in the LOS+Calcitriol group. AT₁ expression was also higher in the LOS group compared to the control group and this increase was attenuated with calcitriol treatment. Expressions of Angpt-1 and Angpt-2 in the renal tissue were not different, however the Tie-2 receptor expression was decreased in the LOS+Calcitriol group compared to the other groups. The results show that animals exposed to AT₁ blockade in lactation period presented disorders in renal microvasculature in adulthood that were attenuated by treatment with calcitriol.

Key words: Calcitriol. Kidney development. Renin-angiotensin system. Renal microvasculature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental	34
Figura 2. Pressão arterial sistólica (mmHg) aos 59 dias de idade nos animais dos grupos controles e experimentais.	41
Figura 3. Creatinina plasmática nos animais dos grupos controles e experimentais.....	43
Figura 4. Excreção urinária de albumina da prole nos animais dos grupos controles e experimentais.....	44
Figura 5. Oxido nítrico no tecido renal corrigido pela proteína nos animais dos grupos controles e experimentais.	44
Figura 6. Cortes histológicas corados com Tricrômio de Masson representativos nos animais dos grupos controles e experimentais.....	45
Figura 7. Expressão de α -SMA nos animais dos diferentes grupos na medula externa.....	46
Figura 8. Expressão de α -SMA nos animais dos diferentes grupos na medula interna	47
Figura 9. Expressão de vimentina nos animais dos diferentes grupos na medula externa.....	48
Figura 10. Expressão de vimentina nos animais dos diferentes grupos na medula interna....	49
Figura 11. Expressão de ED-1 nos animais dos diferentes grupos na medula externa	50
Figura 12. Expressão de ED-1 nos animais dos diferentes grupos na medula interna.....	51
Figura 13. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos medula externa	52
Figura 14. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos medula interna.....	53
Figura 15. Expressão de eNOS no tecido renal nos animais dos diferentes grupos.....	54
Figura 16. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos no córtex renal.....	55
Figura 17. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos glomérulos renais	56
Figura 18. Expressão de sinaptopodina nos animais dos diferentes grupos nos glomérulos renais.....	57
Figura 19. Expressão de AT ₁ avaliada por <i>Western blot</i> no tecido renal nos animais dos diferentes grupos.	58
Figura 20: Expressão de Angpt-1 avaliada por <i>Western blot</i> no tecido renal nos animais dos diferentes grupos	59
Figura 21. Expressão de Angpt-2 avaliada por <i>Western blot</i> no tecido renal nos animais dos diferentes grupos	59
Figura 22. Relação densitométrica para Angpt-1/Angpt-2 no tecido renal nos animais dos diferentes grupos avaliada por <i>Western blot</i>	60

Figura 23. Expressão de Tie-2 avaliada por <i>Western blot</i> no tecido renal nos animais dos diferentes grupos	60
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Consumo hídrico e volume urinário (mL) nos animais dos grupos controles e experimentais aos 60 dias de idade.....	42
Tabela 2- Osmolalidade urinária (Uosm) e fração de excreção de sódio (FE_{Na^+}) nos animais dos grupos controles e experimentais aos 60 dias de idade.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$1,25(OH)_2D_3$	Calcitriol
25(OH)D	Calcidiol
AKT	Proteína quinase B (PKB)
ANGII	Angiotensina II
Angpt-1	Angiopietina-1
Angpt-2	Angiopietina-2
Angpt-4	Angiopietina-4
Angpts	Angiopietinas
AT ₁	Receptor para angiotensina II tipo 1
AT ₂	Receptor para angiotensina II tipo 2
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BU	Broto ureteral
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB	<i>cAMP responsive elemento binding protein</i>
D2	Ergocalciferol
D3	Colecalciferol
DAB	3,3-diaminobenzidina
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
eNOS	Óxido nítrico endotelial sintase
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos das Américas
FE _{Na} ⁺	Excreção fracional de sódio
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
JG12	Anti-aminopeptidase P

MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MM	Mesênquima metanéfrico
NF- κ B	<i>Nuclear fator- kappa B</i>
NO	Óxido nítrico
OCT	22-oxa-calcitriol
P1	Dia pós-natal 1
P7	Dia pós-natal 7
P14	Dia pós-natal 14
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	<i>Phosphate buffered saline (NaCl 0,15 M e tampão PO₄, pH=7,4</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBSt	<i>Tris Buffered Saline with Tween [trizma base (0,05 M), NaCl (0,15 M), tween 20 (pH 7,6)]</i>
TEM	Transição epitélio mesenquimal
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
Tie-1	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>
Tie-2	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Uosm	Osmolalidade urinária
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VDBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VDRE	<i>Vitamin D response element</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
Vit. D	Vitamina D
α -SMA	<i>α-Smooth muscle actin</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
dL	Decilitro
g	Força centrífuga
h	Horas
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
kDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm ²	Milimêtro quadrado
mmol	Milimol
mOsm	Miliosmol
n	número amostral
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₄	Fosfato
rpm	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1. Desenvolvimento Renal, Sistema Renina-Angiotensina e Angiogênese.....	20
1.2. Fatores pró e anti-angiogênicos	21
1.3. Efeitos da vitamina D na proliferação e diferenciação celular	24
2. Objetivos	28
2.1. Objetivos Gerais	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. Hipótese.....	30
4. Material e Métodos.....	32
4.1. Animais.....	32
4.2. Delineamento experimental	32
4.3. Avaliação do volume urinário.....	34
4.4. Pressão Arterial Sistólica (PAS).....	34
4.5. Avaliação da função renal.....	35
4.6. Excreção urinária de albumina.....	35
4.7. Dosagem de NO no tecido renal	35
4.8. Estudo histológico.....	36
4.9. Análise imunoistoquímica	36
4.10. Análise por <i>Western blot</i>	38
5. Análise Estatística	39
6. Resultados	41
6.1. Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS).....	41
6.2. Avaliação da função renal.....	41
6.3. Excreção urinária de albumina.....	43
6.4. NO no tecido renal	44
6.5. Estudo histológico.....	45

6.6.	Análise imunoistoquímica	46
6.7.	Análise de <i>Western blot</i>	58
7.	Discussão.....	62
8.	Conclusão.....	70
9.	Referências.....	72
10.	Anexo	81

Introdução

1. Introdução

1.1. Desenvolvimento Renal, Sistema Renina-Angiotensina e Angiogênese

O desenvolvimento renal é um processo em que ocorre interação de tecidos embrionários epiteliais e mesenquimais, com células estromais, vasculares e epiteliais altamente especializadas, o que irá resultar no rim permanente pela interação epitélio-mesenquimal, com polarização de células epiteliais, endoteliais e morfogênese (DRESSLER, 2006). Em humanos, a nefrogênese inicia na 5ª semana de gestação e se completa *in utero* entre as 34ª-35ª semanas (LOPEZ; GOMEZ, 2011; FAA et al., 2012). Em roedores (ratos e camundongos), estruturas importantes do rim se desenvolvem durante o período de lactação (dia pós-natal P1-P14). O desenvolvimento renal prossegue na região subcapsular do dia 7 pós-natal (P7) ao 8 e continua através do crescimento e da maturação funcional da medula renal (MADSEN et al., 2010). As células da alça de Henle prolifera por atividade mitótica, na medula renal, com pico em torno do P14, e atinge sua maturação funcional e estrutural na quarta semana (CHA et al., 2001; CHEN; LASAITIENE; FRIBERG, 2004; MADSEN et al., 2010, LOPEZ; GOMEZ, 2011).

A maturação final dos rins envolve duas estruturas embrionárias: o broto ureteral (BU) e o mesênquima metanéfrico (MM). A interação do BU epitelial e o MM, induz a formação do epitélio capsular, glomerular e tubular. As células mesenquimais migram e se condensam ao redor de cada ponta ureteral sofrendo uma espécie de interação mesenquimal-epitelial. Quando estes se ramificam, o condensado de células se desenvolve em uma vesícula, seguida de um formato em vírgula e então adquirem formato de “S”, essas estruturas irão originar os glomérulos e túbulos renais (LOPEZ; GOMEZ, 2011). Assim, essa interação recíproca e a proliferação celular, permitem o alongamento de segmentos de nefros corticais e o aparecimento das alças de Henle. O MM induz a ramificação do BU levando a formação do sistema de ductos coletores, possibilitando a maior extensão do eixo córtico-medular (MADSEN et al., 2013).

Muitos fatores podem influenciar o completo e eficaz desenvolvimento renal e estão relacionados com o conceito de programação fetal, estabelecido por Barker nos anos 80, o qual refere-se a insultos que realizados durante a fase de desenvolvimento podem repercutir na vida adulta (CALKINS; DEVASKAR, 2011). Esses distúrbios podem estar associados com deficiências nutricionais (BARKER, 2004; ZHANG, et al., 2013), exposição a glicocorticoides (LONG et al., 2012; SUN et al., 2016) ou alterações no sistema renina-angiotensina (SRA)

(MADSEN et al., 2013; VACCARI et al., 2015; FAENSEN et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017) que irão desencadear doenças coronarianas, hipertensão, obesidade, resistência à insulina, dentre outras doenças crônicas, inclusive a doença renal.

O SRA tem uma participação importante no desenvolvimento, diferenciação e formação da estrutura renal, (MADSEN et al., 2010; LUMBERS et al., 2013) além de participar no balanço de fatores pró e anti-angiogênicos durante a vasculogênese e a angiogênese (YOO et al., 2018). O desenvolvimento renal é afetado de diversas formas, como alterações da regulação da expressão de seus componentes (LUMBERS et al., 2013), o que implica em modificações na expressão de fatores de crescimento e interações celulares importantes nesse processo (CHEN; LASAITIENE; FRIBERG, 2004). Os receptores do tipo 1 (AT₁) e 2 (AT₂) para angiotensina II (ANGII) são expressos de forma diferenciada durante o desenvolvimento renal. Sabe-se que o receptor AT₁, estimula o crescimento celular, enquanto o AT₂, inibe a organogênese, estimulando a apoptose (YAMADA; HORIUCHI; DZAU, 1996; WOLF, 2002).

Alterações no ambiente intrauterino provocadas por distúrbios do SRA induzidos por antagonista do AT₁ ou inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) durante esse período crítico da maturação renal, gera redução do peso dos rins, do número de nefros e de células tubulares (FAENSEN et al., 2016), glomérulos hipertrofiados, redução na habilidade de concentração urinária, ou seja, anormalidades na estrutura e função renal (BALBI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2017). Esses distúrbios estão associados com a redução do comprimento, volume e área de microvasos pós-glomerulares renais. Os fatores de crescimento vasculares como as angiopoietinas (Angpts) estarão desregulados, interferindo no processo de proliferação celular e maturação das células endoteliais, eventos importantes no período pós-natal em ratos (MADSEN et al., 2010). O bloqueio do AT₁ desencadeia desorganização e redução da espessura da parede dos vasos retos da medula externa (MCCAUSLAND et al., 1997). A interação ANGII-AT₁ tem uma participação importante na vascularização e crescimento arteriolar, promovendo a regulação de fatores angiogênicos (TUFRO-MCREDDIE et al., 1995) e sua ausência causa lesão da microvasculatura e do parênquima renal com rarefação dos capilares glomerulares e peritubulares (YOO et al., 2018).

1.2. Fatores pró e anti-angiogênicos

A vasculatura é composta por células endoteliais e células de suporte. Durante o desenvolvimento, os vasos sanguíneos são os primeiros a se formarem em um processo chamado vasculogênese, dependente da diferenciação de células progenitoras endoteliais e sua

organização pelo recrutamento de células mesenquimais que se diferenciam levando a um *burst* de ramificação e alongamento de novos vasos renais e esse padrão se repete continuamente, resultando em um aumento da complexidade do arranjo morfológico e da área de superfície vascular. Esse processo difere da angiogênese, a qual ocorre a partir de vasos pré-existentes envolvendo migração e proliferação, principalmente de células endoteliais diferenciadas (LOPEZ; GOMEZ, 2011; IRUELA-ARISPE; ZOVEIN, 2017). A manutenção da microvasculatura é de extrema importância para a nutrição tecidual. A integridade do endotélio é necessária para que haja o completo balanço entre os fatores que possam interferir com a manutenção do tecido renal.

O endotélio é um órgão ativo que recebe e fornece sinais, armazena substâncias e regula a passagem de eletrólitos, proteínas e elementos celulares (VAN MEURS et al., 2009). As células endoteliais exercem funções importantes no sistema de formação e reparo de vasos sanguíneos, sendo fundamental na embriogênese e organogênese, onde ocorrem uma série de eventos que são marcados por desestabilização, proliferação, migração e maturação (BOUIS et al., 2006). No organismo adulto, o endotélio participa da homeostasia e responde a qualquer perturbação, por exemplo a inflamação, sendo capaz de modificar seu fenótipo dependentes do tempo e do tecido localizado (AIRD, 2007).

Vários fatores modulam a proliferação e migração de células endoteliais no processo de angiogênese (KANG et al., 2002). O desenvolvimento e a manutenção da estabilidade vascular dependem de uma fina sinalização das Angpts e seu receptor Tie (*tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains*) fatores envolvidos na quiescência da vasculatura em situações fisiológicas. Essa via de sinalização Angpt/Tie é composta por 4 ligantes (Angpt-1 a Angpt-4) e 2 receptores (Tie-1 e Tie-2), sendo que o receptor do tipo 2 é o mais estudado. As Angpt-1 e Angpt-2 são mais estudadas e suas funções são conhecidas em diversos modelos patológicos como síndrome nefrótica e glomerulonefrite (DAVIS, et al., 2007; CÂMPEAN et al., 2008), síndrome coronariana aguda (LEE; LIP; BLANN, 2004; NADAR et al., 2005; KORFF et al., 2012) e síndromes respiratórias (MCCARTER et al., 2007; SIMOES et al., 2008; CHOI et al., 2013) que envolvem alterações das células endoteliais como principal mecanismos desencadeador de doença.

O receptor Tie está envolvido no remodelamento e desenvolvimento vascular através de uma série de eventos celulares que começam pela ligação das Angpts ao receptor endotelial. Os dois tipos de receptores Tie-1 e Tie-2 com peso moleculares de 135 e 150 kDa, respectivamente, são semelhantes na parte intracelular ou citoplasmática, embora o Tie-1 seja incapaz de se ligar as Angpt ou de fosforilar (DAVIS, et al., 1996; GERLICZ et al., 2014; SINGH, et al., 2011). A

ligação da Angpt-1, produzida por constituintes do tecido muscular liso (pericitos), ao domínio extracelular do Tie-2 resulta em dimerização do receptor, permitindo sua autofosforilação e assim ativando sua propriedade quinase. Essa interação possibilita a ativação da principal via de sobrevivência celular PI3K (*Phosphoinositide-3-kinase*)/Akt [(proteína quinase B (PKB)], MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), estimulação da síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS), ao mesmo tempo que inibe as vias inflamatórias como a do NF- κ B (*Nuclear fator-kappa B*), ou expressão de moléculas de adesão endotelial (ICAM-1 - *Intracellular adhesion molecule-1*; VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule-1* e E-selectina) e recrutamento de leucócitos (JOUSSEN et al., 2002; VAN MEURS et al., 2009; SINGH, et al., 2011).

A Angpt-1 atua tipicamente como um fator angiogênico, estimulando a proliferação e maturação de células endoteliais nos processos de vasculogênese e angiogênese (DAVIS, et al., 1996). Em modelo experimental de nefrectomia à 5/6, a expressão de Angpt-1 está aumentada no início da lesão (YANG; LIU, 2009). Em células tubulares renais o aumento da sua expressão atenua a ativação de miofibroblastos, acúmulo de matriz e crescimento de capilares peritubulares em modelo de obstrução ureteral unilateral (SINGH, S et al., 2016). A ausência de Angpt-1 resulta em rarefação capilar peritubular (LOGANATHAN et al., 2018). Por outro lado, a Angpt-2, está envolvida na remodelação pós-natal (JONES, 2003). Esta é estocada nos corpúsculos de Weibel-Palade em células endoteliais e liberada de forma autócrina e parácrina de acordo com o estímulo inflamatório recebido. Geralmente, atua de forma antagônica a Angpt-1, interrompendo a sinalização de Tie-2 e sensibilizando o endotélio aos mediadores inflamatórios [(como, TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*)] e induzindo a angiogênese. Além disso, desestabiliza as junções celulares facilitando a quimiotaxia de células do sistema imune (VAN MEURS et al., 2009). A Angpt-2 tem ação na regulação da plasticidade do vaso contribuindo para que haja o crescimento de um novo endotélio regulada positivamente pelo VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e TGF- β 1 (*Transforming growth factor beta 1*). A sua expressão está aumentada em modelos experimentais de nefropatia diabética, glomerulonefrite e na lesão glomerular que resulta em proteinúria e também está associado com a apoptose do endotélio glomerular (JONES, 2003; DAVIS, et al., 2007).

A ANGII está envolvida em vias de diferenciação celular e proliferação de vasos que dependem da interação recíproca desses fatores de crescimentos vasculares, que permitem a expansão dos feixes dos vasos retos e de microvasos medulares, o que garante o suprimento de oxigênio adequado para túbulos e interstício (TINNING et al., 2016).

1.3. Efeitos da vitamina D na proliferação e diferenciação celular

A vitamina D (Vit. D) tem efeitos biológicos em todos os sistemas do corpo humano e sua deficiência está ligada a doenças imunes e cardiovasculares que incluem alterações no endotélio e no músculo liso vascular (RAVANI et al., 2009). A Vit. D é um pré-hormônio que está presente na dieta, porém sua principal fonte é pela exposição solar (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). Possui um efeito imunomodulador além de atuar na regulação da proliferação e diferenciação de vários tipos celulares (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; DE BRAGANÇA et al., 2015). Atualmente tem sido constatado uma pandemia de deficiência de Vit. D, com maior prevalência em gestantes, crianças, obesos, negros e idosos (HOLICK, 2017; MANIOS et al., 2017; KISA et al., 2018). Os níveis séricos de calcidiol [25(OH)D] mensurados na clínica, definem a deficiência em dois parâmetros: insuficientes para a faixa de 21 a 29 ng/ml (525–725 nmol/litro) e deficientes para níveis < 20 ng/ml (50 nmol/litro) (HOLICK et al., 2011). Mais de 200 genes, ou seja, 3% do genoma humano apresenta um elemento responsivo para a Vit. D (VDRE) (RAMAGOPALAN et al., 2010; PIKE et al., 2016) que irão influenciar em etapas do ciclo celular, proliferação celular e apoptose (HAMZAWY et al., 2017).

A Vit. D necessita de metabolização prévia para se tornar ativa. Duas formas da Vit. D, o ergocalciferol (D2) e o colecalciferol (D3) são metabolizadas de forma semelhante a partir de seus precursores o ergosterol (plantas) e o 7-deidrocolesterol (animais). O 7-deidrocolesterol é sintetizado no fígado e encontra-se presente na pele e durante a exposição à luz ultravioleta (entre 290 a 313 nm) provenientes do sol (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). Ambos são transportados no plasma pela VDBP (*Vitamin D binding protein*), uma globulina glicosilada que transporta esses metabólitos na circulação e hidroxilados no fígado na posição 25 [25-hidroxicolecalciferol; 25(OH)D₃; *calcidiol*] pela enzima 25-hidroxilase e nos túbulos proximais dos rins pela enzima 1- α -hidroxilase na posição 1, dando origem a 1,25-di-hidroxicolecalciferol [1,25(OH)₂D₃; *calcitriol*] a forma ativa da Vit. D (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

Os receptores (VDR- *Vitamin D receptor*) estão presentes em quase todos os núcleos celulares podendo ser encontrado em diversos tecidos como nos intestinos, ossos, próstata, mamas, cólon, pulmão, glândulas endócrinas, pele, músculo, útero, placenta, células do sistema imune e tumorais (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005) evidenciando a importância da Vit. D com propriedades autócrina e parácrina (PANICHI et al., 2001; DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; AL-BADR; MARTIN, 2008).

Os rins têm uma importante participação na ativação da Vit. D. Os receptores renais que mediam a reabsorção da Vit. D são a megalina e cubulina, presentes na borda em escova da membrana apical dos túbulos proximais, que reconhecem o complexo Vit. D-VDBP (NYKJAER et al., 1999, 2001). A deficiência de calcitriol pode ocorrer na presença de aumento da filtração de albumina devido ao fato dessa proteína competir com a VDBP nesses receptores, o que reduz a sua reabsorção e ativação renal e a sua concentração no plasma. Vários estudos mostram que análogos da Vit. D apresentam efeitos protetores na doença renal progressiva devido as suas propriedades anti-inflamatória, anti-proliferativa e imunomoduladora. Makibayashi et al. (2001) mostraram em modelos de glomerulonefrite, em ratos, que o 22-oxa-calcitriol (OCT) é capaz de inibir a proliferação de células mesangiais, acúmulo de matriz extracelular e o aumento da expressão de colágenos tipo I e IV e α -SMA (*α -Smooth muscle actin*) (um marcador de transdiferenciação celular) nas células renais. Schwarz et al. (1998) observaram que a Vit. D reduz a albuminúria e glomeruloesclerose em ratos com nefrectomia subtotal. Estudos realizados por Panichi et al. (2001) mostraram que o calcitriol previne também a infiltração de células do sistema imune, a apoptose e a hiper celularidade glomerular no modelo de glomerulonefrite anti-Thy-1 em ratos.

A ação pleiotrópica da Vit. D vem sendo estudada nos últimos anos, através da ação do seu receptor VDR. Dentre essas ações anti-inflamatória, redução da proteinúria e manutenção da função endotelial, a supressão do SRA tem sido bastante estudada devido à sua modulação negativa do gene da renina, atuando sobre a transcrição de CREB (*cAMP response element-binding protein*) comprovando, portanto, a sua importante participação não somente no metabolismo ósseo, mas também para o controle de pressão arterial e em outros eventos patológicos e fisiológicos (LI et al., 2002, 2004; WANG, 2016; HU et al., 2018). Boyce et al. (2013) demonstraram que os filhos de mães deficientes em Vit. D apresentaram distúrbios no crescimento e função renal. O aumento da expressão de renina no rim observado nesses fetos evidencia a importância desse hormônio durante a fase de desenvolvimento renal que pode ser mantida na vida adulta com o aparecimento de hipertensão arterial (ANDERSEN et al., 2015).

Remuzzi et al. (2016) observaram que o uso do antagonista de ANGII pode regredir alterações estruturais e funcionais causadas pelo envelhecimento. A rarefação vascular causada pela inibição do SRA (durante o desenvolvimento), e suas consequências durante a vida adulta implica em uma série de mecanismos que envolvem inflamação, fibrose e proliferação de células endoteliais que resultarão em angiogênese e remodelamento vascular. O calcitriol pode reduzir alterações da microvasculatura renal, causadas por distúrbios dos fatores que modulam o crescimento e diferenciação das células endoteliais vasculares que ocorrem nos animais

tratados com o bloqueador do SRA durante o período de desenvolvimento. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que o tratamento com o calcitriol introduzido após o término da lactação reduziu as alterações da pressão arterial, da estrutura e função renal, diferenciação celular e inflamação induzidas pela exposição ao losartan durante a lactação (ALMEIDA et al., 2017). O presente estudo visa avaliar a participação do calcitriol nos distúrbios da microvasculatura renal na vida adulta induzidos pelo bloqueio do receptor AT_1 durante a fase de desenvolvimento renal e os mecanismos envolvidos nesse processo.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol (1,25-di-hidroxicolecalciferol; *Vit. D ativa*) nas alterações da vasculogênese e angiogênese provocadas pelo bloqueio do receptor AT₁ em ratos no período de desenvolvimento renal e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo.

2.2. Objetivos Específicos

-Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol nas alterações de estrutura das células endoteliais da microcirculação renal em filhotes de mães expostas ao bloqueio do AT₁ durante o desenvolvimento renal.

-Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol nas alterações de fatores pró e anti-angiogênicos em filhotes de mães expostas ao bloqueio do AT₁ durante o desenvolvimento renal.

Hipótese

3. Hipótese

Vários estudos têm mostrado que animais expostos a antagonistas do SRA no período de desenvolvimento, apresentam alterações no desenvolvimento renal que persistem na vida adulta. O bloqueio do SRA pode causar alterações de fatores pró e anti-angiogênicos que contribuem para a manutenção da microvasculatura, formação de novos vasos e desenvolvimento glomerular e tubular. O calcitriol tem efeitos importantes em diversos tecidos-alvos e participa da diferenciação, proliferação celular e na regulação do SRA, eventos importantes no desenvolvimento renal. O tratamento com o calcitriol pode, portanto, reduzir pelo, menos em parte, as alterações da microvasculatura renal induzidas pela exposição ao losartan durante a lactação, contribuindo dessa forma para a atenuação das alterações de estrutura e função renal nesses animais que repercutem na vida adulta. A administração de Vit. D ativa poderá contribuir para redução dos distúrbios dos fatores angiogênicos e da microvasculatura renal nesses animais induzidas pelo losartan.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Ratos *Wistar*, de 250-280 gramas (n=4) e ratas de 180-200 gramas (n=12), provenientes do Biotério Central do campus da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto foram acasalados e seus filhotes machos (n=30) separados após a lactação para esse estudo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP em ambiente com temperatura e ciclo de luz controlados (22°C; 12 h claro/12 h escuro). Esses animais receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos quatro animais por caixa.

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 aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) FMRP-USP, sob protocolo de número 178/2014 (**Anexo A**).

4.2. Delineamento experimental

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia por uma semana para adaptação e em seguida, o período estral de cada fêmea foi acompanhado por esfregaço vaginal. Aquelas que apresentavam o ciclo fisiológico com quatro fases bem marcadas e que estivessem na fase fértil de reprodução eram separadas para o acasalamento em sistema de haren (três fêmeas para cada macho), sendo a prenhez comprovada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal realizado no dia seguinte (MARCONDES, BIANCHI; TANNO, 2002). As ratas que ficaram prenhes foram separadas e acompanhadas por todo período de gestação e lactação dos filhotes, ambas de 21 dias. A ninhada foi acomodada em caixas, em no máximo 6 animais, sendo de preferência filhotes machos.

O Losartan (All Chemistry, Brasil), 100 mg/kg/dia, um bloqueador do receptor AT₁ para ANGII, foi administrado em substituição à água de beber durante a lactação. As ratas controles receberam sacarose 2% pela mesma via. A dose de losartan foi baseada em estudos de Spence et al. (1996) e de estudos realizados em nosso laboratório anteriormente (BALBI et al., 2008 e MARIN et al., 2014). Estudos mostram que filhotes de ratas que recebem o losartan na dose de 100 ml/kg/dia apresentam alterações da estrutura e função renal. Estas alterações são devido ao

fato de que o losartan atravessa a barreira mamária sendo detectado no leite materno (SPENCE et al., 1996).

O calcitriol (6 ng/dia, Calcijex, Abbott Laboratories, EUA) e o veículo (solução de NaCl 0,9%) foram administrados através de mini-bomba osmótica (Model 2004, Alzet, EUA) implantados no dorso do animal via subcutânea sob anestesia com Isoflurano (Cristália, Brasil). A via de administração e a dose do calcitriol foram baseados em estudos de Panichi et al. (2001); Kuhlmann et al. (2004), Almeida et al. (2017) e Reis et al. (2019).

Durante a lactação, os filhotes foram divididos de acordo com o tratamento materno: (1) filhotes de mães que foram tratadas com solução de sacarose a 2% e (2) filhotes de mães tratadas com losartan (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2 % e protegido da luz (fotossensível). Nos dois grupos as mães receberam as soluções em substituição à água de beber durante 21 dias, correspondentes a lactação e em seguida, separados de suas mães. Após um período de adaptação de quatro dias, foram subdivididos em quatro grupos experimentais:

- **SAC** (n=7): filhotes de mães que receberam sacarose 2% em substituição à água de beber durante os 21 dias de lactação e mini-bomba osmótica com o veículo (NaCl) por 4 semanas, após lactação;
- **SAC+Calcitriol** (n=7): filhotes de mães que receberam sacarose 2% em substituição à água de beber durante os 21 dias de lactação e mini-bomba osmótica com calcitriol (6 ng/dia) por 4 semanas, após lactação;
- **LOS** (n=8): filhotes de mães que receberam losartan (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2% em substituição à água de beber durante os 21 dias de lactação e mini-bomba osmótica com o veículo (NaCl) por 4 semanas, após lactação;
- **LOS+Calcitriol** (n=8): filhotes de mães que receberam losartan (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2% em substituição à água de beber durante os 21 dias de lactação e mini-bomba osmótica com o calcitriol (6 ng/dia) por 4 semanas, após lactação.

Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental

Após 8 semanas de observação, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta de amostras de urina de 24 h e no 60º dia de experimento foram anestesiados com tiopental sódico (0,1ml/100gramas, Cristália, Brasil) e a artéria abdominal canulada para a coleta de sangue. Um dos rins foi retirado e fixado em Methacarn (metanol à 60%, clorofórmio à 30% e ácido acético à 10%) que após 24 horas foi substituído por álcool 70% e utilizadas para estudo histológico e imunoistoquímico e o outro foi perfundido com PBS [*Phosphate buffered saline* (NaCl 0,15 M e tampão PO_4 , pH=7,4)], sendo utilizado para os estudos de *Western blot* e quantificação de óxido nítrico (NO) tecidual.

4.3. Avaliação do volume urinário

Foram avaliados o consumo hídrico e volume urinário, utilizando gaiolas metabólicas no período de 24 horas aos 60 dias de idade nos animais dos diferentes grupos experimentais.

4.4. Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A PAS foi determinada nos animais com 59 dias de idade de maneira indireta por pletismografia de cauda (CODA Non-Invasive Blood Pressure System, Kent Scientific Corporation, EUA, 2010). Os animais foram previamente adaptados no aparelho nos 3 dias que antecederam a avaliação. Para a análise da PAS, os animais tiveram a cauda previamente aquecida pelo próprio aparelho e em seguida mensuradas a PAS utilizando um manguito

colocados diretamente na causa desses animais. Sucessivas determinações foram feitas e calculado a média para cada animal (ALVAREZ et al., 2002).

4.5. Avaliação da função renal

As amostras de urina 24h foram utilizadas para as dosagens de osmolalidade urinária (Uosm) determinada em osmômetro (*Advanced Osmometer Modelo 3250, EUA*) pelo método do abaixamento do ponto de congelação e as concentrações de sódio nas amostras de sangue e urina foram analisadas pela técnica de quantificação por eletrodos de íons seletivos (9180 Analisador de Eletrólitos, Roche, Áustria) e determinado a fração de excreção de sódio (FE_{Na^+}). As amostras de sangue coletadas na ocasião da eutanásia dos animais foram utilizadas também para a dosagem de creatinina, determinada utilizando kit comercial (Labtest, Brasil) tendo como cromógeno o ácido pícrico (HAUGEN, 1953).

4.6. Excreção urinária de albumina

Amostras de urina de 24 horas foram conservadas com azida sódica 20% e reservadas em freezer -20°C. O método utilizado para a dosagem de albuminúria foi o eletroimunoensaio em gel de agarose desenvolvido por Laurell (1972) e adaptado por Coimbra et al. (1983), usando anticorpo anti-albumina de rato, soluções padrões de 0,04; 0,06 e 0,1 mg/ml de albumina, agarose tipo II (Sigma Chemical Company, EUA) e tampão Tris-Acetato, pH 8,6.

4.7. Dosagem de NO no tecido renal

Amostras de tecido renal foram homogeneizadas com ácido acético 0,1 N (3: 1), centrifugadas a $10,000 \times g$ por 5 min) e aliquotadas. Em seguida, foram desproteinizadas com etanol 95% (4°C) (1: 2) e centrifugadas ($4,000 \times g$ por 5 min) novamente. O sobrenadante foi submetido a uma análise do teor de NO utilizando a técnica NO/Ozônio (HAMPL; WATERS; ARCHER, 1996) com o analisador Sievers (Sievers 280 NOA, EUA). Os níveis de proteína no tecido renal foram determinados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Os valores médios de NO foram expressos em $\mu M/\mu g$ de proteína.

4.8. Estudo histológico

Os cortes histológicos (4 µm de espessura) foram cortados do tecido embebido em parafina, corados com Tricrômio de Masson e examinados em microscopia de luz visível. Foram examinadas as regiões da medula externa e interna que foram avaliadas qualitativamente e fotografadas (AxioVision Rel. 4.3; Zeiss, Alemanha).

4.9. Análise imunoistoquímica

Cortes do rim esquerdo retirado de cada animal foram colocados em três banhos consecutivos de xilol para a desparafinação e logo após imersos em três banhos de álcool em concentrações decrescentes de águas (100%, 95% e 75%) para a hidratação do corte. Todas as lâminas passaram por um bloqueio da atividade da peroxidase endógena (azida sódica 10%, água oxigenada 30%) e um banho com PBS. Em seguida, foram incubadas com os seguintes anticorpos primários:

-Anti-eNOS (1:100) monoclonal de camundongo (Santa Cruz Biotechnology, EUA), os cortes foram incubados por 60 min a temperatura ambiente, o anticorpo foi utilizado para detecção de enzima eNOS responsável pela produção de NO derivado do endotélio.

-Anti-aminopeptidase P (JG12) (1:1000) monoclonal de camundongo (Bioscience, EUA), 60 min a temperatura ambiente, o anticorpo foi utilizado como marcador de células endoteliais renal.

-Anti-sinaptopodina (1:2000) monoclonal de camundongo (Santa Cruz Biotechnology, EUA), os cortes foram incubados por 60 min a temperatura ambiente, o anticorpo foi utilizado como marcador de lesão de barreira de filtração glomerular.

-Anti-ED1 (1:1000) monoclonal de camundongo (Serotec, Reino Unido), os cortes foram incubados por 60 min temperatura ambiente. Este anticorpo reage apenas com antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos.

-Anti- α -SM-actina (α -SMA) (1:1000) monoclonal de camundongo (Dako Corporation, Dinamarca), os cortes foram incubados overnight à 4°C. A α -SMA é um componente do citoesqueleto das células dos músculos lisos dos vasos renais. Este anticorpo é um marcador de células transdiferenciadas ou não diferenciadas. As células intersticiais, tubulares e mesangiais indiferenciadas ou após um processo de transdiferenciação são potencialmente capazes de proliferarem e produzirem vários componentes da matriz extracelular.

-Anti-vimentina (1:500) monoclonal de camundongo (Dako Corporation, Dinamarca), 60 min temperatura ambiente. Este anticorpo é um marcador de células não diferenciadas. As células tubulares renais só expressam esse antígeno quando estão em fase de proliferação ou após uma lesão tubular recente ou falta de diferenciação das células tubulares durante o desenvolvimento.

Os cortes passaram por três lavagens com PBS e foram incubados com anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina (IgG) produzido em camundongo (1:200) (Vector Laboratories, EUA) para as reações de eNOS, JG12, ED-1, Vimentina e α -SMA ou produzidos em cabra (1:400) (Vector Laboratories, EUA) para a reação de sinaptopodina, por 30 min à temperatura ambiente. O produto da reação foi detectado usando um complexo de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, EUA) e a coloração desenvolvida pela adição de DAB [3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Company, EUA)] e cloreto de níquel, na presença de peróxido de hidrogênio. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela diluição dos anticorpos primários e secundários em uma solução de PBS contendo BSA 1% [*Bovine serum albumin* (Sigma Chemical Company, EUA)]. A contra-coloração foi realizada com *methylgreen*.

A avaliação dos resultados das reações imunoistoquímicas para JG12 por área do córtex renal, medula externa e interna medindo 0,1 mm² foram realizadas pela contagem do número de capilares positivos, por 30 campos consecutivos e determinada a média para cada rato. Os resultados de ED-1 foram avaliados por área de medula externa e interna medindo 0,1 mm² pela contagem do número de macrófagos positivos em 50 campos. A avaliação das reações para α -SMA e Vimentina foram feitas na área da medula externa e interna medindo 0,1 mm² por escore de 0 a 4 em 30 campos consecutivos. Também foi avaliada a marcação por escore de 0 a 4 em 50 glomérulos por biópsia para JG12 e sinaptopodina.

Escore	Análise imunoistoquímica (KLIEM et al., 1996)
0	Entre 0% a 5% da área
1	Entre 5% e 25% da área
2	Entre 25% e 50% da área
3	Entre 50% e 75% da área
4	Entre 75% a 100% da área

4.10. Análise por *Western blot*

O tecido renal foi homogeneizado em tampão de lise: Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), Triton X-100 (1%), SDS; 0,1% (dodecil sulfato de sódio), aprotinina (1 µg/mL), leupeptin (1 µg/mL), fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 mM), ortovanato de sódio (1 mM, pH 10), pirofosfato de sódio (1 mM), fluoreto de sódio (25 mM), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético 0,001 M, pH 8) e centrifugadas (10,000 rpm/15 min) à 4°C. O sobrenadante foi separado para a dosagem de proteínas e quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Essas amostras foram estocadas à -70°C.

Amostras contendo 60 µg de proteína foram solubilizadas em tampão de amostra: Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8), glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol; foram aquecidas à 100°C por 5 min e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) 10 ou 12%. As proteínas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, sendo as membranas incubadas por 1h em 30 mL de tampão de bloqueio [leite desnatado (5%) em PBS], lavadas em tampão TBSt (*Tris Buffered Saline with Tween*): trizma base (0,05 M), NaCl (0,15 M), *tween* 20 (pH 7,6). Em seguida, as membranas foram incubadas overnight à 4°C com os anticorpos primários, anti-angiopoietina-1 (1:500; Bioss, EUA), anti-angiopoietina-2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-Tie-2 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, EUA) anti-AT₁ (1:500; Santa Cruz Biotechnology, EUA) e como proteína de referência foi utilizada a GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) [monoclonal, (1:1000), Sigma Chemical CO, EUA). Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBSt e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo para os anticorpos primários monoclonais (1:5000; Dako, Dinamarca) ou anti-IgG de coelho para os policlonais (1:10000) ligado a peroxidase (Dako, Dinamarca) por 1h em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente e o resultado da reação detectado pelo *Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Chemical, EUA) e capturado por sistema de imagem (Kodak Gel Logic 2200, EUA) (<http://www.nih.gov>). A análise da densitometria das bandas foi realizada pelo programa NIH Image J software (Research Services Branch, EUA) e os resultados expressos como porcentagem em relação à média do grupo SAC (controle), que foi indicado como 100%.

5. Análise Estatística

O teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn foi usado para analisar os dados que não passaram pelo teste de normalidade Kolmogov-Smirnov (PAS, imunoistoquímica para α -SMA na medula externa e interna, vimentina na medula externa e interna, ED-1 na medula interna, expressão por *Western blot* para AT₁, Angpt-2 e Tie-2, relação densitométrica de Angpt-1/Angpt-2). A análise de variância com comparações múltiplas de Newman-Keuls foi usado para análise de dados distribuídos normalmente (volume urinário, ingestão hídrica, FE_{Na^+} , osmolalidade urinária, creatinina plasmática, albuminúria, NO tecidual, imunoistoquímica para JG12 no córtex, medula externa, medula interna e glomérulo, ED-1 na medula externa, sinaptopodina e expressão por *Western blot* para Angpt-1). Análises estatísticas foram performados usando GraphPad Prisma versão 7.0 para Windows (GraphPad Software, EUA). Os escores estão apresentados em mediana e percentil 25% e 75%, e os demais dados estão em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

6. Resultados

6.1. Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS)

A pressão arterial sistólica foi mensurada nos animais dos diferentes grupos no final das 8 semanas de protocolo experimental. Os animais que receberam losartan (LOS) durante o período de desenvolvimento apresentaram um aumento na PAS ($p < 0,01$) aos 59 dias de idade em relação ao grupo SAC e SAC+Calcitriol. Houve uma tendência de atenuação da PAS no grupo que recebeu o tratamento com o calcitriol (LOS+Calcitriol) em relação aos animais do grupo LOS ($p > 0,05$) (**Figura 2**).

Figura 2. Pressão arterial sistólica (mmHg) aos 59 dias de idade nos animais dos grupos controles e experimentais. SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ vs SAC; ## $p < 0,01$ vs SAC+Calcitriol.

6.2. Avaliação da função renal

O consumo de água e o volume urinário estavam aumentados ($p < 0,001$) no grupo LOS e LOS+Calcitriol comparado aos grupos controles. No grupo LOS+Calcitriol essas alterações provocadas pelo losartan para consumo hídrico ($p > 0,05$) e para volume urinário ($p < 0,01$) foram atenuadas (**Tabela 1**).

Tabela 1- Consumo hídrico e volume urinário (mL) nos animais dos grupos controles e experimentais aos 60 dias de idade. SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol; LOS+Calcitriol.

	Consumo Hídrico (mL)	Volume Urinário (mL)
SAC	20,80±1,06	13,6±0,92
SAC+Calcitriol	19,00±0,57	13,33±0,55
LOS	43,17±3,51 ^{***, ###}	34,33±2,51 ^{***, ###}
LOS+Calcitriol	35,33±2,04 ^{***, ###, \$}	27,5±1,72 ^{***, ###, \$\$}

Os dados estão expressos como média ± EPM ^{***}p<0,001 vs SAC; ^{###}p<0,001 vs SAC+Calcitriol; ^{\$}p<0,05 vs LOS; ^{\$\$}p<0,01 vs LOS.

As alterações da PAS induzidas pelo losartan estavam associadas também com a diminuição da osmolalidade urinária (Uosm) (p<0,001) no grupo LOS e LOS+Calcitriol comparado aos grupos controles. Contudo, houve uma tendência de atenuação no grupo LOS+Calcitriol vs LOS (p>0,05). Os animais do grupo LOS apresentaram também um aumento (p<0,001) da excreção fracional de sódio (FENa⁺) quando comparado aos grupos controles (SAC e SAC+Calcitriol) que foi atenuado pelo tratamento com calcitriol (p<0,01) (**Tabela 2**).

Tabela 2- Osmolalidade urinária (Uosm) e fração de excreção de sódio (FENa⁺) nos animais dos grupos controles e experimentais aos 60 dias de idade. SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol.

	Uosm (mOsm/KgH ₂ O)	FENa ⁺ (%)
SAC	1475,0±26,80	0,28±0,04
SAC+Calcitriol	1504,0±24,83	0,33±0,07
LOS	632,40±62,37 ^{***, ###}	0,80±0,05 ^{***, ###}
LOS+Calcitriol	754,40±56,40 ^{***, ###}	0,56±0,04 ^{***, ###, \$\$}

Os dados estão expressos como média ± EPM ^{***}p<0,001 vs SAC; ^{###}p<0,001 vs SAC+Calcitriol; ^{\$\$}p<0,01 vs LOS.

Os níveis plasmáticos de creatinina nos animais do grupo LOS estavam aumentados ($p<0,001$) quando comparados aos animais do grupo SAC e SAC+Calcitriol. Esse aumento foi menor nos animais LOS+Calcitriol ($p<0,01$) comparadas com LOS evidenciando uma melhora da função renal (**Figura 3**).

Figura 3. Creatinina plasmática dos animais nos grupos controles e experimentais. SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p<0,001$ vs SAC; ### $p<0,001$ vs SAC+Calcitriol; \$\$ $p<0,01$ vs LOS.

6.3. Excreção urinária de albumina

Os animais que receberam losartan durante a fase de desenvolvimento renal apresentaram aumento na excreção urinária de albumina quando comparados aos grupos controles ($p<0,001$). O tratamento com calcitriol foi capaz de atenuar esse aumento ($p<0,001$) (**Figura 4**).

Figura 4. Excreção urinária de albumina nos animais dos grupos controles e experimentais. SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ vs SAC; ### $p < 0,001$ vs SAC+Calcitriol; \$\$\$ $p < 0,001$ vs LOS.

6.4. NO no tecido renal

O resultado da quantificação de NO no tecido renal evidenciou um aumento no grupo LOS+Calcitriol em relação ao grupo SAC e SAC+Calcitriol demonstrando uma provável recuperação da função das células endoteliais renais provocada pelo calcitriol ($p < 0,05$). Nos animais do grupo LOS não foram observadas diferenças nos níveis de NO (**Figura 5**).

Figura 5. Óxido nítrico no tecido renal corrigido pela proteína nos animais dos grupos controles e experimentais. SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0,05$ vs SAC; # $p < 0,05$ vs SAC+Calcitriol.

6.5. Estudo histológico

O tratamento com o calcitriol reduziu as alterações de estrutura induzidas pelo bloqueio do AT₁ durante o desenvolvimento renal. Nos animais do grupo LOS foram observadas alterações renais caracterizadas por papila atrófica, fibrose intersticial, atrofia tubular e dilatação tubular (**Figura 6, c**). Essas alterações foram atenuadas pelo tratamento com calcitriol. As alterações na medula e papila renais provocadas pelo bloqueio do AT₁ foram menos intensas nos animais do grupo LOS+Calcitriol (**Figura 6, d**).

Figura 6. Cortes histológicas corados com Tricrômio de Masson representativos nos animais dos grupos controles e experimentais. (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol.

6.6. Análise imunoistoquímica

A expressão de α -SMA, marcador de células mesenquimais, estava aumentada nos animais do grupo LOS tanto na medula externa como na interna em relação aos dos grupos SAC ($p < 0,05$) e SAC+Calcitriol ($p < 0,01$), evidenciando a falta de diferenciação celular. Esse aumento foi menor na medula externa nos animais do grupo LOS+Calcitriol ($p < 0,05$). Contudo, o tratamento com o calcitriol não atenuou esse aumento na medula interna desses animais ($p > 0,05$). As análises para α -SMA estão representadas na **Figura 7 (A e B) e 8 (C e D)**.

Figura 7. Expressão de α -SMA nos animais dos diferentes grupos experimentais na medula externa: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **A**, imunolocalização para α -SMA. Em **B**, quantificação por escore de α -SMA. Os dados estão expressos como mediana e percentil 25% e 75% * $p < 0,05$ vs SAC; ## $p < 0,01$ vs SAC+Calcitriol; \$ $p < 0,05$ vs LOS.

Figura 8. Expressão de α -SMA nos animais dos diferentes grupos experimentais na medula interna: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **C**, imunolocalização para α -SMA. Em **D**, quantificação por escore de α -SMA. Os dados estão expressos como mediana e percentil 25% e 75%. * $p<0,05$ vs SAC; ## $p<0,01$ vs SAC+Calcitriol.

A expressão de vimentina, outro marcador de diferenciação celular, teve um aumento na medula externa dos animais do grupo LOS em comparação com SAC e SAC+Calcitriol ($p<0,05$). Os animais do grupo LOS+Calcitriol apresentaram uma diminuição em comparação com os animais do grupo LOS ($p<0,05$). Na medula interna, os animais do grupo LOS apresentaram também um aumento na expressão de vimentina em comparação com SAC ($p<0,05$) e com o grupo SAC+Calcitriol ($p<0,001$). Contudo, o tratamento com o calcitriol não foi capaz de atenuar esse aumento ($p>0,05$). As avaliações para vimentina estão representadas na **Figura 9** (A e B) e 10 (C e D).

Figura 9. Expressão de vimentina nos diferentes grupos experimentais na medula externa: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **A**, imunolocalização para vimentina. Em **B**, quantificação por escore de vimentina. Os dados estão expressos como mediana e percentil 25% e 75%. * $p<0,05$ vs SAC; # $p<0,05$ vs SAC+Calcitriol; \$ $p<0,05$ vs LOS.

Figura 10. Expressão de vimentina nos diferentes grupos experimentais na medula interna: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **C**, imunolocalização para vimentina. Em **D**, quantificação por escore de vimentina. Os dados estão expressos como mediana e percentil 25% e 75%. * $p < 0,05$ vs SAC; ### $p < 0,01$ vs SAC+Calcitriol.

Os animais do grupo LOS apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) do número de células positivas para ED-1, marcador de macrófago, na região da medula externa renal (**Figura 11, A e B**). Na medula interna houve também um aumento significativo ($p < 0,05$) de macrófagos nos animais do grupo LOS (**Figura 12, C e D**). Nas duas regiões medulares houve uma tendência de diminuição do quadro inflamatório nos animais do grupo tratados com LOS+Calcitriol em relação aos não tratados com calcitriol, embora não significativo ($p > 0,05$).

Figura 11. Expressão de ED-1 nos animais dos diferentes grupos experimentais na medula externa: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **A**, imunolocalização para ED-1. Em **B**, quantificação por contagem de células positivas para ED-1. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM * $p < 0,05$ vs SAC;

Figura 12. Expressão de ED-1 nos animais dos diferentes grupos experimentais na medula interna: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **C**, imunolocalização para ED-1. Em **D**, quantificação por contagem de células positivas para ED-1. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM ^{*} $p < 0,05$ vs SAC; [#] $p < 0,05$ vs SAC+Calcitriol.

A análise imunoistoquímica evidenciou uma tendência de redução da imunorreação para JG12 em todas as regiões avaliadas nos animais do grupo LOS. Contudo, não houve alterações significantes entre os diferentes grupos na medula externa renal (**Figura 13, A e B**). Enquanto, na medula interna renal, houve uma redução de células endoteliais no grupo LOS comparado ao grupo SAC ($p<0,01$) e SAC+Calcitriol ($p<0,001$). Além disso, o grupo LOS+Calcitriol apresentou uma diferença na expressão em relação ao grupo SAC+Calcitriol ($p<0,01$) e LOS ($p<0,05$). O tratamento com o calcitriol aumentou a expressão de JG12 na medula interna dos animais do grupo SAC+Calcitriol ($p<0,05$) em relação ao grupo SAC (**Figura 14, C e D**).

Figura 13. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos experimentais na medula externa: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **A**, imunolocalização para JG12. Em **B**, quantificação por contagem de células positivas para JG12. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

Figura 14. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos experimentais na medula interna: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **C**, imunolocalização para JG12. Em **D**, quantificação por contagem de células positivas para JG12. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs SAC; ** $p < 0,01$ vs SAC; ## $p < 0,01$ vs SAC+Calcitriol; ### $p < 0,01$ vs SAC+Calcitriol; \$ $p < 0,05$ vs LOS.

A análise da expressão de eNOS evidenciou a diminuição dessa enzima catalizadora de NO nos rins de filhotes de mães expostos ao losartan (**Figura 15**). O grupo de animais que receberam calcitriol (LOS+Calcitriol) apresentou aumento de NO no tecido renal, visto na figura 4, e na expressão de eNOS no tecido renal.

Figura 15. Expressão de eNOS no tecido renal nos animais dos diferentes grupos experimentais: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol.

A microvasculatura do córtex renal e dos glomérulos também foi avaliada pela expressão de JG12 (marcador de células endoteliais) e de sinaptopodina (marcador de barreira glomerular).

Os resultados apresentados mostram que ocorreu uma tendência de diminuição na região cortical ($p>0,05$) (**Figura 16, A e B**). Contudo, nos glomérulos foi significativa a redução dessa marcação nos animais do grupo LOS ($p<0,001$) e essa alteração foi menos intensa nos animais que receberam o tratamento com o calcitriol ($p<0,05$) (LOS+Calcitriol) (**Figura 17, C e D**).

Figura 16. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos experimentais no córtex renal: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **A**, imunolocalização para JG12. Em **B**, quantificação por contagem de células positivas para JG12. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

C **D**

Figura 17. Expressão de JG12 nos animais dos diferentes grupos experimentais nos glomérulos renais: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **C**, imunolocalização para JG12. Em **D**, quantificação por escore para JG12. Os dados estão expressos como mediana e percentil 25% e 75%. *** $p < 0,001$ vs SAC; ### $p < 0,01$ vs SAC+Calcitriol; \$ $p < 0,05$ vs LOS.

Houve diferenças estatísticas na expressão do marcador de barreira glomerular sinaptopodina dos grupos que receberam losartan em relação ao grupo SAC+Calcitriol. Os grupos LOS e LOS+Calcitriol apresentaram-se diferentes ($p<0,05$) do grupo que recebeu apenas calcitriol (SAC+Calcitriol) durante o protocolo experimental (**Figura 18, A e B**).

Figura 18. Expressão de sinaptopodina nos animais dos diferentes grupos experimentais nos glomérulos renais: (a) SAC; (b) SAC+Calcitriol; (c) LOS; (d) LOS+Calcitriol. Em **A**, imunolocalização para sinaptopodina. Em **B**, quantificação por escore para sinaptopodina. Os dados estão expressos como mediana e percentil 25% e 75%. # $p<0,05$ vs SAC+Calcitriol.

6.7. Análise de *Western blot*

As expressões de AT₁, Angpt-1, Angpt-2 e Tie-2 foram avaliadas por *Western blot*. Foi observado aumento da expressão renal de AT₁ (**Figura 19**) nos animais do grupo LOS quando comparados ao controle (SAC) e esse aumento não foi observado nos animais do grupo LOS+Calcitriol. Com relação aos fatores angiogênicos, não foram observadas diferenças estatísticas nas expressões de Angpt-1 e Angpt-2 entre os grupos avaliados (**Figuras 20 e 21**), bem como na razão densitométrica de Angpt-1/Angpt-2 (**Figura 22**), embora tenha uma tendência para o aumento desta relação no grupo LOS+Calcitriol em comparação ao grupo LOS. A expressão de Tie-2 não foi diferente entre os grupos SAC, SAC+Calcitriol e LOS, porém a expressão do receptor estava reduzida no grupo LOS+Calcitriol comparado ao grupo SAC ($p<0,001$) (**Figura 23**).

Figura 19. Expressão de AT₁ avaliada por *Western blot* no tecido renal nos animais dos diferentes grupos experimentais: SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. A razão densitométrica entre as bandas de AT₁ e de GAPDH foi calculada e os dados foram expressos em comparação aos grupos controles, com o valor médio designado como 100%. Os dados estão expressos como média ± EPM. ** $p<0,01$ vs SAC; \$ $p<0,05$ vs LOS.

Figura 20: Expressão de Angpt-1 avaliada por *Western blot* no tecido renal nos animais dos diferentes grupos experimentais: SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. A razão densitométrica entre as bandas de Angpt-1 e de GAPDH foi calculada e os dados foram expressos em comparação aos grupos controles, com o valor médio designado como 100%. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

Figura 21. Expressão de Angpt-2 avaliada por *Western blot* no tecido renal nos animais dos diferentes grupos experimentais: SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. A razão densitométrica entre as bandas de Angpt-2 e de GAPDH foi calculada e os dados foram expressos em comparação aos grupos controles, com o valor médio designado como 100%. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

Figura 22. Relação densitométrica para Angpt-1/Angpt-2 nos animais dos diferentes grupos experimentais: SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. A razão densitométrica entre as bandas de Angpt-1/GAPDH foram divididas por Angpt-2/GAPDH. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM.

Figura 23. Expressão de Tie-2 avaliada por *Western blot* no tecido renal nos animais dos diferentes grupos experimentais: SAC; SAC+Calcitriol; LOS; LOS+Calcitriol. A razão densitométrica entre as bandas de Tie-2 e de GAPDH foi calculada e os dados foram expressos em comparação aos grupos controles, com o valor médio designado como 100%. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ vs SAC.

Discussão

7. Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o tratamento com calcitriol após a lactação e continuado até o final do período experimental reduz as alterações da microvasculatura renal provocadas pela exposição ao losartan durante a fase de desenvolvimento. Esse efeito estava relacionado com a atenuação dos distúrbios da função e estrutura renal induzidos pelo losartan. O tratamento com calcitriol atenuou a redução da expressão de JG12 (marcador de célula endotelial) nas células da medula interna e glomérulos renais provocadas pelo losartan. O efeito do calcitriol na função endotelial nos animais do grupo LOS+Calcitriol foi evidenciado também pelo aumento da expressão de eNOS e da produção de NO no tecido renal. Além disso, esses animais apresentaram uma tendência a redução do processo inflamatório no tecido renal avaliado pela presença de células positivas para ED-1 (marcador de macrófagos), provocado pelo tratamento com losartan durante a lactação. Não foram detectados nos estudos de *Western blot* alterações nas expressões das Angpt-1 e 2. Contudo, houve uma tendência ao aumento da relação da Angpt-1 para Angpt-2 e uma redução da expressão do receptor Tie-2 no tecido renal dos animais do grupo LOS+Calcitriol em relação ao grupo controle.

Diversos eventos que ocorrem durante a fase de desenvolvimento podem induzir o aparecimento de hipertensão na vida adulta. A programação fetal resulta de diversos mecanismos que incluem a regulação do volume e da pressão arterial sanguínea (MADSEN et al., 2013). Há evidências que existe uma correlação entre diminuição do fluxo sanguíneo medular com o aumento da PAS (ROMAN; KALDUNSKI, 1988). A microcirculação medular renal que se expande durante a vida embrionária na presença do SRA intacto (TUFRO-MCREDDIE et al., 1995) contribui para essa manutenção e controle de excreção de sódio e água (MADSEN et al., 2013). A inibição do AT₁ durante o período de desenvolvimento renal resulta em um aumento da pressão arterial (SPENCE et al., 1996), redução da função e alterações na estrutura renal na vida adulta (WOODS; RASCH, 1998). Estudos anteriores realizados no nosso laboratório utilizando esse modelo experimental mostraram que a elevação da PAS estava associada ao aumento da ANGII (ALMEIDA et al, 2017). Esse aumento pode ser por um aumento compensatório na síntese de renina (LI, 2010) devido a interrupção da ligação de ANGII-AT₁ durante o desenvolvimento renal. Após a lactação e remoção do tratamento com losartan, ocorre um aumento da renina que pode ser modulado via CREB pelo calcitriol como postulado por Li et al. (2002), com a diminuição da expressão de ANGII (ALMEIDA et al., 2017) e uma tendência de atenuação da PAS, como observado neste estudo.

Essas alterações na microcirculação da medula renal estavam associadas a uma redução na osmolalidade urinária observada nos ratos tratados com losartan. Esse tratamento provocou um defeito na habilidade de concentração, com aumento volume urinário. Esse efeito pode ser explicado pela atrofia papilar nesses animais provocando redução na reabsorção de água pelo ducto coletor medular (GURON et al., 1999). Essas alterações estavam associadas a redução dos vasos na medula interna e glomérulos, lesão tubulointersticial da área medular, hidronefrose e falta da diferenciação de células glomerulares e tubulares. A habilidade de concentração da urina depende de um gradiente osmótico medular gerado por mecanismo de multiplicação contracorrente e a interação de fatores angiogênicos como Angpts-Tie-2 para formação de feixes vasculares na medula, eventos importantes para a manutenção do gradiente osmótico nessa área (KENIG-KOZLOVSKY et al., 2018). O bloqueio da ANGII durante o processo de desenvolvimento e a falta de interação de fatores angiogênicos, provoca a rarefação capilar desencadeando alterações na habilidade de concentração urinária que irá persistir na vida adulta como foi observado nesse estudo. A FE_{Na^+} teve um aumento discreto no grupo que recebeu losartan durante a fase de desenvolvimento, evidenciando alterações no transporte renal de sódio. A circulação medular contribui para a manutenção de fluidos, eletrólitos renais e da perfusão renal para que não haja mudanças no fluxo sanguíneo medular renal e na excreção de sódio e água e da pressão arterial (MATTSON, 2003). Alterações na função e estrutura renal caracterizadas pelo aumento da creatinina plasmática e albuminúria foram observadas no presente estudo e em estudos similares realizados com esse modelo (GURON et al., 1997; BALBI et al., 2008; MARIN et al., 2014, ALMEIDA et al., 2017, 2019).

O calcitriol tem efeito na manutenção da célula endotelial e na modulação do gene da renina e pode contribuir para a redução das alterações da PAS (LI et al., 2002) e excreção de sódio induzidas pelo losartan (ALMEIDA et al., 2017). A osmolalidade urinária do grupo que recebeu losartan e calcitriol pode não ter sido significativamente diferente do grupo que recebeu apenas losartan devido a não recuperação de estrutura renal evidenciada por hidronefrose provocada pela perda do parênquima da medula renal durante o desenvolvimento provocada pelo losartan. ANGII tem participação na ramificação do BU, sendo responsável pela indução da formação dos vasos corticais e medulares. A ausência de ANGII compromete cerca de 50% do parênquima renal (MADSEN et al., 2010). Os animais expostos ao losartan apresentam alterações na ativação da Vit. D devido aos distúrbios de diferenciação das células dos túbulos proximais com redução dos receptores para reabsorção da Vit. D não ativada, cubulina e megalina (NIELSEN; CHRISTENSEN e BIRN, 2016). Diversos estudos clínicos demonstram que a doença renal crônica está diretamente relacionada deficiência de Vit. D (ECHIDA et al.,

2012; KUMAR et al., 2017). As alterações da função e fenótipos das células epiteliais dos túbulos proximais e/ou de estrutura devido a lesão do parênquima renal, podem causar um déficit na produção e fornecimento de Vit. D ativa (TAN; LI; LIU, 2006).

Os efeitos do calcitriol sobre a albuminúria tem sido também observados em diversos modelos de doenças renais incluindo nefrite mesangial proliferativa (PANICHI et al., 2001), nefrectomia subtotal (KOLEGANOVA et al, 2008) e sobre as proteínas da fenda diafragmática em modelo de glomerulonefrite (MIGLIORI et al., 2005). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a albuminúria foi menos intensa nos animais do grupo que recebeu calcitriol após a lactação (LOS+Calcitriol) do que naqueles tratados apenas com losartan (LOS). Zhang et al. (2014) observaram que o calcitriol prevenia a lesão de podócitos na nefropatia diabética mantendo integridade das proteínas da fenda diafragmática, nefrina e podocina, componentes importantes da barreira de filtração. Contudo, no presente estudo não foi observado o efeito do calcitriol na alteração da expressão de sinaptopodina (outro marcador de barreira de filtração glomerular) nos glomérulos renais induzida pelo losartan.

As células endoteliais revestem os vasos sanguíneos e os capilares. Estas apresentam grande importância no processo de perda de função renal e progressão da doença renal (RADENSKOVIC; STOJANOVIC; PROSTRAN, 2016). Nos rins, o endotélio participa da barreira de filtração glomerular, juntamente com a membrana basal glomerular e podócitos, contribuindo para a filtração de componentes do sangue e formação do ultrafiltrado (SCOTT; QUAGGIN, 2015). As lesões endoteliais progridem para alterações na microvasculatura renal. A rarefação de capilares glomerulares e peritubulares está relacionada com distúrbios da microvasculatura (YOO et al., 2018). Seron et al. (1990) e Bohle, Mackensen-Haen e Wehmann (1996) observaram uma correlação negativa entre o número de capilares peritubulares e função renal, evidenciada pelo aumento da creatinina sérica.

A rarefação vascular causada pela inibição do SRA é desencadeada por alterações nos mecanismos de diferenciação, proliferação e apoptose de células endoteliais (REMUZZI et al., 2016). Os capilares pós-glomerulares descem para a medula externa e se ramificam em vasos retos na medula externa (MATTSON, 2003). Os vasos retos no modelo de bloqueio do SRA durante o desenvolvimento renal apresentam distúrbios em sua formação (MADSEN et al., 2010; TINNING et al., 2016). Os feixes vasculares apresentam-se irregulares como pode ser observado em nosso presente estudo. Além disso, a papila atrófica e a presença de hidronefrose, atrofia e dilatação tubular observadas no estudo são característica desse modelo de bloqueio do SRA (YIM et al., 2016; YOO et al., 2018). Essas alterações foram atenuadas pelo tratamento

com calcitriol por quatro semanas consecutivas, por suas propriedades não clássicas que incluem efeitos na proliferação e diferenciação celular.

As células dos túbulos renais quando sofrem o processo de transdiferenciação tornam-se potencialmente capazes de migrarem para o interstício, proliferarem e de produzirem os componentes da matriz extracelular. A imunorreação para α -SMA nos animais controles está presente apenas nas paredes das arteríolas e vasos (TUFRO-McREDDIE et al., 1994, MARIN et al., 2013). Em modelo de obstrução ureteral, foi observado que o tratamento com calcitriol reduziu a fibrose intersticial renal e a expressão de α -SMA e preservou as conexões célula-célula e de fenótipo epitelial, suprimindo a expressão de fatores fibróticos (TAN; LI; LIU, 2006). Ratos neonatos tratados com losartan apresentam uma regulação negativa dos componentes do citoesqueleto. O SRA é importante durante a fase de desenvolvimento para estabelecer interações célula-célula e interações com a matriz extracelular (MARCHESI; PARADIS; SCHIFFRIN, 2008). A falta de diferenciação dos túbulos renais medulares no grupo LOS foi menos intensa no grupo que recebeu calcitriol, evidenciando a participação da Vit. D na restauração da diferenciação celular já observada em outros estudos (SAMUEL; SITRIN, 2008; HOLICK, 2013; ALMEIDA et al., 2017). A imunolocalização do marcador vimentina também foi analisada como marcador de falta de diferenciação e transição epitélio mesenquimal (TEM) no compartimento medular. Em condições normais, a vimentina, um componente do citoesqueleto, está presente em células epiteliais glomerulares e paredes de vasos (MARIN et al., 2013). Contudo, a presença de vimentina nas células tubulares está relacionada com lesão tubular renal recente, falta de diferenciação ou distúrbios na proliferação celular e fenótipo de células epiteliais. O tratamento com calcitriol reduziu a expressão de vimentina na medula externa renal dos ratos que receberam losartan. A administração de calcitriol está associada com o aumento da expressão de vários componentes de adesão celular, como ocludina, zonula de oclusão 1 e 2 (*zonula occludens*) (KONG et al., 2008) e claudinas 2 e 12 e *tight junctions*, estruturas importantes para a manutenção e diferenciação do epitélio (FUJITA et al., 2008).

Distúrbios na tubulogênese e dilatação do lúmen dos túbulos medulares, são alterações que podem estar relacionadas com um desenvolvimento inadequado da vasculatura renal (CHEN et al., 2004; YIM et al., 2016). Nos animais do grupo LOS foi observado o aumento de marcadores mesenquimais (α -SMA e vimentina), maior número de macrófagos (ED-1) e redução do marcador para células endoteliais (JG12). O tratamento com o calcitriol atenuou esses distúrbios, reduzindo a expressão de células mesenquimais. Esses efeitos do calcitriol foram também observados em outros estudos (PANICHI et al., 2001; ALMEIDA et al., 2017; ALMEIDA; COIMBRA, 2017). Tan, Li e Liu (2006) mostraram que o tratamento com

paricalcitol reduz a TEM avaliada pela diminuição de marcadores mesenquimais como α -SMA e fibronectina em modelo de nefropatia obstrutiva. A Vit. D atua inibindo o fator de transcrição Snail (envolvido na programação da TEM) e restaura a expressão de VDR. A deficiência de calcitriol é considerada um preditor de lesão progressiva e da perda de função renal desencadeada por diferentes fatores, resultando no processo fibrótico (TAN; LI; LIU, 2006).

A Vit. D tem sido descrita como um importante imunomodulador para diversos tratamentos, incluindo doenças renais, como a nefropatia diabética, por regulação de células imunes e citocinas inflamatórias (ZHAO et al., 2018). O calcitriol reduz infiltração, migração e adesão de macrófago e resposta imune inata, assim como expressão de mediadores pró-inflamatórios e deposição de matriz extracelular (SANCHEZ-NINO et al., 2012), melhorando, portanto, a função renal (ZHAO et al., 2018). O processo inflamatório foi realizado nesse estudo utilizando o anticorpo anti-ED1 que reage apenas contra antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos. Nossos resultados mostram que o grupo LOS teve o aumento do infiltrado de macrófagos. Há uma tendência de diminuição de células positivas no grupo que recebeu o calcitriol após a fase de lactação.

Os resultados do presente estudo mostram que os animais tratados com losartan apresentam distúrbios na vasculatura renal que foram atenuados pelo calcitriol. Contudo, o impacto benéfico da suplementação de Vit. D em marcadores de microvasculatura ainda não está claro (BEVERIDGE et al., 2018). O calcitriol pode reduzir as alterações na microvasculatura renal causadas por distúrbios dos fatores que modulam o crescimento e a diferenciação das células vasculares que ocorrem na inibição do SRA (CARDUS et al., 2009). Nós observamos a falta de diferenciação de capilares peritubulares evidenciada pela redução da expressão de JG12. Yoo et al. (2018) relataram em ratos expostos a inibição da ECA durante 8 dias após o nascimento, uma diminuição na expressão de JG12. Vários estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a deficiência de Vit. D causa comprometimento do endotélio (ALMEIDA et al., 2019; TARE et al., 2011; TARCIN et al., 2009; CHITALIA et al., 2012). A deficiência isolada de Vit. D pode causar alterações nos capilares peritubulares e consequente rarefação capilar (ALMEIDA et al., 2019). A falta de diferenciação dos glomérulos e capilares peritubulares foi evidenciada em todas as regiões do parênquima renal (córtex, glomérulos, medulas externa e interna) e foi atenuada pelo tratamento com calcitriol. Esses achados demonstram a participação do calcitriol na diferenciação celular e na função vascular.

A ligação ANGII-AT₁ tem um papel importante na vascularização renal durante desenvolvimento contribuindo para diferenciação e ramificação dos brotos (SONG et al., 2009). A expressão do receptor AT₁ estava elevada no grupo LOS. Esse aumento pode ser devido ao

mecanismo compensatório gerado pela sensibilidade do receptor pela atividade reduzida da ligação com a ANGII. O receptor AT₁ está presente em todos os segmentos, exceto no ramo descendente da alça de Henle (MADSEN et al., 2010).

As Angpts são importantes para a quiescência dos vasos e para o processo de angiogênese. A Angpt-1 promove migração, adesão e sobrevivência endotelial. Observamos tendência de aumento da expressão de Angpt-1 nos animais SAC+Calcitriol, explicando uma possível melhora na diferenciação no número de vasos, também na vida adulta. Por outro lado, a Angpt-2 promove a apoptose e a regressão vascular. A Angpt-2 não se alterou no período avaliado nesse protocolo experimental. A Angpt-2 está relacionada com o processo inflamatório da doença crônica, aumentando o de número de células inflamatórias na região da medula. Um estudo recente demonstrou que ocorre o espessamento dos vasos, deterioração dos vasos retos e níveis anormais de fatores angiogênicos em ratos expostos ao bloqueio de ANGII na gravidez (TINNING et al., 2016). Em nosso estudo, as expressões de Angpt-1 e Angpt-2 nos ratos tratados com LOS+Calcitriol não foram diferentes dos tratados apenas com losartan e dos grupos controles, mas a relação Angpt-1/Angpt-2 tendeu a aumentar na idade adulta em animais que receberam LOS+Calcitriol. A ligação de Angpt-1 com o receptor Tie-2 garante a função do pericito e maturação de vasos. A Angpt-2 antagonizando essa função, promove o aumento do processo inflamatório (AUGUSTIN et al., 2009; MAISONPIERRE et al., 1997). O receptor Tie-2 estava diminuído nos animais do grupo LOS+Calcitriol em comparação com o grupo controle. Trabalhos recentes mostraram correlação entre os aumentos na expressão de Tie-2 e a rarefação vascular em filhotes expostos bloqueador da ECA durante a lactação (YOO et al., 2018). Os nossos resultados mostram que houve rarefação da microvasculatura renal nos animais tratados com losartan. Esse processo pode ocorrer devido a um desequilíbrio no eixo Angpts/Tie-2 durante o desenvolvimento, que permanece na idade adulta. A relação entre Angpt-1 e Angpt-2 (Angpt-1/Angpt-2) estava diminuída em animais LOS, indicando um ambiente anti-angiogênico, que foi atenuado pelo calcitriol (YANCOPOULOS et al., 2000; OSHIMA et al., 2004; AUGUSTIN et al., 2009).

Os animais LOS+Calcitriol apresentaram uma maior produção de NO. O NO está envolvido na sinalização de fatores de crescimento vasculares endoteliais. Essas vias angiogênicas se relacionam e em condições fisiológicas são coordenadas pela ANGII na fase de desenvolvimento. Estas são ativadas pelos sinais de Akt/PI3K para a eNOS (HELLE, IVERSEN; CHATZIANTONIOU, 2010) e consequente produção de NO derivado do endotélio. A Akt fosforila eNOS, ativando esta enzima (FELIERS et al., 2005). Estudos *in vitro* e *in vivo* observaram que o aumento de eNOS resulta em proliferação e migração de células

endoteliais promovendo angiogênese (BABAEI; STEWART, 2002; BACH; SADOUS; REED, 2005). Em nosso modelo, os níveis de NO tendem a aumentar no grupo LOS. O aumento do NO no grupo que recebeu losartan e calcitriol (LOS+Calcitriol) em relação aos controles pode reduzir a vasoconstrição gerado pelo aumento da atividade do receptor AT_1 , o que ocorre em outros modelos como na nefropatia induzida por cisplatina, o qual promove vasoconstrição renal e aumento nos níveis de NO tecidual (FRANCESCATO et al., 2018).

Alguns estudos têm mostrado que a suplementação com Vit D. melhora a função endotelial em pacientes com doença renal crônica. Essa melhora é devido ao aumento da expressão ou atividade da eNOS que resulta em maior produção de NO (ZOCCALI et al., 2014; VANHOUTTE et al., 2017). Portanto, a deficiência de calcitriol pode piorar a função vascular devido seu efeito nas células musculares lisas vasculares e respostas vasodilatadoras (KUMAR et al., 2017). A tensão de cisalhamento é reduzida na doença renal crônica devido a redução do NO pró-angiogênico e fatores de crescimento como, o VEGF e o VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*). Quando a tensão de cisalhamento cessa, a célula entra em morte programada e perde o sinal apropriado da matriz extracelular e o suporte dos pericitos, criando um ambiente pró-inflamatório com presença de macrófagos iniciando o mecanismo de rarefação (BALLERMAN; OBEIDAT, 2014).

A Vit. D ativada pode preservar a microvasculatura e melhorar o fluxo sanguíneo capilar e, portanto, a perfusão tecidual (LUNDWALL et al., 2015), fatores esses alterados pela exposição ao losartan no período de lactação. A interação entre as células dos túbulos renais e as células endoteliais que expressam esses receptores angiogênicos, é importante porque permite oxigênio e suprimentos que atingem a microvasculatura renal ao tecido renal e impede o processo de rarefação capilar (DIMKE et al., 2015). O efeito sinérgico do calcitriol e de fatores de crescimento como, o VEGF podem induzir a neovascularização e a saúde endotelial (CARDUS et al., 2009). Concluindo, o calcitriol atua na angiogênese, modulando o processo de proliferação e diferenciação celular contribuindo para preservação da função e da estrutura renal.

No presente estudo, o calcitriol alterou a expressão de JG12 nos glomérulos e na região da medula interna de animais que receberam losartan durante a fase de desenvolvimento, mostrando que o calcitriol foi capaz de modular a densidade de capilares glomerulares e peritubulares neste modelo. Esse efeito estava associado a diferenciação celular promovido pelo calcitriol e com redução da expressão de receptores Tie-2 no tecido renal.

Conclusão

8. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o tratamento com calcitriol melhorou a função e estrutura renal nos animais tratados com losartan durante o período de desenvolvimento renal. Esses efeitos estavam relacionados com a manutenção da microvasculatura renal e da estrutura e função das células endoteliais no glomérulo, córtex, medula externa e interna de ratos expostos ao bloqueio de AT₁ durante a lactação. A inflamação e fatores anti-angiogênicos podem ter contribuído para a rarefação capilar observada nesses animais. Esses resultados mostram que o calcitriol pode atenuar os distúrbios na diferenciação de células renais, contribuindo para a manutenção da função e estrutura das células endoteliais e da microvasculatura renal em ratos expostos ao losartan durante a lactação.

Referências

9. Referências

AIRD, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. **Circulation Research**, v. 100, n. 2, p. 158-173, 2007.

AL-BADR, W.; MARTIN, K. J. Vitamin D and kidney disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 5, p. 1555-1560, 2008.

ALMEIDA, L. F. et al. Calcitriol reduces kidney development disorders in rats provoked by losartan by losartan administration during lactation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11472, 2017.

ALMEIDA, L. F. et al. 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**, p. 1-5, 2019.

ALMEIDA, L. F.; COIMBRA, T. M. Vitamin D actions on cell differentiation, proliferation and inflammation. **International Journal of Complementary & Alternative Medicine**, v. 6, n. 5, 2017.

ALVAREZ, V. et al. Overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension caused by renal infiltration of immune cells. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 283, n. 5, p. F1132-F1141, 2002.

ANDERSEN, L. B. et al. Vitamin D Depletion Aggravates Hypertension and Target-Organ Damage. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 2, p. e001417, 2015.

AUGUSTIN, H. G. et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 165, 2009.

BABAEI, S.; STEWART, D. J. Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 1, p. 190-200, 2002.

BACH, M. H. M.; SADOUN, E.; REED, M. J. Defects in activation of nitric oxide synthases occur during delayed angiogenesis in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 4, p. 467-473, 2005.

BALBI, A. P. C. et al. MAPK and angiotensin II receptor in kidney of newborn rats from losartan-treated dams. **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 9, p. 1433-1444, 2008.

BALLERMANN, B. J.; OBEIDAT, M. Tipping the balance from angiogenesis to fibrosis in CKD. **Kidney International Supplements**, v. 4, n. 1, p. 45-52, 2014.

BARKER, D. J. P. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. sup6, p. 588S-595S, 2004.

BAYNES J. W.; DOMINICZAK M. H. Bioquímica médica – 4ª. ed. - Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2015.

BEVERIDGE, L. A. et al. Effect of vitamin D supplementation on markers of vascular function: a systematic review and individual participant meta-analysis. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 11, p. e008273, 2018.

BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; WEHRMANN, M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 19, n. 3-4, p. 191-195, 1996.

BOUÏS, D. et al. A review on pro-and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. **Pharmacological Research**, v. 53, n. 2, p. 89-103, 2006.

BOYCE, A. C. et al. Maternal vitamin D deficiency programmes adult renal renin gene expression and renal function. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 4, n. 5, p. 368-376, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal origins of adult disease. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 41, n. 6, p. 158-176, 2011.

CÂMPEAN, V. et al. Angiopietin 1 and 2 gene and protein expression is differentially regulated in acute anti-Thy1. 1 glomerulonephritis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 294, n. 5, p. F1174-F1184, 2008.

CARDUS, A. et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 1, p. 85-89, 2009.

CHA, J. H. et al. Cell proliferation in the loop of Henle in the developing rat kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 7, p. 1410-1421, 2001.

CHEN, Y.; LASAITIENE, D.; FRIBERG, P. The renin-angiotensin system in kidney development. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 181, n. 4, p. 529-535, 2004.

CHEN, Y. et al. Neonatal losartan treatment suppresses renal expression of molecules involved in cell-cell and cell-matrix interactions. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 5, p. 1232-1243, 2004.

CHITALIA, N. et al. Vitamin D deficiency and endothelial dysfunction in non-dialysis chronic kidney disease patients. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 1, p. 265-268, 2012.

CHOI, J. S. et al. Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 predicts mortality in acute lung injury induced by paraquat. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 19, p. 28, 2013.

COIMBRA, T. M. et al. Effects of administration of cationic and native homologous albumin on the kidney. **Nephron**, v. 33, n. 3, p. 208-215, 1983.

DAVIS, B. et al. Podocyte-specific expression of angiopoietin-2 causes proteinuria and apoptosis of glomerular endothelia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 8, p. 2320-2329, 2007.

DAVIS, S. et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1161-1169, 1996.

DE BRAGANÇA, A. C. et al. Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats. **Physiological Reports**, v. 3, n. 3, 2015.

DIMKE, H. et al. Tubulovascular cross-talk by vascular endothelial growth factor a maintains peritubular microvasculature in kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 5, p. 1027-1038, 2015.

DRESSLER, G. R. The cellular basis of kidney development. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 509-529, 2006.

DUSSO A. S.; BROWN A. J.; SLATOPOLSKY E. Vitamin D. **American Journal Physiology-Renal Physiology**. 289: F8–F28, 2005.

ECHIDA, Y. et al. Risk factors for vitamin D deficiency in patients with chronic kidney disease. **Internal Medicine**, v. 51, n. 8, p. 845-850, 2012.

FAA, G. et al. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 3, p. 1257-1268, 2012.

FAENSEN, A. L. et al. Genetic low nephron number hypertension is associated with altered expression of key components of the renin-angiotensin system during nephrogenesis. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 44, n. 6, p. 705-709, 2016.

FELIERS, D. et al. VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. **Kidney International**, v. 68, n. 4, p. 1648-1659, 2005.

FRANCESCATO, H. D. C. et al. Previous exercise effects in cisplatin-induced renal lesions in rats. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 43, n. 2, p. 582-593, 2018.

FUJITA, H. et al. Tight junction proteins claudin-2 and-12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 5, p. 1912-1921, 2008.

GERLICZ, Z. et al. Disturbed balance between serum levels of receptor tyrosine kinases Tie-1, Tie-2 and angiopoietins in systemic sclerosis. **Dermatology**, v. 228, n. 3, p. 233-239, 2014.

GURON, G.; FRIBERG, P. An intact renin–angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 2, p. 123-137, 2000.

GURON, G. et al. Mechanisms of impaired urinary concentrating ability in adult rats treated neonatally with enalapril. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 165, n. 1, p. 103-112, 1999.

GURON, G. et al. Neonatal angiotensin-converting enzyme inhibition in the rat induces persistent abnormalities in renal function and histology. **Hypertension**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1997.

HAMPL, V. Determination of Nitric Oxide by the. **Methods in Nitric Oxide Research**, p. 309, 1996.

HAMZAWY, M. et al. The cellular selection between apoptosis and autophagy: roles of vitamin D, glucose and immune response in diabetic nephropathy. **Endocrine**, v. 58, n. 1, p. 66-80, 2017.

HAUGEN, H. N. The determination of endogenous creatinine in plasma and urine. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation**. 5:48-57, 1953.

HELLE, F.; IVERSEN, B. M.; CHATZIANTONIOU, C. Losartan increases NO release in afferent arterioles during regression of L-NAME-induced renal damage. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 298, n. 5, p. F1170-F1177, 2010.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, 2011.

HOLICK, M. F. Vitamin D, sunlight and cancer connection. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 13, n. 1, p. 70-82, 2013.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 18, n. 2, p. 153-165, 2017.

HU, X. et al. Vitamin D protects against diabetic nephropathy: evidence-based effectiveness and mechanism. **European Journal of Pharmacology**, 2018.

IRUELA-ARISPE, M. L.; ZOVEIN A. Angiogenesis. **Fetal and Neonatal Physiology**, 85–89, e2, 2017.

JONES, P. F. Not just angiogenesis—wider roles for the angiopoietins. **The Journal of Pathology**, v. 201, n. 4, p. 515-527, 2003.

JOUSSEN, A. M. et al. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 5, p. 1683-1693, 2002.

KANG, D. H. et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 3, p. 806-816, 2002.

KENIG-KOZLOVSKY, Y. et al. Ascending vasa recta are angiopoietin/Tie2-dependent lymphatic-like vessels. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 4, p. 1097-1107, 2018.

KISA, B. et al. Severe 25-OH vitamin D deficiency as a reason for adverse pregnancy outcomes. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, p. 1-5, 2018.

KLIEM, V. et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. **Kidney International**, v. 49, n. 3, p. 666-678, 1996.

KOLEGANOVA, N. et al. Calcitriol ameliorates capillary deficit and fibrosis of the heart in subtotaly nephrectomized rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 3, p. 778-787, 2008.

KONG, J. et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 1, p. G208-G216, 2008.

KORFF, T. et al. Angiopoietin-1 mediates inhibition of hypertension-induced release of angiopoietin-2 from endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 94, n. 3, p. 510-518, 2012.

KUHLMANN, A. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 286, n. 3, p. F526-F533, 2004.

KUMAR, V. et al. A randomized trial of vitamin D supplementation on vascular function in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 10, p. 3100-3108, 2017.

LAURELL, C. B. Electroimmuno assay. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 29, n. sup124, p. 21-37, 1972.

LEE, K. W.; LIP, G. Y. H.; BLANN, A. D. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 110, n. 16, p. 2355-2360, 2004.

- LI, Y. C. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 2, p. 229-238, 2002.
- LI, Y. C. et al. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89, p. 387-392, 2004.
- LI, Y. C. Renoprotective effects of vitamin D analogs. **Kidney International**, v. 78, n. 2, p. 134-139, 2010.
- LOGANATHAN, K. et al. Angiopoietin-1 deficiency increases renal capillary rarefaction and tubulointerstitial fibrosis in mice. **PloS One**, v. 13, n. 1, p. e0189433, 2018.
- LONG, N. M. et al. Growth and insulin dynamics in two generations of female offspring of mothers receiving a single course of synthetic glucocorticoids. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 207, n. 3, p. 203. e1-203. e8, 2012.
- LOPEZ, M. L. S. S.; GOMEZ, R. A. Development of the renal arterioles. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. ASN. 2011080818, 2011.
- LUMBERS, E. R. et al. The renin-angiotensin system from conception to old age: the good, the bad and the ugly. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 11, p. 743-752, 2013.
- LUNDWALL, K. et al. Paricalcitol, microvascular and endothelial function in non-diabetic chronic kidney disease: a randomized trial. **American Journal of Nephrology**, v. 42, n. 4, p. 265-273, 2015.
- MADSEN, K. et al. Angiotensin II promotes development of the renal microcirculation through AT1 receptors. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. ASN. 2009010045, 2010.
- MADSEN, K. et al. Postnatal development of the renal medulla; role of the renin-angiotensin system. **Acta Physiologica**, v. 208, n. 1, p. 41-49, 2013.
- MAISONPIERRE, P. C. et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 55-60, 1997.
- MAKIBAYASHI, K. et al. A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 5, p. 1733-1741, 2001.
- MANIOS, Y. et al. A systematic review of vitamin D status in southern European countries. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 2001-2036, 2018.
- MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p. 367-374, 2008.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- MARIN, E. C. S. et al. The role of oxidative stress in renal injury induced in rats by losartan exposure during lactation. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 15, n. 4, p. 362-377, 2014.
- MATTSON, D. L. Importance of the renal medullary circulation in the control of sodium excretion and blood pressure. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 1, p. R13-R27, 2003.

MCCARTER, S. D. et al. Cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 10, p. 1014-1026, 2007.

MCCAUSLAND, J. E. et al. Glomerular number and size following chronic angiotensin II blockade in the postnatal rat. **Experimental Nephrology**, v. 5, n. 3, p. 201-209, 1997.

MIGLIORI, M. et al. Treatment with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 preserves glomerular slit diaphragm-associated protein expression in experimental glomerulonephritis. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 779-790, 2005.

NADAR, S. K. et al. Abnormal angiopoietins 1&2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor levels in hypertension: relationship to target organ damage [a sub-study of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)]. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, n. 4, p. 336-343, 2005.

NYKJAER, A. et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. **Cell**, v. 96, n. 4, p. 507-515, 1999.

NYKJAER, A. et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25 (OH) vitamin D3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13895-13900, 2001.

NIELSEN, R.; CHRISTENSEN, E. I.; BIRN, H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. **Kidney International**, v. 89, n. 1, p. 58-67, 2016.

OSHIMA, Y. et al. Angiopoietin-2 enhances retinal vessel sensitivity to vascular endothelial growth factor. **Journal of Cellular Physiology**, v. 199, n. 3, p. 412-417, 2004.

PANICHI, V. et al. Effects of 1, 25 (OH) 2D3 in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. **Kidney International**, v. 60, n. 1, p. 87-95, 2001.

PIKE, J. W. et al. Genomic determinants of vitamin D-regulated gene expression. In: **Vitamins & Hormones**. Academic Press. p. 21-44, 2016.

RADENKOVIC, M.; STOJANOVIC, M.; PROSTRAN, M.. Endothelial dysfunction in renal failure: current update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 19, p. 2047-2054, 2016.

RAMAGOPALAN, S. V. et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. **Genome Research**, v. 20, n. 10, p. 1352-1360, 2010.

RAVANI, P. et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 75, n. 1, p. 88-95, 2009.

REIS, N. G. et al. Protective effect of calcitriol on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7090, 2019.

REMUZZI, A. et al. Regression of renal disease by angiotensin II antagonism is caused by regeneration of kidney vasculature. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 3, p. 699-705, 2016.

ROMAN, R. J.; KALDUNSKI, M. L. Renal cortical and papillary blood flow in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 11, n. 6_pt_2, p. 657-663, 1988.

SAMUEL, S.; SITRIN, M. D. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. **Nutrition reviews**, v. 66, n. suppl_2, p. S116-S124, 2008

SANCHEZ-NIÑO, M. D. et al. Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 302, n. 6, p. F647-F657, 2011.

SCHWARZ, U et al. Effect of 1, 25 (OH) 2 vitamin D3 on glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats. **Kidney International**, v. 53, n. 6, p. 1696-1705, 1998.

SCOTT, R. P.; QUAGGIN, S. E. The cell biology of renal filtration. **The Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 2, p. 199-210, 2015.

SERON, D. et al. Number of interstitial capillary cross-sections assessed by monoclonal antibodies: relation to interstitial damage. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 5, n. 10, p. 889-893, 1990.

SIMOES, D. C. M. et al. Angiopoietin-1 protects against airway inflammation and hyperreactivity in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 177, n. 12, p. 1314-1321, 2008.

SINGH, H. et al. Molecular control of angiopoietin signalling. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, 1592–1596, 2011.

SINGH, S. et al. Tubular overexpression of angiopoietin-1 attenuates renal fibrosis. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0158908, 2016.

SONG, R. et al. Angiotensin II AT2 receptor regulates ureteric bud morphogenesis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 298, n. 3, p. F807-F817, 2009.

SPENCE, S. G. et al. Toxicokinetic analysis of losartan during gestation and lactation in the rat. **Teratology**, v. 53, n. 4, p. 245-252, 1996.

SUN, Y. et al. Prenatal dexamethasone exposure increases the susceptibility to autoimmunity in offspring rats by epigenetic programming of glucocorticoid receptor. **BioMed Research International**, 2016.

TAN, X.; LI, Y.; LIU, Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 12, p. 3382-3393, 2006.

TARCIN, O. et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 4023-4030, 2009.

TARE, M. et al. Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 19, p. 4777-4786, 2011.

TINNING, A. R. et al. Vascular endothelial growth factor signaling is necessary for expansion of medullary microvessels during postnatal kidney development. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 311, n. 3, p. F586-F599, 2016.

TUFRO-MCREDDIE, A. et al. Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 266, n. 6, p. F911-F918, 1994.

TUFRO-MCREDDIE, A. et al. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 269, n. 1, p. F110-F115, 1995.

VACCARI, B. et al. Fetal kidney programming by severe food restriction: effects on structure, hormonal receptor expression and urinary sodium excretion in rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 1, p. 33-46, 2015.

VAN MEURS, M. et al. Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness—a future target? **Critical Care**, v. 13, n. 2, p. 207, 2009.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease—a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22-96, 2017.

WANG, T. Vitamin D and cardiovascular disease. **Annual Review of Medicine**, v. 67, p. 261-272, 2016.

WOODS, L. L.; RASCH, R. Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n. 5, p. R1593-R1599, 1998.

WOLF, G. Angiotensin II and tubular development. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. suppl_9, p. 48-51, 2002.

YAMADA, T.; HORIUCHI, M.; DZAU, V. J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 1, p. 156-160, 1996.

YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242, 2000.

YANG, X.; LIU, L. The role of angiopoietin-1 and thrombospondin-1 in the kidney of rats subject to 5/6 nephrectomy. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 29, n. 5, p. 557, 2009.

YIM, H. E. et al. Impaired angiogenesis in the enalapril-treated neonatal rat kidney. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 59, n. 1, p. 8, 2016.

YOO, K. H. et al. Capillary rarefaction and altered renal development: the imbalance between pro-and anti-angiogenic factors in response to angiotensin II inhibition in the developing rat kidney. **Journal of Molecular Histology**, v. 49, n. 2, p. 219-228, 2018.

ZHANG, L. et al. Prenatal food restriction induces a hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis-associated neuroendocrine metabolic programmed alteration in adult offspring rats. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 5, p. 335-345, 2013.

ZHANG, X. L. et al. Vitamin D prevents podocyte injury via regulation of macrophage M1/M2 phenotype in diabetic nephropathy rats. **Endocrinology**, v. 155, n. 12, p. 4939-4950, 2014.

ZHAO, Y. et al. Vitamin D suppresses macrophage infiltration by down-regulation of TREM-1 in diabetic nephropathy rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 473, p. 44-52, 2018.

ZOCCALI, C. et al. Paricalcitol and endothelial function in chronic kidney disease trial. **Hypertension**, v. 64, n. 5, p. 1005-1011, 2014.

Anexo

10. Anexo A-

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 178/2014, sobre o projeto intitulado "*Efeito da Vitamina D nas alterações renais provocadas em ratos pela exposição ao Losartan durante o período Neonatal*", sob a responsabilidade do **Professora Doutora Terezila Machado Coimbra** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de maio de 2015.

We certify that the protocol n° 178/2014, entitled "*Vitamin D effect on renal damage induced by losartan exposition during lactation*", 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 the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/25/2015.

Ribeirão Preto, 25 de maio de 2015.

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