UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS FERREIRA DE ALMEIDA

**Efeito da Vitamina D nas alterações renais provocadas em ratos
pela exposição ao Losartan durante o período de lactação**

Ribeirão Preto
2016

LUCAS FERREIRA DE ALMEIDA

**Efeito da Vitamina D nas alterações renais provocadas em ratos
pela exposição ao Losartan durante o período lactação**

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
Fisiologia

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

Ribeirão Preto
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Almeida, Lucas Ferreira. **Efeito da Vitamina D nas alterações renais provocadas em ratos pela exposição ao Losartan durante o período de lactação**

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 Fisiologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, **José Antonio de Almeida e Cássia Terezinha Ferreira de Almeida.***

AGRADECIMENTOS

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

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

Gostaria também de agradecer a **Drª Heloisa Della Coletta Franscescato**, que trabalhou ao meu lado durante o decorrer desse trabalho, sempre me ensinando e me apoiando, e com a generosidade e a paciência de ensinar. Adoro você e torço muito pelo seu sucesso.

À **Cleonice Giovanini**, que sem sua ajuda certamente a conclusão deste trabalho seria muito difícil, pois você sabe as dificuldades que tive na realização deste trabalho durante esses 2 anos.

À amigada da **Camila Faleiros** como companheira de laboratório e colaboradora de grande aprendizado durante esses anos.

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

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

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

Ao funcionário do Biotério **Leonardo Fidelis Filho** do Departamento de Fisiologia, da FMRP-USP pelo auxílio prestado durante a realização do projeto.

À **Profª Drª Isis do Carmo Kettelhut**, e ao **Prof Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes** e aos alunos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica da FMRP-USP, pela colaboração dedicada a esta pesquisa e pela oportunidade de colaboração.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

Ao **CNPQ**, pelo indispensável auxílio financeiro fornecido durante os dois anos do trabalho.

À **USP de Ribeirão Preto**, na qual durante esses 2 longos anos tive o privilegio de conhecer excelentes professores, de quem levarei para sempre os ensinamentos.

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

Richard Dawkins

RESUMO

Almeida, L.F. **Efeito da Vitamina D nas alterações renais provocadas em ratos pela exposição ao Losartan durante o período de lactação.** 2016 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Ratos expostos a antagonistas da angiotensina II no período da lactação apresentam alterações no desenvolvimento renal que persistem na vida adulta promovendo distúrbios progressivos da estrutura e função renal. Esse estudo caracteriza-se por analisar a influência da 1,25-(OH)₂-D₃ (Vitamina D₃) (calcitriol) nas alterações da nefrogênese induzidas pelo bloqueio dos receptores de angiotensina AT₁ no período da lactação. Ratos *Wistar* machos foram divididos em quatro grupos: 1- controle, filhotes de mães que receberam solução de sacarose a 2%; 2- controle+Vit. D, filhotes de mães que receberam solução sacarose a 2% e após o período de lactação (25 dias incluindo o período adaptativo) receberam Vit.D (6ng/dia, calcitriol-*abbott*); 3- losartan, filhotes de mães que receberam losartan (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2%; 4- losartan+Vit.D, filhotes de mães que receberam losartan (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2% e após a lactação (25 dias incluindo o período adaptativo) receberam calcitriol (6ng/dia). O losartan foi diluído em uma solução de sacarose a 2% e administrado em substituição a água (no bebedouro) durante a lactação, enquanto que a Vit. D foi administrada através de *mini-osmotic pump (Model 2004 alzet)* implantados na região dorsal subcutânea 4 dias após o final do período de lactação e mantido durante 28 dias. A pressão arterial sistólica foi aferida 28 dias após a introdução da Vit. D. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue e urina das proles para avaliação da função renal e os rins removidos para estudos histológicos, imunoistoquímicos, morfométricos e ELISA. Os ratos expostos ao losartan durante a lactação apresentaram aumento da pressão arterial sistólica (PAS) e alterações de função e estrutura renal caracterizada por aumento do volume urinário, da fração de excreção de sódio e potássio, proteinúria, aumento da área intersticial relativa do córtex renal, atrofia dos túbulos renais, fibrose, inflamação intersticial e diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e osmolalidade urinária. O tratamento com Vit.D após o período de lactação atenuou as alterações da pressão arterial sistólica, taxa de filtração glomerular, fração de excreção de sódio e potássio, proteinúria, área intersticial relativa e área glomerular relativa, evidenciando efeito protetor nos distúrbios da formação renal e na inflamação. Concluindo, o tratamento com Vit.D introduzido após o término da lactação reduziu as alterações da PAS, da estrutura e função renal induzidas pelo losartan, essas alterações estavam associadas aos distúrbios na diferenciação celular e inflamação que persistiram durante a vida adulta.

Palavras-chave: Vitamina D, Desenvolvimento renal, Angiotensina II, Diferenciação celular, Inflamação.

ABSTRACT

Almeida, L.F. **Vitamin D effect on renal changes in rats exposed to losartan during lactation** 2016 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Rats exposed to angiotensin II (All) antagonists during lactation present progressive disturbances in renal development leading to alterations in function and structure that persist and progresses in adult life. This study evaluated the effect of Vitamin D (1,25- (OH) 2-D3) (calcitriol) in the disturbances of renal development provoked by losartan, a AT1 antagonist of All, exposure during lactation in renal function and structure as well in systolic blood pressure (SBP). Male Wistar rats were divided into four groups: Group 1: control, pups from dams that received 2% sucrose solution; Group 2: control+Vit. D, pups from dams that received sucrose solution 2% and Vit.D (6ng / day) after lactation period (25 days including adaptation period); Group 3: losartan, pups from mothers that received losartan (100 mg / kg / day) diluted in sucrose 2% and Group 4: losartan+Vit.D, pups from mothers who received losartan (100 mg / kg / day) diluted in sucrose 2% and calcitriol (6 ng/ day) after lactation period (25 days including adaptation period). Losartan was administered diluted in drinking water in sucrose solution 2% and Vit. D administered by mini-osmotic pump. Treatment with losartan was conducted during all lactation, while Vit.D was introduced after lactation and maintained during the next 28 days. Then SBP was measured and blood and urine samples were collected of the offspring for the evaluation of renal function and kidney removed for histological, immunohistochemical, morphometric, and ELISA studies. Rats exposed to losartan during lactation showed higher SBP in adulthood life. They also had disturbances in renal function and structure in adulthood. These alterations were characterized by increased urinary volume, fractional sodium and potassium excretion, proteinuria, interstitial area from the renal cortex, renal tubule atrophy, fibrosis, interstitial inflammation and decrease glomerular filtration rate and (GFR) urinary osmolality. In conclusion, treatment with Vit.D after lactation attenuated the increase in SBP and the reduction in sodium and potassium fractional excretion and GFR, of interstitial area. The protector effect of this vitamin D was associated to the reduction of the disturbances in inflammation, cell differentiation and proliferation that persist in adulthood life.

Keywords: Vitamin D, Cell differentiation, Angiotensin II, Inflammation.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Desenvolvimento renal.....	19
1.2 Sistema renina angiotensina no desenvolvimento renal.....	23
1.3 Participação da Vitamina D, na diferenciação, proliferação celular e nas respostas inflamatórias.....	26
1.4 Mecanismos de reabsorção renal de vitamina D.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos gerais.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3. HIPÓTESES.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Animais.....	34
4.2 Delineamento experimental.....	34
4.3 Avaliação do Peso corporal e da Ingestão de líquidos e ração.....	36
4.4 Pressão arterial sistólica.....	37
4.5 Carga excretada de albumina.....	38
4.6 Avaliação da função renal.....	38
4.7 Quantificação do TGF- β e MCP-1 nas amostras de urina.....	38
4.8 Processamento do tecido renal para microscopia de luz e Preparo dos cortes e coloração com Tricrômio de Masson e imunoistoquímica	39
4.9 Estudo histológico e morfométrico.....	41
4.10 Análise imunoistoquímica.....	41
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6. RESULTADOS.....	47

6.1 Avaliação da mortalidade, do peso, ingestão de líquidos e ração das proles dos diferentes grupos.....	48
6.2 Avaliação da pressão arterial.....	50
6.3 Estudos de função renal das proles dos diferentes grupos.....	51
6.4 Análise histológica e morfométrica.....	53
6.5 Análise imunoistoquímica.....	58
 7. DISCUSSÃO.....	 68
 8. CONCLUSÃO.....	 84
 9. REFERÊNCIAS.....	 86
 ANEXO.....	 101

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Representação esquemática dos 5 estágios do desenvolvimento renal.....	20
Figura 2.	Etapas do desenvolvimento glomerular em ratos.....	22
Figura 3.	Parede dos capilares glomerulares com os componentes celulares (células endoteliais, epiteliais e membrana basal) e moleculares.....	23
Figura 4.	Protocolo experimental.....	36
Figura 5.	Equipamentos utilizados para aferir a pressão arterial.....	37
Figura 6.	Procedimentos utilizados nos processos de desidratação e diafanização do tecido renal.....	40
Figura 7.	Escores utilizados para análise imuno-histoquímica.....	44
Figura 8.	Variação do peso corporal (g) do nascimento ao final da lactação das proles dos diferentes grupos.....	49
Figura 9.	Pressão arterial sistólica (mmHg) nas proles dos diferentes grupos após o tratamento com Vitamina D.....	51
Figura 10.	Excreção urinária de albumina nos grupos controles e experimentais.....	53
Figura 11.	Análise histológica dos glomérulos corados com Tricrômio de Masson.....	55
Figura 12.	Porcentagem de distribuição das subpopulações de glomérulos e área glomerular média nos diferentes grupos.	56
Figura 13.	Cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson e avaliação morfométrica das lesões túbulo intersticiais.....	57
Figura 14.	Imunolocalização para α -SMA na medula interna renal.....	58
Figura 15.	Imunolocalização para α -SMA região intersticial do córtex renal e nos glomérulos renais.....	59
Figura 16.	Imunolocalização e quantificação de células ED-1 positivas (macrófagos/monócitos) nos glomérulos e no compartimento túbulo intersticial do córtex renal.....	61
Figura 17.	Imunolocalização e quantificação para PCNA nos glomérulos e no compartimento túbulo intersticial do córtex	

	renal dos animais dos diferentes grupos.....	62
Figura 18.	Imunolocalização e escore para vimentina no compartamento intersticial no córtex renal dos animais dos diferentes grupos.....	63
Figura 19.	Imunorreação e escore para fibronectina no córtex renal dos animais dos diferentes grupos.....	64
Figura 20.	Imunorreação renal e quantificação para All no compartamento intersticial do córtex renal.....	65
Figura 21.	Imunorreação e quantificação da expressão para p-JNK no córtex renal dos animais dos diferentes grupos.....	66
Figura 22.	Imunorreação e quantificação da expressão para p-38 MAPK no córtex renal.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Consumo de ração e ingestão de líquidos, durante os 21 dias de lactação pelos animais dos diferentes grupos.....	48
Tabela 2.	Dados relativos à mortalidade dos animais até o final da lactação (21 dias de idade) nos diferentes grupos.....	48
Tabela 3.	Volume de líquido ingerido e consumo de ração no período 40 a 46 dias de idade pelos animais dos diferentes grupos.	50
Tabela 4.	Peso corporal nos períodos (30,45 e 60 dias de idade) dos animais dos diferentes grupos.....	50
Tabela 5.	Volume e a osmolalidade urinária nas proles controles e tratadas com losartan e losartan + vit. D, nos animais com 60 dias de idade dos animais dos diferentes grupos.....	51
Tabela 6.	Parâmetros de função renal dos animais com 60 dias de idade dos diferentes grupos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang	angiotensina II
AT ₁	receptor de angiotensina II do tipo 1
AT ₂	receptor de angiotensina II do tipo 2
α -SMA	<i>alpha-smooth-muscle actin</i>
ANOVA	Análise de Variância para Comparações Paramétricas
BSA	Albumina de soro bovino
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de Ang
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FGF-23	fator de crescimento de fibroblasto-23
GLEPP1	Proteína glomerular epitelial 1 (<i>Glomerular Epithelial Protein 1</i>)
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i>
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein-3</i>
IL-6	Interleucina 6
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kiloDalton
mA	Miliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matriz extracelular

MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFkB	Fator nuclear-kappa B
NYSDOH	<i>New York State Department of Health (Departamento de Saúde do Estado de Nova York)</i>
PAS	Pressão arterial sistólica
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
RNA	Ácido ribonucléico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superóxido dismutase
TFA	Ácido <i>trifluoroacético</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
VDR	<i>vitamin D receptor</i>
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VDBP	Vitamin D binding protein
7-DHC	7-deidrocolesterol

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento renal

O desenvolvimento renal no homem tem início em torno da 5ª semana de gestação e se completa *in útero* antes da 36ª semana gestacional (Nigam e cols, 1996; MacDonald e cols, 1959). Em ratos e camundongos, a nefrogênese inicia-se nos 11º e 12º dias embrionário e continua até a 2ª semana após o nascimento. Cerca de 80% dos nefros se formam nos primeiros 7 a 10 dias após o nascimento. A maturação estrutural final e funcional só se completa por volta da 3ª semana pós-natal, coincidindo com o período de desmame (Schreuder e cols., 2006; Nigam; Aperia; Brenner, 2008). No rato recém-nascido, os glomérulos mais maduros estão localizados mais próximos da junção corticomedular (juxtamedulares), enquanto que, os glomérulos imaturos encontram-se na região mais superficial do córtex renal (Nigam; Aperia; Brenner, 2008; Reeves; Caulfield; Farquhar, 1978).

O rim de mamíferos deriva-se de três estruturas fetais: pronefros, mesonefros e metanefros. Na maioria dos mamíferos, incluindo humanos e roedores, os pronefros e mesonefros aparecem no início da gestação e sofrem regressão, enquanto que os metanefros diferenciam-se para formarem o rim adulto (Nigam; Aperia; Brenner, 2008). Durante a nefrogênese, ocorre a interação entre as células mesenquimais do blastema metanéfrico e as células epiteliais do broto ureteral, um ramo do ducto mesonéfrico (ducto de *Wolfman*). As células mesenquimais indiferenciadas migram, condensando-se ao redor das extremidades do ureter em ascensão e sofrem conversão mesenquimal-epitelial. Essas células se proliferam formando vesículas que se desenvolvem sequencialmente em forma de vírgula e corpos em forma de S, estruturas precursoras dos glomérulos e túbulos renais. O desenvolvimento glomerular é um processo contínuo e pode ser dividido em 5 estágios: (1º) formação em vesícula; (2º) formação em vírgula; (3º) formação em “S”; (4º) desenvolvimento de alças capilares e (5º) maturação dos glomérulos (**Figura 1**) (Bartlett; Jeansson; Quaggin, 2016).

Figura 1. Representação esquemática dos 5 estágios do desenvolvimento glomerular

No primeiro estágio (1) surge um grupo de células epiteliais colunares formando o revestimento da vesícula. No estágio subsequente (2), formação em “S”, em seguida (3) o epitélio transforma-se em duas ou mais camadas profundas de células e entre elas, forma-se o espaço de *Bowman*. No estágio 4, inicia-se a

formação de alças capilares e o epitélio passa por um processo de reorganização. Os epitélios parietais da cápsula de *Bowman* são contínuos. No final dessa fase (5), a membrana basal surge entre o epitélio visceral e o endotélio (Bartlett; Jeansson; Quaggin, 2016). No estágio do desenvolvimento das alças capilares pode ser observadas várias alças em vários estágios de maturação e também conspícuos espaços celulares ao longo da margem lateral entre as células do epitélio visceral. A membrana basal e as fenestrações endoteliais diferenciam-se juntamente com os processos podais. A membrana basal aumenta sua espessura e origina uma estrutura mais complexa com uma camada densa central, a lâmina densa e as lâminas rara interna e externa adjacentes ao endotélio e epitélio, respectivamente. Os glomérulos podem ser considerados maduros quando apresentam múltiplas alças capilares, embora o epitélio visceral ainda não tenha alcançado o seu padrão normal, ou seja, uma configuração mais achatada e diferenciação dos processos podais e fendas completamente estabelecidas. Nesse estágio final, o endotélio e o epitélio visceral apresentam configuração achatada madura (**Figura 2**) (Reeves; Caulfield; Farquhar, 1978).

Figura 2. Fases do desenvolvimento glomerular em ratos. 1- formação em vesículas; 2- formação em S; 3- desenvolvimento de alças capilares e 4- maturação de glomérulos (REEVES; CAULFIELD; FARGUHAR, 1978).

A formação da matriz extracelular (MEC) representa um importante evento na formação dos glomérulos. Os principais componentes da MEC são: colágenos tipo III e IV, fibronectina, lamininas e proteoglicanas (perlecano e agrina) (**Figura 3**) (Pavenstädt, 2003; Haraldsson, 2008). A fibronectina é uma glicoproteína que interage com outras proteínas da matriz e proteínas associadas a células, participando no processo de adesão e migração celular (Thiery e cols, 1989, Yamada e cols 1991, Haraldsson e cols 2008). Fatores de crescimento (TGF-beta, PDGF) liberados localmente participam da formação e regulam a produção da MEC, induzindo a remodelação tecidual que ocorre na embriogênese, no desenvolvimento e no reparo de tecido após lesão (Border; Noble, 1994).

Figura 3. Modelo representativo da parede dos capilares glomerulares com os componentes celulares (células endoteliais e epiteliais) e moleculares.

1.2 Sistema renina-angiotensina no desenvolvimento renal

Vários trabalhos têm mostrado que o tratamento com antagonistas da Angiotensina II (All) durante o desenvolvimento renal interferem com esse processo de diferenciação e formação dos nefros (Madsen e cols 2010; Marin e cols 2013). Os animais expostos aos antagonistas de All durante o período de gestação e/ou de lactação apresentam redução do número de nefros, células tubulares e vasculares pouco diferenciadas e aumento da área intersticial relativa que persistem na vida adulta (Machado e cols 2008, Madsen e cols 2010). Ratos de 1 e 7 dias de idade apresentam aumento da expressão da α -SMA que é considerado um marcador de miofibroblastos, uma célula indiferenciada, potencialmente capaz de proliferar e produzir matriz extracelular. Contudo, após a maturação renal essas células perdem esses componentes e se diferenciam em células altamente especializadas (células tubulares e glomerulares) importantes

para o estabelecimento da função renal. A All tem uma participação chave nesse processo (Wolf G 2002; Balbi e cols. 2008, Marin e cols 2013). A participação do sistema renina-angiotensina (SRA) no desenvolvimento renal vem sendo demonstrado em diversos estudos experimentais (Spence e cols 1996, Sauter e cols 2008, Madsen e cols 2010, Marin e cols 2013). Os componentes deste sistema estão expressos no rim em maior intensidade no período pré-natal e da lactação. Alterações no desenvolvimento renal têm sido também observadas em rins de fetos humanos cuja mãe foi submetida ao tratamento com antagonistas do SRA durante o período de gestação (Sedman, Kershaw, Bunchman., 1995; Thompson e cols. 2005, Cragan e cols 2015).

A nefrogênese em humanos e em outros mamíferos se completa antes do nascimento. Os níveis plasmáticos de renina e da All estão aumentados durante o período pré-natal quando comparados ao período pós-natal (Wilson e cols., 1986; Fiselier e cols., 1983; Wallace; Hook; Balie, 1980; Kotchen e cols., 1972). Entretanto, em ratos e camundongos, onde a nefrogênese se completa após o nascimento, as concentrações máximas plasmáticas dos componentes do SRA ocorrem entre as 2^o e 4^o semanas após o nascimento (Rosenberg e cols., 1990).

Diversos estudos vêm demonstrando que a All modula a expressão de genes relacionados com transcrição de fatores de crescimento que regulam o crescimento e diferenciação das células renais (Omori e cols 2000, Geisterfer, Peach, Queens 1998, Woolf, Winyard 1998, Coles, Burne, Raff 1993, Taubman e cols 1989, Chen e cols 2004). A All estimula a síntese da MEC pelas células mesangiais em cultura atuando diretamente ou via indução da produção do fator de crescimento transformador beta (*Transforming Growth Factor- β* , *TGF- β*) (Kagami e cols 1994). O TGF- β modula proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares e induz a síntese de diversos componentes da MEC (Roberts, Mccune, Sporn 1992, Lyons, Moses 1990, Roberts, Sporn 1990, Rizzino 1988, Igotz, Endo, Massagé 1987, Sporn e cols 1987). O TGF- β estimula a produção de colágeno, fibronectina (Coimbra e cols 1991, Igotz, Endo, Massagé 1987) e proteoglicanas (Border e cols 1990) pelos miofibroblastos, fibroblastos, células mesangiais e reduz a degradação da MEC (Edwardse cols 1987). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a produção renal do TGF- β está aumentada em ratos recém-nascidos, quando comparadas com animais adultos (Coimbra, Silva, Lachat 1994).

Millan e cols. observaram que os subtipos de receptores de Ang II estão expressos em grande quantidade em rins de ratos durante a nefrogênese (Millan e cols 1989). O aumento do RNA mensageiro para o receptor de Ang II do tipo 1 (AT₁) pode ser detectado nos glomérulos renais, vasos e córtex em ratos recém-nascidos onde a proliferação e diferenciação celular ocorrem simultaneamente (Tufro-Mcreddie e cols 1993).

A inibição do SRA pela administração de inibidores da enzima conversora de Ang I (ECA) ou de antagonistas do AT₁ no período do desenvolvimento pós-natal (3 a 21 dias) em ratos provoca anormalidades na estrutura e função renal, caracterizadas pela redução do volume glomerular, dilatação tubular, atrofia papilar e aumento da área intersticial relativa do córtex renal (Machado e cols 2008, Balbi e cols 2008, Marin e cols 2013), redução da capacidade de concentração urinária, queda da taxa de filtração glomerular (TFG) e proteinúria nesses animais (Friberg e cols 1994, McCausland, Ryan, Alcorn 1994, Balbi e cols 2008, Madsen e cols 2010, Marin e cols 2013). Essas anormalidades estruturais têm sido atribuídas, em parte, aos distúrbios no desenvolvimento vascular (Balbi e cols 2008, Madsen e cols 2010, Marin e cols 2013) e causam alterações na estrutura e função renal que persistem na vida adulta e provocam elevados índices de mortalidade fetal (Spence e cols 1995, Balbi e cols 2008, Marin e cols 2013). Ratos neonatos tratados com losartan, um antagonista de receptores AT₁, por durante a lactação, apresentam alterações tubulares e comprometimento dos glomérulos, que se caracterizavam imaturos com menor diâmetro, e em menor número (Tufro-Mcreddie e cols 1995, Balbi e cols 2008, Marine cols 2013, Fanelli e cols 2011). Entretanto, quando o tratamento com losartan foi realizado em ratos com mais de 21 dias (após a lactação), essas alterações não são observadas, evidenciando que o desenvolvimento renal de ratos está suscetível aos efeitos do bloqueio do SRA, durante a lactação (Hilgers, Norwood, Gomez 1997).

Os receptores de Ang II do tipo 2 (AT₂) intra-renais são também abundantes no período de desenvolvimento renal evidenciando a participação dos mesmos na diferenciação epitélio mesenquimal e apoptose, eventos importantes nesse estágio (Norwood, Harris, Gómez 1994, Ciuffo e cols 1993, Grady e cols 1991, Chen e cols 2004). Os receptores AT₂ medeiam a morte celular programada (apoptose), a diferenciação celular e a inflamação (Balbi e cols 2008, Horiuchi, Akishita, Dzau 1999). Kakushi e colaboradores (1995) relataram, em camundongos, a presença do

RNA mensageiro para AT₂ no interstício, que está em contato com os ductos coletores, e em menor quantidade no mesênquima nefrogênico. Evidenciando a relação entre apoptose e a presença desses receptores, o que resulta na remoção do excesso de mesênquima. Koseki e cols postularam que durante o desenvolvimento renal o mesênquima pode ser automaticamente programado para morte celular e necessita ser removido por fatores de crescimento para que o processo de desenvolvimento renal prossiga (Kiseki e cols 1992).

1.3 Participação da Vitamina D, na diferenciação, proliferação celular e nas respostas inflamatórias

A vitamina D abrange um grupo de moléculas secosteroides derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC) interligadas através de uma cascata de reações celulares fotolíticas e enzimáticas de diferentes tecidos (Holick MF 2007). Essa denominação abrange tanto o metabólito ativo (1 α ,25-diidroxi-vitamina D ou calcitriol) como seus precursores (entre eles a vitamina D₃ ou colecalciferol, vitamina D₂ ou ergosterol e a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol (Dusso e cols, 2005). Várias moléculas estão relacionadas com a atividade da vitamina D (Vit.D), tais como a sua proteína carreadora (DBP, *vitamin D binding protein*), seu receptor (VDR, *vitamin D receptor*) e diversas enzimas que participam da cascata de reações de ativação e inativação (Calberg e cols 2013). O rim possui uma participação fundamental na reabsorção e ativação da Vit.D. A ativação da Vit.D ocorre nos rins, nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais, onde a 25 (OH) D é novamente hidrolizada pela ação da enzima 1 α ,25-diidroxi-vitamina D, enquanto que a sua reabsorção após a ligação com a DBP por processo de endocitose ocorre nos túbulos proximais e é mediada por dois receptores, a megalina e cubilina (Nielsen e cols 2016). Essa via renal é complexa e envolve a participação de diversos fatores, entre eles o paratormônio (PTH), e o fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) (Nykjaer e cols 1999, Holick MF 2011). Portanto, o rim desempenha um papel crítico no processo do metabolismo da Vit. D. A doença renal provoca a deficiência ou insuficiência da Vit.D que deve ser adicionada ao tratamento desses pacientes (Helvig e cols 2010).

O conhecimento sobre a função da Vit.D, primariamente atribuída na regulação no metabolismo do cálcio e fósforo, tem expandido bastante nas últimas décadas (Holick MF 2011, Ferder e cols 2013, Calton e cols 2015). Atualmente, sabe-se que a Vit.D está envolvida também na homeostase de vários outros processos celulares, entre eles a modulação da autoimunidade, do processo inflamatório (síntese de interleucinas inflamatórias); a síntese de antibióticos naturais pelas células de defesa dos mamíferos e no controle da pressão arterial (Liu e cols 2006, Freundlich e cols 2008, Zhang e cols 2012, Calton e cols 2015). Além disso, participa também na regulação dos processos de multiplicação e diferenciação celular e tem sido atribuído também a essa molécula um efeito na antioncogênese (Holick MF 2013). Estudos recentes têm mostrado também a sua participação na regulação do gene da renina, a Vit.D atua como um regulador negativo da expressão desse gene, atuando através da inibição da transcrição do CREB (*cAMP response element-binding protein*), que é necessário para a expressão do gene da renina (Li e cols 2002, Holick MF 2007, Slatopolsky e cols 2008, Bikle e cols 2009, Ferder e cols 2013). Vários estudos têm mostrado que a falta de Vit.D provoca a ativação do gene da renina, enquanto que o seu aumento leva a redução da expressão desse gene (Li e cols 2002; Freundlich e cols 2008).

A dimensão do espectro das ações da Vit.D na fisiologia sistêmica pode ser observada a partir de estudos moleculares de microarranjos (*microarrays*) e análise *in silico*, os quais mostram que a Vit.D ativa, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, tem mais de 2000 genes-alvos, correspondendo a cerca de 3% do genoma humano (Schwartz e cols 1998, Wang e cols 2005, Adams e cols 2010, Holick MF 2010).

1.4 Mecanismo renal de reabsorção da vitamina D

A Vit.D circula no plasma ligada à sua proteína carreadora, a DBP, uma proteína de 50 KDa, que possui uma alta afinidade e especificidade à Vit.D (Nykjaer cols 1999, Christensen e cols 2002). Após a sua filtração pelos glomérulos renais, o complexo Vit.D/DBP é reabsorvido pelos túbulos proximais. Esse complexo Vit.D/DBP é livremente filtrado e reabsorvido pelos túbulos proximais por endocitose. As moléculas esteroides, como a Vit.D, atravessam a membrana plasmática, por

serem lipossolúveis e de baixo peso molecular (384.64 g/mol), se distribuem em todo compartimento extracelular (Negri LA 2006, Yousefzadeh e cols 2014). Contudo, a presença de um receptor específico situado nas células dos túbulos proximais permite maior seletividade e controle de ativação por esse órgão (Christensen e cols 2002, Nielsen e cols 2016). As células dos túbulos proximais possuem um aparato proteico muito complexo, situado na bordadura em escova, responsável pela endocitose do complexo Vit.D/DBP através do receptor que reconhece a DBP. Este receptor é constituído pelas proteínas megalina e cubilina. A megalina foi descrita na década de 80, partir de estudos com nefrite de Heymann (Kerjaschki D, Farquhar MG 1982, Saito e cols 1994, Nielsen e cols 2016). O complexo Vit.D/DBP liga-se ao receptor cubilina e posteriormente à megalina desencadeando a formação de uma vesícula endocítica que se funde com lisossoma no citoplasma resultando na degradação da DBP e liberação da Vit.D que será convertida em 1,25 dihidroxi-vitamina D, o seu metabólito ativo, pela ação da enzima 1- α -hidroxilase (Holick MF 2011). Portanto, como nos animais expostos ao losartan durante a lactação a sua ativação poderá estar prejudicada devido aos distúrbios na diferenciação das células dos túbulos proximais, local onde estão situados os seus receptores. Além disso, esses animais apresentam aumento da carga filtrada de albumina e estudos recentes (Chun e cols 2014) têm mostrado que a albumina compete com o carreador da Vitamina D (VDBP) na ligação com esses receptores (megalina, cubulina), reduzindo dessa forma a sua reabsorção renal e a sua concentração plasmática.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito do tratamento como metabolito ativo da vitamina D ($1\alpha,25$ -diidroxi-vitamina D), calcitriol, nas alterações do desenvolvimento renal provocadas pela exposição ao losartan no período de lactação e na pressão arterial sistólica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol nas alterações de função renal: albuminúria, taxa de filtração glomerular, fração de excreção de sódio e potássio, em ratos tratados com losartan no período de lactação.

- Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol nas alterações da estrutura renal provocada pelo tratamento com losartan no período de lactação.

- Analisar o efeito do tratamento com calcitriol no processo inflamatório renal e na diferenciação das células renais em ratos tratados com losartan no período de lactação.

- Analisar o efeito do tratamento com calcitriol na pressão arterial sistólica em ratos tratados com losartan no período de lactação.

HIPÓTESES

3. HIPÓTESES

Vários estudos clínicos e experimentais têm mostrado que os animais expostos ao losartan no período de lactação apresentam alterações no desenvolvimento renal que resultam em distúrbios na função e na estrutura renal que persistem e progridem durante a vida adulta. A Vit.D (calcitriol) tem efeitos importantes na apoptose, diferenciação e proliferação celular: eventos importantes no desenvolvimento renal que poderiam resultar na recuperação de alterações renais induzidas pela exposição ao losartan durante a lactação. Além disso, o calcitriol modula a síntese de renina reduzindo, dessa forma, a ação da angiotensina II via receptor AT2 na apoptose, inflamação e fibrose presentes no tecido renal desses animais. Além disso, esses animais apresentam os túbulos proximais pouco diferenciados e em menor número o que pode provocar alterações na síntese do calcitriol, o componente ativo da Vit. D, pelas células dos túbulos renais desses animais. Portanto, a administração da forma ativa dessa Vitamina poderá contribuir para a redução das alterações renais induzidas pela exposição ao losartan durante o período de lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos Munich-Wistar de 250–280 gramas (n=8) e ratas de 180-200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto foram acasalados e seus respectivos filhotes machos (n=84) separados após a lactação para esse estudo. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina em número máximo de quatro animais por caixa, à temperatura de 22°C; ciclo claro-escuro de 12h e alimentados, após desmame, com dieta padrão *ad libitum*.

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 em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, protocolo nº 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 foi realizado o acompanhamento do ciclo estral das ratas, durante dois ciclos completos, utilizando o esfregaço vaginal realizado no período da manhã. Após o acompanhamento do ciclo estral das ratas, os animais que apresentavam o ciclo fisiológico com as 4 fases bem determinadas, e que estava na fase do ciclo fértil, foram então separados.

As ratas foram colocadas para acasalamento em sistema de harem (três fêmeas para cada macho), sendo a gravidez constatada pela presença de espermatozóides no conteúdo do esfregaço vaginal. A partir deste momento, as ratas grávidas foram colocadas separadamente e acompanhadas durante todo o período de gestação e lactação, ambas com duração de 21 dias. Após o nascimento, foram mantidos no máximo 6 filhotes machos por ninhada, ou completado o número com fêmeas, sendo os mesmos separados da mãe no final da

lactação. Optamos por utilizar apenas a prole masculina, pois dados da literatura mostram que as fêmeas submetidas ao bloqueio do AT₁ da ANGII durante a nefrogênese desenvolvem lesões renais menos proeminentes do que os machos em situação similares (Loria e cols 2007).

O losartan (All Chemistry, Brasil) foi administrado em substituição à água no bebedouro e a Vitamina D (calcitriol – Abbott) foi administrada através de *mini-osmotic pump (Model 2004 alzet)* implantados na região dorsal do animal via subcutânea. Estudos anteriores mostraram que quando implantados nessa condição esse mini-pump libera 0,25 µl/h. Essa informação foi utilizada para a determinação da quantidade de Vitamina D administrada durante o período experimental.

Após o nascimento, a prole foi dividida em 2 grupos cada. Os filhotes de mães que foram tratadas com solução de sacarose a 2% (solvente do losartan) em substituição à água durante os 21 dias de lactação (n=36) e de mães tratadas com losartan (All Chemistry, Brasil, 100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2% e protegido da luz (devido a sua fotossensibilidade), em substituição à água durante os 21 dias de lactação (n=48). Após a lactação, os animais passaram por um período de adaptação, para minimizar o estresse da separação da mãe, que teve duração de 4 dias e em seguida subdivididos em 4 grupos:

Grupo1 Sacarose: Filhotes de mães tratadas com solução de sacarose a 2% (solvente do losartan) em substituição à água durante os 21 dias de lactação (n=18) e que receberam solução salina por 4 semanas (6 ng/dia, *mini-osmotic pump Model 2004 alzet*), após a lactação.

Grupo2 Sacarose+Vit.D: Filhotes de mães tratadas com solução de sacarose a 2% (solvente do losartan) em substituição à água durante os 21 dias de lactação (n=18) e que receberam Vit. D (calcitriol – Abbott) por 4 semanas (6 ng/dia, *mini-osmotic pump Model 2004 alzet*), após a lactação.

Grupo3 Losartan: Filhotes de mães tratadas com losartan (All Chemistry, Brasil, 100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2% e protegido da luz em substituição à água durante os 21 dias de lactação e que receberam solução salina por 4 semanas (6 ng/dia, *mini-osmotic pump Model 2004 alzet*). (n=20), após a lactação.

Grupo Losartan+Vit.D: Filhotes de mães tratadas com losartan (All Chemistry) (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose 2% e protegido da luz em substituição à água

durante os 21 dias de lactação e que receberam Vit. D (calcitriol - Abbott) por 4 semanas (6ng/dia, *mini-osmotic pump Model 2004 alzet*). (n=28), após a lactação.

Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental.

O losartan é o bloqueador mais utilizado na prática clínica e em pesquisas experimentais e clínicas para estudos dos efeitos da All, embora existam diversos bloqueadores do AT1 no mercado (Xu e cols 2009).

As doses do losartan utilizadas no presente estudo foram semelhantes às utilizadas em estudos de Stewart e cols 2005, Balbi e cols 2008 e Marin e cols 2013. No caso da Vit. D, tanto a dose como a via de administração foi baseada em estudos de Panichi e cols 2001 e Kuhlmann e cols 2004.

Estudos sobre a toxicidade do losartan no desenvolvimento renal e na fertilidade em ratos tem mostrado que, ratas lactantes que recebem losartan na dose de 100 mg/kg/dia apresentam uma moderada toxicidade, suficiente para ocasionar mudanças morfológicas, contudo não provoca grandes alterações no ganho de peso materno e na mortalidade dos filhotes. O losartan foi detectado no leite materno em uma concentração próxima a metade da concentração do plasma materno em 75 % das ratas após a administração dessa dose (Spence e cols 1996).

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

As mães foram acompanhadas do início ao final da gestação e lactação, enquanto que o peso corporal nas proles foi avaliado do nascimento aos 60 dias de idade.

A ingestão de líquidos e o consumo de ração foram avaliados nas ratas gestantes entre o 7º e 15º dia, enquanto que no período de lactação a ingestão hídrica foi avaliada diariamente para a preparação das soluções Sacarose/Losartan. Nas proles essa avaliação foi realizada entre os dias 40º e 46º de idade.

4.4 Pressão Arterial sistólica (PAS)

A PAS foi determinada nos animais adultos com 60 dias idade de maneira indireta por pletismografia de cauda (CODA *Non-Invasive Blood Pressure system*, Kent Scientific Corporation, 2010). Os animais foram previamente ambientalizados no aparelho nos 3 dias que antecederam a realização da avaliação da pressão. Para realização da determinação da PAS, os animais tiveram a cauda previamente aquecida no próprio aparelho e em seguida, submetida à mensuração da PAS, utilizando-se um manguito colocado diretamente na cauda destes animais. Foram realizadas 12 determinações por animal e utilizado o valor médio para cada animal (**Figura 5**).

Figura 5. Sistema utilizado para a determinação da PAS por pletismografia de cauda (CODA *Non-Invasive Blood Pressure system*, Kent Scientific Corporation, 2010).

4.5 Carga excretada de albumina

A excreção de albumina foi avaliada nas amostras de urina coletadas em gaiolas metabólicas por um período de 24 h. As amostras foram conservadas com azida sódica à temperatura de -20°C. O método de dosagem foi o eletroimunoensaio em gel de agarose desenvolvido por Laurell 1972 e adaptado por Coimbra e cols 1983. Foram utilizados, neste procedimento, o anticorpo anti-albumina de rato, soluções padrões contendo 0,04; 0,06 e 0,10 mg/ml de albumina, agarose tipo II Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA e tampão tris-acetato, pH 8,6.

4.6 Avaliação da função renal

Amostras de 24 h de urina foram coletadas dos animais de 60 dias de idade em gaiolas metabólicas para avaliação da função renal. A dosagem da creatinina plasmática foi realizada por um método colorimétrico (Kit Labtest Diagnóstica S.A) utilizando como cromógeno o ácido pícrico (Henry e cols 1974).

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

4.7 Quantificação do TGF- β e MCP-1 nas amostras de urina

Foram coletadas amostras de urina por canulação da bexiga. A urina foi tratada imediatamente com 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil; Sigma-Aldrich). A quantificação do TGF- β e MCP-1 (*Transforming growth factor β*) e (*monocyte chemoattractant protein -1*) urinário foi feita por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando kits da Promega e Pierce, respectivamente

(Promega Corporation, Madison, MO, USA e Pierce, Rockford, USA). Os valores de TGF- β e MCP-1 nas amostras de urina foram expressos em picograma (pg) de TGF- β ou MCP-1/mg de creatinina.

4.8 Processamento do tecido renal para microscopia de luz, preparo dos cortes e coloração com Tricrômio de Masson

Após a avaliação da função renal os animais foram anestesiados com tiopental sódico. Os rins esquerdos foram retirados para o processamento histológico e imunoistoquímico, fixados em solução de methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%), por 24 horas e, posteriormente conservado em álcool 70%, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em água corrente e processados para histologia (Junqueira; Carneiro, 2008) desidratados em álcool etílico e com diafanização em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) em 3 banhos de 40 min cada para posterior impregnação (embebição) e inclusão em Histosec® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) fundidos na estufa a 60°C. **(Figura 6)**

Figura 6: A) Diferentes concentrações de álcool etílico e xilol utilizados nos processos de desidratação e diafanização do tecido renal. B- E) Etapas de inclusão da peça em parafina.

Cortes de 3 μ m de espessura, obtidos em micrótomo (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha) foram realizados e colocados sobre lâminas convencionais (Luna

1968). Em seguida foram corados pela técnica de Tricrômio de Masson. Os tratamentos (realizados em um único dia) consistiram de: três banhos em xilol por 15 min cada, para desparafinizar os cortes; três banhos em etanol absoluto de 5 min cada; um banho em etanol 70% de 5 min, para hidratar a amostra; lavagem em água corrente por 10 min; um banho em corante hematoxilina de Groat por 10 min; lavagem em água corrente por 5 min; um banho em água acetificada 1, em seguida foi colocado em banho contendo ácido fosfomolibdico 10%, lavado em água acetificada 1% novamente, imerso em verde luz por 13 min, lavado em água acetificada 1%, e por fim desidratação passando rapidamente pelos álcoois, clarificação e montagem com bálsamo.

4.9 Estudo histológico e morfométrico

Os cortes histológicos (3 μm de espessura) que foram corados com Tricrômio de Masson foram examinados sob microscopia de luz. As lesões tubulointersticiais do córtex renal foram avaliadas pela quantificação da área intersticial relativa no córtex renal em trinta campos consecutivos (0,1mm² cada) de cada rim. Os resultados foram expressos como porcentagem da área total do córtex. A área intersticial foi circundada manualmente e, em seguida, determinada por morfometria computacional (Axion versão 4.8.3, Zeiss, Alemanha). Os valores médios por biópsia em relação à área total do córtex foram calculados.

A avaliação morfométrica também foi realizada das áreas correspondentes aos tufo glomerulares de 50 glomérulos por lâmina de tecido renal em campos consecutivos. As imagens obtidas à microscopia de luz comum foram captadas por meio de vídeo-câmara e transmitidas ao computador, sendo analisadas também pelo programa (Axion Zeiss 4.8.3). A frequência de distribuição da porcentagem de glomérulos de acordo com a área glomerular também foi avaliada.

4.10 Análise imunoistoquímica

O rim esquerdo foi retirado e foi realizado 2 cortes transversais na região do hilo renal (5 mm de espessura) que, em seguida foram imersos em solução de methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante 24 horas. Após esse período, a solução foi substituída por álcool 70%. O tecido renal foi embebido em parafina, cortado em secções de 3µm, desparafinizado e os cortes inicialmente incubados com os seguintes anticorpos primários:

- **Anti-vimentina:** monoclonal (Dako A/S, Dinamarca), incubação à 60 min em temperatura ambiente (1/500). As células tubulares em condições normais só expressam vimentina quando estão proliferando ou diferenciando. Portanto, a presença da reação para vimentina nas células dos túbulos renais é sugestiva de lesão tubular recente ou falta de diferenciação das células dos túbulos renais durante o desenvolvimento renal.
- **Anti-alfa actina de músculo liso** (Alpha- Smooth-muscle Actin α -SMA): monoclonal (Dako A/S, Dinamarca), *overnight* à 4° C (1/1000). Componente do citoesqueleto das células dos músculos lisos dos vasos renais. As células intersticiais, tubulares e mesangiais só expressam α -SMA quando estão em fase de diferenciação ou transdiferenciação. Nessas condições são potencialmente capazes de proliferarem e produzirem vários tipos de colágenos e outros componentes da matriz extracelular.
- **Anti-fibronectina:** (1/500), policlonal (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA), incubação *overnight* à 4° C. Um dos principais componentes da MEC cujo aumento está relacionado com fibrose renal que pode ser consequência do distúrbio do desenvolvimento renal.
- **Anti-ED1:** (1/1000), monoclonal (Serotec, EUA), incubação por 60 minutos à temperatura ambiente. Esse anticorpo reage com antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos que estão aumentados durante o processo inflamatório.

- **Anti-PCNA:** (1/1000), monoclonal (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), incubação por 60 minutos à temperatura ambiente. Esse anticorpo reage com antígenos presentes no núcleo de células durante a fase de proliferação.
- **Anti angiotensina II:** (1/500), policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), incubação *overnight* à 4° C.
- **Anti-pJNK:** (1/1000), monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), incubação *overnight* à 4° C. O p-JNK é ativado por citocinas, AII e estresses celulares, e está relacionado com a inflamação e apoptose.
- **Anti p-p38:** (1/1000), monoclonal (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), incubação *overnight* à 4° C, está relacionado com a inflamação, inibição do crescimento celular e apoptose.

Os cortes foram lavados com PBS e incubados em seguida, com anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulina G (IgG) de camundongo (nos casos de anticorpos primários monoclonais) ou de coelho (para os anticorpos primários policlonais). O produto da reação foi detectado com o sistema avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e a coloração desencadeada pela adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, EUA), na presença de água oxigenada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primários e secundários com solução de PBS, contendo albumina bovina (1%). Os controles negativos foram feitos, substituindo o anticorpo primário por IgG de camundongo (monoclonal) ou IgG de coelho (policlonal) em concentrações equivalentes, e a contracoloração foi realizada com *methylgreen* ou hematoxilina de Harris.

A avaliação dos resultados da imunorreação para as células ED-1, PCNA, ANG II, p-38 e p-JNK positivas por glomérulo ou por área do córtex renal medindo (0,1mm² cada) foi realizada pela contagem do número médio de células positivas por campo e por glomérulo para cada animal. A avaliação das demais imunorreações foi realizada determinando um escore médio por área de córtex renal (0,1mm² cada) ou por glomérulo, para cada animal, utilizando escores que refletiam a extensão da área marcada, sendo atribuído um escore de 0 a 4, como ilustrado na **figura 7** abaixo. Foram avaliados 30 campos consecutivos do córtex renal.

<u>Escores</u>	Análise imuno-histoquímica (Kliem e cols 1996)
0,0	0% a 5% da área
1,0	Entre 5% a 25 % da área
2,0	Entre 25% a 50 % da área
3,0	Entre 50% a 75 % da área
4,0	Entre 75% a 100 % da área

Figura 7. Escores utilizados para análise imuno-histoquímica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls foi utilizada para as variáveis cujos dados apresentavam-se normais e os resultados foram expressos como média e desvio padrão, para os que não apresentaram distribuição normal (escore, albuminúria) foi utilizado teste não paramétrico (Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn) e expressos como mediana e percentis (25-75%). Para avaliar o peso nos grupos controles e experimentais ao longo do tempo, utilizamos medida de variância ANOVA THREE WAY. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa STATISTICA versão 10 (StatSoft, Tulsa, EUA). Os gráficos foram construídos utilizando GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, EUA). O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

As ratas tiveram uma ninhada média de $13,83 \pm 2,98$ filhotes, sendo 54,6 % machos e apresentaram no final da gestação um ganho médio de peso corporal de $164,79 \pm 44,65$ gramas. Não houve diferença na variação no consumo de ração e na ingestão de líquidos, entre os grupos durante os 21 dias de lactação (tabela 1).

Tabela 1. Volume de líquido e consumo de ração durante a lactação por ratas submetidas à ingestão de solução sacarose a 2 % ou de losartan (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose a 2 %: em substituição a água no bebedouro. Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão da média.

GRUPOS	Volume ingerido (mL/24 h)	Consumo ração (g/24 h)
Sacarose	$86,23 \pm 3,18$ (n=8)	$46,23 \pm 6,34$ (n=8)
Losartan	$80,72 \pm 5,60$ (n=10)	$43,72 \pm 3,20$ (n=10)

6.1 Avaliação da mortalidade, peso corporal, ingestão de líquidos e ração das proles dos diferentes grupos

Os dados da tabela 2 mostram um aumento da mortalidade dos filhotes no grupo cuja mãe recebeu losartan durante a lactação.

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade de filhotes das ratas submetidas à ingestão de solução sacarose a 2 % ou com losartan (100 mg/kg/dia) diluído em sacarose a 2 %, em substituição a água no bebedouro durante os 21 dias de lactação.

Animais	Total	Mortalidade	
		n°	%
Sacarose	36	3	8
Losartan	48	9	19

A análise do ganho de peso corporal do nascimento até os 21 dias de idade, durante cada semana no período de lactação evidenciou que a partir do final da segunda semana as proles das mães que receberam losartan tiveram um ganho corporal menor do que as do grupo controle sacarose, essa diminuição foi observada até o final da lactação (**Figura 8**).

Figura 8. Peso corporal em gramas, do nascimento ao final da lactação das proles de mães que receberam sacarose a 2% (controle) e proles de mães que receberam losartan (100 mg/kg/dia). Resultados estão expressos em média e desvio padrão da média * $p < 0,05$ vs controle.

Não foi observada mortalidade nos grupos entre o 21º dia (final lactação) e o 60º dia de idade.

Os animais dos grupos expostos ao losartan na lactação apresentaram aumento do volume de líquido ingerido no período avaliado (40 a 46 dias de idade) o grupo exposto ao losartan e que recebeu tratamento com Vit.D apresentou uma redução nesse aumento. Não ocorreu diferença entre os grupos no consumo de ração (tabela 3) e no peso corporal (tabela 4) nos períodos avaliados após a lactação (30, 45 e 60 dias).

Tabela 3. Volume de líquidos ingeridos (VL) e consumo de ração (g/24 h) nas proles dos diferentes grupos, entre os dias 40 e 46 de idade. Sacarose (solução sacarose a 2%), Sac+Vit D (solução sacarose a 2% e Vit.D 6 ng/dia), Losartan (losartan, 100mg/kg/dia diluído a sacarose 2%), Los+Vit D (losartan (100 mg/kg/dia diluído em sacarose a 2% e Vit.D 6 ng/dia). O tratamento com losartan foi realizado durante os 21 dias de lactação e o com a Vit.D nas 4 semanas seguintes. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. ***p<0,001 vs Sacarose; ###p<0,001 vs Sac+Vit D; §p<0,05 vs Los.

GRUPOS	VL (mL/24h)	Consumo ração (g/24h)
Sacarose	53,24 $\pm$ 1,69 (n=12)	40,23 $\pm$ 0,89 (n=11)
Sac+Vit D	47,95 $\pm$ 2,88 (n=14)	42,76 $\pm$ 0,23 (n=9)
Losartan	77,82 $\pm$ 1,94***,### (n=18)	39,32 $\pm$ 0,76 (n=12)
Los+Vit D	67,66 $\pm$ 3,21**,##,§(n=15)	37,45 $\pm$ 0,34 (n=14)

Tabela 4: Peso corpóreo das proles controles: tratadas com sacarose ou sacarose+Vit.D e experimentais: tratadas com losartan ou losartan+Vit.D Sacarose (solução sacarose a 2%), Sac+Vit D (solução sacarose a 2% e Vit. D 6 ng/dia), Losartan (losartan 100mg/kg/dia, diluído a sacarose 2%), Los+Vit.D: (losartan 100mg/kg/dia, diluído a sacarose 2% e Vit.D 6 ng/dia). O tratamento com losartan foi realizado durante os 21 dias de lactação e o tratamento com a Vit.D nas 4 semanas seguintes. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média.

Animais	30 dias	45 dias	60 dias
Sacarose	122, 89 $\pm$ 6,87 (n=11)	269,67 $\pm$ 12,88 (n=13)	411,12 $\pm$ 7,45 (n=12)
Sac Vit D	125,73 $\pm$ 7,33 (n=13)	272, 42 $\pm$ 7,38 (n=11)	391,19 $\pm$ 6,40 (n=11)
Losartan	109,89 $\pm$ 3,98 (n=15)	258,33 $\pm$ 5,71 n=(12)	389,72 $\pm$ 6,45 (n=12)
Los Vit D	115,56 $\pm$ 2,88 (n=13)	269,67 $\pm$ 7,32 (n=12)	385,10 $\pm$ 5,49 (n=14)

6.2 Avaliação da Pressão Arterial (PAS)

A figura 9 mostra os resultados da PAS nos animais dos diferentes grupos avaliados aos 60 dias de idade. Foi observado um aumento na PAS foi observado nos animais expostos ao losartan durante o período da lactação. O tratamento com Vit.D durante 4 semanas, introduzido logo após o final da lactação atenuou o aumento da PAS induzido pelo losartan.

Figura 9: Pressão arterial sistólica (mmHg) aos 60 dias de idade das proles Sac: (sacarose a 2% na lactação), Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit. D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), Los+Vit.D (losartan 100mg/kg/dia durante a lactação e Vit. D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). ***P<0,001 vs SAC, ###P<0,001 vs SAC + VIT.D, \$\$\$P<0,001 vs LOS.

6.3 Estudos de função renal das proles dos diferentes grupos

A exposição ao losartan durante a fase de lactação provocou um aumento do volume urinário e uma redução da osmolalidade urinária. O tratamento com Vit.D introduzido logo após o término da lactação, não interferiu nessas alterações provocadas pelo losartan.

Tabela 5. Volume e osmolalidade urinária das proles controles: Sacarose e Sacarose+Vit D e das tratadas com losartan ou losartan+Vit.D, aos 60 dias de idade. Uosm=osmolalidade urinária. Sacarose (solução sacarose a 2%, Sac+Vit.D (solução sacarose a 2% e Vit.D 6 ng/dia), Losartan (losartan 100mg/kg/dia diluído em sacarose 2%, Los+Vit.D (losartan 100mg/kg/dia diluído a sacarose 2% e Vit.D 6 ng/dia). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão da média. ***p<0,001 vs Sac; ##p<0,01 e ###p<0,001 vs Sac+Vit.D.

Grupos	Volume Urinário (ml/24)	Uosm (mOsm/kgH ₂ O)
Sacarose	14,50 ± 0,79 (n=9)	1578,00 ± 75,11 (n=9)
SAC+Vit.D	13,88 ± 1,66 (n=8)	1612 ± 121,00 (n=8)
Losartan	45,87 ± 3,21***, ### (n=10)	703,11 ± 24,76***, ### (n=12)
Losartan+Vit.D	40,61 ± 3,21***, ### (n=11)	791,48 ± 31,90***, ### (n=13)

A tabela 6 apresenta os resultados dos parâmetros de função renal dos animais ao final do período experimental. Nos animais expostos ao losartan durante o período de lactação houve redução da TFG e aumento das frações de excreção de sódio e potássio em relação aos grupos controles que só receberam sacarose ou sacarose e Vit.D. O tratamento com Vit.D iniciado logo após o final da lactação atenuou as alterações observadas nas excreções fracionais de sódio e potássio nas proles expostas ao losartan.

Tabela 6: Taxa de filtração glomerular (TFG); fração de excreção de sódio (FE_{Na}) das proles controles (Sacarose) e Sacarose+Vit.D (Sac+Vit.D 6 ng/dia) e das tratadas com losartan (losartan 100 mg/kg/dia diluído em sacarose 2%) ou losartan+Vit.D (Los+Vit.D, losartan 100 mg/kg/dia diluído em sacarose a 2% e Vit.D 6 ng/dia). Dados expressos em média $\pm$ e erro padrão da média ou mediana (25%; 75%) para FE. $p^* < 0,05$ e $p^{**} < 0,01$ vs Sacarose; e $p^{###} < 0,01$ vs Sac Vit.D; $p^{<\$} < 0,05$ vs Losartan.

Animais	TFG (ml/100g)	FE_{Na} (%)	FE_{K+} (%)
Sacarose	0,88 $\pm$ 0,07 (n=8)	0,15 (0,08;0,31) (n=10)	27,23 (21,32;36,12) (n=7)
Sac+Vit.D	0,89 $\pm$ 0,04 (n=9)	0,14 (0,11;0,31) (n=7)	34,32 (28,32; 58;66) (n=8)
Losartan	0,56 $\pm$ 0,12 ^{*,#} (n=12)	0,55 (0,34;0,85) ^{**,##} (n=12)	88,12 (44,93; 114,45) ^{**} (n=11)
Los+Vit.D	0,77 $\pm$ 0,16 ^{*,#,\$} (n= 14)	0,43 (0,37;0,87) ^{*,#,\$} (n=10)	79,45 (36,78;105,07) ^{*,#,\$} (n=9)

Os animais expostos ao losartan apresentaram aumento da albuminúria em relação aos controles, sendo que essa alteração foi atenuada pelo tratamento com Vit. D, como observado na figura 10.

Figura 10. Excreção urinária de albumina nos animais dos grupos controles e experimentais. Sac: (sacarose a 2% na lactação), Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. *** $p < 0,001$ vs Sac; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs Sac Vit.D, §§§ $p < 0,001$ vs Los.

6.4 Análise histológica e morfométrica

A área glomerular nos cortes do tecido renal, corados com Tricrômio de Masson, foi avaliada por morfometria dos rins dos animais com 60 dias de idade em todos os grupos. A figura 11 abaixo mostra os resultados referentes à frequência de distribuição dos glomérulos de acordo com suas áreas em ambos os grupos. Nos grupos controles obtivemos um gráfico de frequência que mostra uma distribuição normal (curva de Gauss) da área glomerular. Enquanto que, os animais do grupo Losartan apresentaram um aumento da porcentagem de glomérulos com áreas menores em relação os grupos controles, uma distribuição não Gaussiana (Figuras 12 A e B). Essa alteração foi menor no grupo Losartan+Vit.D. Observamos uma alta frequência de glomérulos com área glomerular menor que $4500\mu\text{m}^2$ nos animais do grupo losartan que corresponde a cerca de 23% do total de glomérulos avaliados e

os do grupo Losartan+Vit.D 17%. Enquanto nos grupos controles a frequência de glomérulos com essas áreas foi cerca de 8%. Os animais do grupo Losartan apresentaram também um maior número de glomérulos maiores (hipertrofiados) (Figuras 11 A e B e 12 A e B). Foi analisada também a área glomerular média dos diferentes grupos (Figura 12 B). A área glomerular média foi de $7.900 \mu\text{m}^2 \pm 467,18 \mu\text{m}^2$ no grupo Sacarose; $7.789 \mu\text{m}^2 \pm 321,11 \mu\text{m}^2$ no grupo Sacarose+Vit.D; $4.917 \mu\text{m}^2 \pm 213 \mu\text{m}^2$ no grupo Losartan; $5.946 \mu\text{m}^2 \pm 231 \mu\text{m}^2$ no grupo Losartan + Vit.D. A figura 13 B abaixo demonstra os resultados dessa avaliação.

Figura 11. A: Cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson mostrando a distribuição da área glomerular nos grupos controle, Sac+Vit.D, Los e Los+ Vit.D. A população de glomérulos menores (observar seta) é evidenciado no grupo losartan. **B:** gráfico de distribuição de frequência das áreas glomerulares nos grupos. Distribuição não Gaussiana é observada no grupo losartan, pode-se observar uma subpopulação de glomérulos menores em Los (n= 12/grupo) e Los+Vit.D (n=13/grupo).

Figuras 12 A e B: O gráfico na figura 12 A mostra a porcentagem de distribuição das subpopulações de glomérulos com diferentes áreas nos grupos controles e experimentais. A subpopulação de glomérulos menores (hipotróficos) é maior nos animais tratados com losartan que apresentaram também uma subpopulação aumentada de glomérulos maiores, sugerindo uma hipertrofia compensatória. Essas alterações foram atenuadas pelo tratamento com Vit.D. A figura 12 B mostra a área glomerular média dos grupos controles e experimentais. Os grupos tratados com losartan apresentaram uma área menor. Contudo, o tratamento com losartan atenuou essa alteração. Sac: (sacarose a 2% na lactação), Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Resultados estão expressos em média e desvio padrão da média ***p<0,001 vs Sac; e ###p<0,001 vs Sac+Vit.D, §p<0,01 vs Los.

A análise histológica dos animais com 60 dias de idade (figura 13) evidenciou também um aumento da área intersticial no córtex renal com presença de infiltrado inflamatório, edema e fibrose nos animais tratados com losartan. Os resultados do estudo morfométrico (figura 13 E) mostraram que houve aumento da

área intersticial relativa em ambos os grupos tratados com losartan, porém com menor intensidade no grupo losartan + Vit.D

Figuras 13 A, B, C, D e E. Cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson representativos dos grupos controles e experimentais. A) Sac: (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Notar que as lesões túbulo-intersticiais são mais intensas em (C) do que em (D). Barra indicam 20 μ m. Os resultados da figura E estão expressos em média e desvio padrão da média *** $p < 0,001$ vs Sac; e ### $p < 0,001$ vs Sac+Vit.D, \$\$ $p < 0,01$ vs Los.

6.5 Análise imunoistoquímica

A figura 14 mostra a imunolocalização na medula renal da α -SMA, um marcador específico para antígeno presente nas paredes dos vasos, analisada, no grupo controle em que os animais apresentam uma distribuição de marcação para α -SMA homogênea na região dos vasos renais. Essa distribuição está alterada nos animais que receberam losartan no período de lactação, evidenciando um distúrbio na organização dos vasos retos, que estão também bastante reduzidos.

Figuras 14 A, B, C e D: Fotomicrografia da medula renal de animais do grupo controle (A e C) e de animais que receberam losartan durante lactação (B e D), em menor (A e B) e em maior aumento (C e D). Observa-se em B e D, a alteração morfológica dos capilares com uma diminuição do número.

A análise imunoistoquímica para α -SMA no córtex renal (figura 15) evidenciou uma intensa marcação nos compartimentos intersticiais e na região parietal glomerular, nos animais expostos ao losartan e esse aumento foi reduzido nos animais do grupo que receberam Los+Vit.D. Nos animais controles, a expressão de α -SMA esteve restrita aos vasos retos da medula renal, aos vasos do córtex e às paredes das artérias e arteríolas pré-glomerulares.

Figuras 15. A, B, C e D Imunolocalização e **15 E e F** escore para (α -SMA) no córtex renal, dos animais dos grupos controles e experimentais. A) Sac: (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Notar que a marcação nos grupos controles (A e B) está restrita apenas às paredes das arteríolas, enquanto que no grupo losartan (C) a marcação está presente também no compartimento túbulo intersticial e parietal glomerular. Observar que no grupo Los+Vit.D em D há uma redução na marcação para (α -SMA) no compartimento túbulo intersticial e nas células do epitélio parietal da cápsula de Bowman. Figuras 16 E e F: Escores para α -SMA no compartimento túbulo intersticial e no epitélio parietal da cápsula de Bowman. Resultados dos escores estão expressos em mediana e percentis na Figura (E) $^{**}p<0,001$ vs Sac; e $^{##}p<0,001$ vs Sac+Vit.D, $^{\$}p<0,01$ vs Los. Figura (F) $^{***}p<0,001$ vs Sac; e $^{##}p<0,001$ vs Sac+Vit.D, $^{\$}p<0,01$ vs Los.

A análise imunoistoquímica realizada para detectar antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos (ED-1) para avaliação do processo inflamatório nos rins desses animais (figura 16) mostrou a presença de infiltrado intersticial de macrófagos tanto na região glomerular como túbulo intersticial nos animais tratados com losartan no período de lactação. O tratamento com Vit.D após o período de lactação foi capaz de atenuar o processo inflamatório nos rins desses animais (Figuras 17 A, B, C, D, E e F).

Figuras 16 A, B, C, D, - Imunolocalização e **16 E e F** quantificação de células ED1-positivas (macrófagos) no compartimento túbulo-intersticial no córtex renal dos grupos controles e experimentais. A) Sac (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Os resultados das quantificações de macrófagos (E) estão expressos como média e desvio padrão da média *** $p < 0,001$ vs Sac; e ### $p < 0,001$ vs Sac+Vit.D, § $p < 0,05$ vs Los e em F *** $p < 0,001$ vs Sac; e ### $p < 0,001$ vs Sac+Vit.D, §§§ $p < 0,001$ vs Los.

A imunolocalização para PCNA, um marcador de proliferação celular, no córtex renal, representada na figura 17, revelou uma aumento da marcação nas células glomerulares e túbulo-intersticiais do córtex renal nos animais dos grupos

losartan comparado com os controles. O tratamento com Vit.D nos animais expostos ao losartan reduziu o aumento dessa marcação.

Figuras 17 A, B, C e D: Imunolocalização e **17 E e F** quantificação dos grupos controles e experimentais para PCNA. A) Sac: (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Em **E** os resultados da quantificação expressos em média e desvio padrão da média *** $p < 0,001$ vs SAC; e #### $p < 0,001$ vs Sac+Vit D, §§§ $p < 0,001$ vs Los. Em **F** *** $p < 0,001$ vs Sac; e #### $p < 0,001$ vs Sac+Vit.D, § $p < 0,05$ vs Los.

A figura 18 ilustra a imunomarcação para vimentina no córtex renal dos animais dos grupos controles e experimentais. Observar que nos grupos controles a

marcação esta restrita às células epiteliais dos glomérulos renais, enquanto que nos animais tratados com losartan há uma intensa marcação nas células intersticiais e dos túbulos renais. Nos animais expostos ao losartan e tratados com Vit.D ocorreu uma atenuação da expressão desse marcador quando comparados com os expostos ao losartan não tratados com Vit.D.

Figuras 18 A, B, C e D: imunolocalização e escore **18 E** no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal dos grupos controles e experimentais para vimentina. A) Sac: (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit. D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Resultados estão expressos na **Fig. E** como mediana e percentis *** $p < 0,001$ vs Sac; e ### $p < 0,001$ vs Sac+Vit.D, § $p < 0,05$ vs Los.

Os resultados da imunolocalização para fibronectina no córtex renal estão apresentados na figura 19. Foi observado um aumento da marcação de fibronectina na região glomerular e túbulo-intersticial do córtex renal dos animais que receberam losartan durante a lactação, quando comparados com os grupos controles, e que foi menos intensa no grupo que recebeu tratamento com Vit.D.

Figuras 19 A, B, C, D: imunolocalização e escore **19 E e F** no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal e dos glomérulos dos grupos controles e experimentais para fibronectina. A) Sac: (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit. D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação) Em **E** os resultados estão expressos em mediana e percentis ** $p < 0,01$ vs Sac; e ## $p < 0,01$ vs Sac+Vit.D, § $p < 0,05$ vs Los. Em **F** *** $p < 0,001$ vs Sac; e ### $p < 0,001$ vs Sac+Vit.D, § $p < 0,05$ vs Los.

Os animais do grupo losartan apresentaram um aumento no número de células positivas para All no interstício renal, esse aumento foi menor no grupo losartan+vitamina D. Observar nos grupos controles a marcação restrita de All às arteríolas glomerulares.

Figuras 20 A, B, C, D: Imunolocalização e quantificação **20 E** no córtex renal dos animais dos grupos controles e experimentais para All. A) Sac: (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Em **E** os resultados estão expressos em média e desvio padrão da média ***p<0,001 vs Sac; e ###p<0,001 vs Sac+Vit.D, §§p<0,01 vs Los.

A imunorreação para a MAPK p-JNK (figura 21 abaixo) evidenciou que a expressão de p-JNK está aumentada no córtex renal dos animais tratados losartan comparados com os controles, e que o tratamento com vitamina D atenuou esse aumento na região túbulo-intersticial do córtex renal.

Figuras 21 A, B, C e D- Imunolocalização, **21 E** escore dos grupos controles e experimentais para p-JNK. A) Sac: (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Em **E** os resultados estão expressos em mediana e percentis ***p<0,001 vs Sac; e ###p<0,001 vs Sac+Vit.D, §§p<0,01 vs Los.

Os resultados da expressão para p-p38 MAPK no córtex renal estão apresentados na figura 22. Um aumento para células positivas p-p38 foi detectado no córtex renal dos animais do grupo losartan em comparação com os controles. A administração de Vit.D após o período de lactação reduziu o aumento da marcação para p-p38 induzido pela exposição ao losartan.

Figuras 22 A, B, C, D: Imunolocalização e quantificação **22 E** no córtex renal dos animais dos grupos controles e experimentais para p-38. A) Sac (sacarose a 2% na lactação), B) Sac+Vit.D (sacarose 2% na lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação), C) Los (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação), D) Los+Vit.D (losartan 100 mg/kg/dia durante a lactação e Vit.D 6 ng/dia por 4 semanas após a lactação). Em **E** os resultados estão expressos em média e

desvio padrão da média ** $p < 0,01$ vs SAC; e ## $p < 0,01$ vs Sac+Vit. D, \$ $p < 0,05$ vs Los.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Estudos realizados em nosso laboratório (Balbi e cols 2008, Marin e cols 2013) e dados da literatura (Friberg e cols 1994, Woods e cols 1998, Machado e cols 2008, Madsen e cols 2010) demonstraram a importância da integridade do SRA para o desenvolvimento renal. No presente estudo analisamos o efeito da administração da Vit.D na sua forma ativa [1,25(OH)₂D] após a lactação, nas proles expostas ao losartan durante o período de lactação, nas alterações de estrutura e função renal induzidas pelo losartan. As ratas lactantes foram acompanhadas durante toda a lactação, não houve diferença na variação de peso corporal, consumo de ração e ingestão de líquidos. O índice de mortalidade das proles de mães expostas ao losartan foi maior até os 21 dias de idade que apresentaram também redução no peso corporal no final da segunda semana que persistiu até o término da lactação. Esses achados estão de acordo com os observados em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (Balbi e cols 2008, Marin e cols 2013) e em estudos de outros pesquisadores (Woods e cols 1998, Spence e cols 1995).

Os animais tratados com losartan apresentaram alterações da função renal caracterizadas pelo aumento do volume e redução da osmolalidade urinária. Essas alterações estavam associadas a malformações nos vasos renais, na região da medula interna, lesão no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal, hidronefrose, redução da área glomerular e da diferenciação dos glomérulos renais. O tratamento com Vit.D reduziu todas essas alterações provocadas pela exposição ao losartan no período de lactação, exceto as de volume, osmolaridade urinária e a hidronefrose. Portanto, a perda do parênquima renal na região da medula e a persistência da hidronefrose devido aos distúrbios do desenvolvimento renal devem ter contribuído para alterações da concentração urinária. Dados da literatura mostram que a All aumenta a capacidade das ramificações do broto uretérico, in vivo, responsável pela formação dos vasos do córtex e medula renal (Losipiv e cols 2003), durante o desenvolvimento do rim. Além disso, a redução das ramificações vasculares irá comprometer a maturação dos vasos renais, promovendo espessamento da parede das arteríolas, e redução de cerca de 50% do parênquima da medula interna (Madsen e cols 2010). A integridade dessas estruturas vasculares e do parênquima da medula renal é fundamental para a concentração urinária.

Diversas observações clínicas e experimentais demonstram também que a exposição aos antagonistas do receptor AT₁ durante o desenvolvimento renal perinatal e/ou neonatal induz distúrbios na estrutura e função renal que persistem na vida adulta. Essas alterações são caracterizadas por uma malformação da microcirculação renal, atrofia da medula interna, dilatação da pelve renal, edema da papila renal, inflamação e fibrose do parênquima renal associadas com a redução do número e da área glomerular (Miyazaki e cols 1998, Madsen e cols 2010, Machado e cols 2008, Balbi e cols 2008, Marin e cols 2013). Os resultados do nosso estudo mostram que o tratamento com a Vit.D reduziu as alterações na diferenciação das células renais e reduziu o processo inflamatório promovendo redução das alterações da estrutura e função renal induzidas pelo losartan. Os animais do grupo losartan que receberam tratamento com Vit.D, apresentam redução do número de macrófagos renais, da área intersticial relativa do córtex renal e aumento da área glomerular média em relação aos tratados apenas com losartan. Esses efeitos associados com a redução das alterações da taxa de filtração glomerular e albuminúria e das frações de excreção de sódio e potássio. As alterações de função e estrutura renais induzidas pela exposição ao losartan durante o desenvolvimento renal foram semelhantes às descritas em estudos clínicos (Seadman e cols 1995, Daikha-Dahmane e cols 2006) e experimentais (Guron e cols 1997, Rasch e cols 1998, Miyazaki e cols 1998, Balbi e cols 2008, Marin e cols 2013).

Nos estudos morfométricos em que avaliamos a frequência de distribuição dos glomérulos de acordo com suas áreas evidenciaram que os animais expostos ao losartan apresentavam uma maior frequência de glomérulos menores (imaturos) em relação aos grupos controles e aos tratados com losartan+Vit.D. A redução da área glomerular nos grupos expostos ao losartan foi observada também por Marin e cols 2013. Esses autores avaliaram morfometricamente a área de glomérulos de animais com 21 dias de idade, expostos ao losartan durante a lactação, e constataram uma maior incidência da subpopulação de glomérulos menores quando comparados aos controles (Marin e cols 2013). Machado e cols analisaram os animais expostos ao losartan na lactação depois de 6 meses de idade, e mostraram uma subpopulação maior tanto de glomérulos maiores quanto de menores. Essas observações sugerem que as alterações no desenvolvimento renal poderiam estar levando a uma hipertrofia glomerular compensatória na vida adulta dos glomérulos mais diferenciados (Machado e cols 2008). Nossos animais avaliados aos 60 dias

apresentaram tanto aumento da subpopulação de glomérulos menores (hipotrofiados) como na dos maiores (hipertrofiados) nos animais expostos ao losartan, indicando a presença de glomérulos pouco diferenciados e da hipertrofia compensatória dos demais. O tratamento com Vit.D logo após o final da lactação foi capaz de reduzir a porcentagem tanto da subpopulação de glomérulos menores como dos maiores o que está de acordo com a hipertrofia compensatória dos glomérulos mais diferenciados observados nos não tratados. A falta de diferenciação de uma parte dos glomérulos foi evidenciada pela presença de marcação para α -SMA nas células desses glomérulos. Nos rins controles a reação para α -SMA no córtex renal ocorre apenas nas paredes das arteríolas (Tufro-McReddie e cols 1994, Marin e cols 2013). Nos animais tratados com losartan+Vit.D a marcação para α -SMA nas células glomerulares foi de menor intensidade. Esses achados estão de acordo com a literatura demonstrando a participação da Vit.D na restauração da diferenciação celular (Brown e cols 2008, Holick MF 2013).

Os nossos resultados de imunoistoquímica, demonstraram também um aumento da expressão de células positivas para α -SMA, no compartimento túbulo intersticial no cortex renal dos animais expostos ao losartan comparado com os controles. Estudos anteriores do nosso laboratório já haviam mostrado que a expressão de α -SMA, uma proteína do citoesqueleto, é mais intensa nas células tanto dos glomérulos como do compartimento túbulo-intersticial durante a fase de desenvolvimento renal (Balbi e cols. 2008). Contudo, em condições patológicas as células mesangiais, tubulares e intersticiais sofrem um processo de transdiferenciação que envolve modificações do fenótipo e função passando a expressar α -SMA e a proliferar e sintetizar mais colágeno e outros componentes da MEC (Ignotz e cols 1987 Johnson, Chen e cols 2004). Portanto, a ativação dessas células em condições patológicas como nos distúrbios do desenvolvimento renal irá provocar deposição de matriz com alargamento do espaço intersticial, redução dos capilares peritubulares ocasionando inflamação, dilatação e atrofia tubular. Esses distúrbios podem progredir para fibrose do parênquima renal com perda da função renal (Eddy e cols 2000, Marin e cols 2013). O estudo de Chen e cols utilizando losartan no período neonatal por apenas 2 dias, mostrou uma supressão na regulação de genes que codificam componentes fundamentais do citoesqueleto e da MEC, que pode provocar uma alteração na formação da MEC e um comprometimento nas interações célula-célula e célula-matriz, ocasionando

distúrbios nos processos de diferenciação e proliferação celular durante o desenvolvimento renal (Chen e cols 2004).

A análise imunoistoquímica com marcação para vimentina, outro marcador de falta diferenciação e de transdiferenciação celular, no compartimento, reforça a presença desses distúrbios nas células intersticiais e dos túbulos renais dos animais expostos ao losartan durante o período de lactação. Em condições normais essa marcação está restrita as células epiteliais dos glomérulos renais e das paredes dos vasos, evidência proliferação que pode ser consequência de lesão celular recente e também ocorre durante o período de desenvolvimento renal (Coimbra e cols 2010, Marin e cols 2013). O aumento da marcação de vimentina observado no nosso estudo, realizado após o desenvolvimento renal, evidenciando proliferação celular e modificações do fenótipo das células tubulares renais estão, portanto, relacionado com os distúrbios do desenvolvimento renal e falta de diferenciação das células tubulares (Marin e cols 2013). Esses resultados, juntamente com as análises da marcação para α -SMA nos rins desses animais, demonstram a falta de diferenciação celular e a contribuição fundamental da AII no desenvolvimento renal. Vários estudos têm mostrado que essa participação ocorre via receptores AT₁ (Madsen e cols 2010). Nos animais expostos ao losartan que receberam tratamento com Vit.D, a expressão desses marcadores (α -SMA e vimentina) foi menos intensa nas células renais, demonstrando a participação da Vit.D na diferenciação celular. Um número expressivo de estudos clínicos e experimentais vem demonstrando nos últimos anos a participação da Vit.D na diferenciação celular e na restauração da diferenciação celular, em células neoplásicas (Dusso e cols 2005, Calton e cols 2015, Gandini e cols 2011, Pereira e cols 2012, Holick MF 2013). A Vit.D ao ligar-se com o seu receptor VDR, formando o complexo Vit.D/VDR, possui ações específicas antes mesmo da diferenciação celular se iniciar. Ela aumenta a expressão e/ou a atividade de várias enzimas da bordadura em escova, tal como a fosfatase alcalina e maltase, induzindo a formação das microvilosidades (Halline e cols 1994, Diaz e cols 2000). Além disso, a Vit.D aumenta a expressão de vários componentes da adesão celular tais como ocludina, zonula de oclusão 1 e 2 (*zonula occludens*) e claudinas 2 e 12 em junções apertadas (*tight junctions*) E-caderina em junções aderentes e plectina em hemidesmosomo que são estruturas essenciais para a diferenciação e manutenção do fenótipo epitelial: (Pálmer e cols 2001, Fujita e cols 2008). Nakamura e cols mostraram a participação da Vit.D também na expressão de proteínas

implicadas na motilidade, adesão e invasão celular, como a *Filamin A, alpha* (FLNA), que possuem funções nucleares na regulação do reparo nuclear e na transição epitélio-mesenquimal EMT. (Nakamura e cols 2011, Yue e cols 2009, Gay e cols 2011).

Vários estudos tem demonstrado que a All tem um papel chave no desenvolvimento pós-natal dos capilares pós-glomerulares e nas ramificações dos vasos retos. Alterações dessas estruturas durante o desenvolvimento renal nos animais expostos ao losartan podem resultar em modificações no fluxo plasmático e perfusão tecidual, com consequente isquemia tecidual (Madsen e cols 2010). Como citado anteriormente nessa discussão, observamos a presença de alterações vasculares principalmente na região da medula interna dos animais que receberam losartan. A redução da perfusão tecidual levando a isquemia do tecido deve estar contribuindo com o processo inflamatório observado no córtex renal desses animais, com inflamação e fibrose do parênquima renal. Séron e cols mostraram a presença de correlação entre a densidade dos capilares tubulares e a perda da função renal em pacientes com doença renal progressiva (Séron e cols 1990). Vários estudos tem mostrado também que o processo inflamatório que ocorre nos rins dos animais tratados com antagonistas de All é mediado pelo menos em parte pelos receptores AT₂ de angiotensina cuja expressão está aumentada nos rins desses animais (Balbi e cols 2008, Yu e cols 2010).

A participação da inflamação em nosso modelo experimental foi analisada no parênquima renal e em amostras de urina por imunoistoquímica e ELISA utilizando diversos marcadores do processo inflamatório. Nós observamos um aumento do processo inflamatório no córtex renal e da expressão de All nos animais expostos ao losartan, que foi atenuado pelo tratamento com Vit.D. Observamos um aumento significativo no número de macrófagos nos glomérulos e na região túbulo-intersticial do córtex renal dos ratos expostos ao losartan. Enquanto que, os animais expostos ao losartan tratados com Vit.D apresentaram uma diminuição desse infiltrado de macrófagos. O aumento do infiltrado e ativação de macrófagos é uma das vias pelas quais a All contribui para os distúrbios de função e estrutura renal em patologias renais (Yamamoto e cols 2011). A redução dessas células inflamatórias e da área intersticial relativa no córtex renal dos ratos tratados com Vit.D estava associada com a diminuição das expressões de MAPK (p-JNK, p-p38) e PCNA, bem como dos níveis urinários de TGF- β e MCP-1 marcadores importantes da inflamação.

Macrófagos quando ativados liberam e estimulam a síntese de citocinas inflamatórias, como o TGF- β que podem exacerbar o processo inflamatório e fibrose observados nos rins desses animais (Yamamoto e cols 2011, Zoja e cols 1998, Maquiaveli e cols 2014). Vários estudos têm demonstrado, nesse modelo experimental, o aumento progressivo do infiltrado de macrófagos e o número de células positivas para All, ambos associados com a progressão das alterações de estrutura e função renal (Machado e cols 2008, Marin e cols 2013). A All pode atuar diretamente no processo inflamatório via receptor AT₂ ou via indireta (ativação do TGF- β ou das MAPKs). Tian e cols em estudo com nefropatia diabética observaram a correlação entre a Vit.D e algumas citocinas inflamatórias (MCP-1 e TGF- β) e a participação da Vit.D ativada [1,25(OH)2D] na *down-regulation* do MCP-1 e TGF- β e *up-regulation* na expressão do receptor da Vit.D (VDR) (Tian e cols 2014). A deficiência da Vit.D tem sido relacionada também com o aumento da intensidade do processo inflamatório em condições patológicas (de Bragança e cols 2016). Diversos trabalhos nos últimos anos evidenciaram o efeito da Vit.D na modulação de diversas citocinas inflamatórias, atenuando a expressão das pró-inflamatórias e aumentando a expressão das anti-inflamatórias (Panichi e cols 2001, Zhang e cols., 2008). Panichi e cols investigaram o papel da Vit.D em modelo de ratos com nefrite mesangial, e observaram que o tratamento com Vit.D reduziu a citocina IL-6, infiltração de macrófagos, apoptose e demonstraram seu efeito anti-proliferativo atenuando a marcação para PCNA, suas atividades anti-inflamatórias, (Panichi e cols 2001) e na diferenciação e proliferação celular e apoptose (Dusso e cols 2005, Calton e cols 2015, Wang e cols 2012, Holick MF 2013). O exato mecanismo que a Vit.D regula a proliferação e diferenciação celular não está bem esclarecido, sabe-se que a Vit.D pode controlar a replicação celular por regulação de genes envolvidos no ciclo celular incluindo p19, p27, p21 e p53 (Saramaki e cols 2006, Holick MF 2008). As proteínas se ligam e inativam o complexo do ciclo dependente de quinase na fase G1, fazendo com que a célula permaneça na fase G1 do ciclo celular. A Vit.D também diminui a degradação da p27, que irá inibir proliferação e migração celular e apoptose. A Vit.D aumenta também a expressão da p21 mantendo o ciclo celular na fase G2/M e interrompendo a apoptose (Saramaki e cols 2006). Essas ações são muito complexas e envolvem mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, podendo atuar também em muitos fatores vias sistemas ciclina/ciclina dependente de quinase (TGF- β , IGFBP3 e EGFR).

A redução da excreção urinária de TGF- β evidência aumento da sua produção renal, o que contribui para a redução da inflamação e lesões túbulo-intersticiais observadas nos ratos que foram expostos ao losartane e receberam Vit.D. O TGF- β urinário origina da biossíntese renal e não do plasma (Freitas e cols 1998, Noh, Wiggins, Phan 1993). A All e o TGF- β em condições patológicas induz o processo de transdiferenciação nas células promovendo distúrbios nos seus fenótipos, que passam a expressar α -SMA e aumentar a produção de colágenos e outros componentes da matriz extracelular (MEC). Nesse estudo observamos o aumento da área intersticial relativa no córtex renal devido à presença de infiltrado inflamatório, proliferação e matriz celular dos ratos expostos ao losartan. Esse aumento foi menos intenso nos animais tratados com losartan+Vit.D e relacionado com a redução da expressão renal de All, p-p38, p-JNK e da excreção urinária de TGF- β e MCP-1. Sanchez e cols observaram também que a Vit.D atua modulando a sinalização dos TLRs (*Toll-like receptors*) inibindo a fosforilação da MAPK p-38 e ativação do NFkB (um mediador importante da inflamação) em macrófagos, levando uma redução na expressão de genes e proteínas inflamatórias e inibindo a expressão de IL-6 TNF α e MCP-1 (Liu e cols 2006, Sanchez e cols 2012).

Várias evidências experimentais mostraram que durante o desenvolvimento renal normal a participação dos receptores AT₁ e AT₂ é fundamental (Norwood e cols 1997, Zhuo e cols 1998, Yu e cols 2010). Diversos estudos indicam que os receptores AT₂ intra-renais são abundantes durante o desenvolvimento renal (fetal) e diminuem logo após o nascimento (Norwood e cols 1997, Ciuffo e cols 1993). A All modula o crescimento, diferenciação e apoptose celular via receptores AT₂. Estes receptores podem contrabalancear os efeitos estimuladores sobre o crescimento da All que são mediados por receptores AT₁ aumentando a apoptose e/ou inibindo o crescimento e diferenciação celular (Johren e cols 2004). O bloqueio do receptor AT₁ pode ocasionar um desequilíbrio entre a proliferação celular e apoptose. Estudos de Balbi e cols mostraram que o aumento da expressão do AT₂ estava relacionado com o aumento de células apoptóticas em ratos expostos ao losartan no período de desenvolvimento renal (Balbi e cols 2013). Marin e cols verificaram uma tendência ao aumento na expressão renal dos receptores AT₂ tanto aos 21 dias como aos 60 dias de idade em ratos expostos ao losartan durante a lactação (Marin e cols 2013).

A pressão arterial sistólica (PAS) estava aumentada nos animais expostos ao losartan na vida adulta no nosso estudo, o que também foi observado por Woods e

cols1998, usando losartan durante 12 dias logo após o nascimento. Esses autores também observaram uma redução no número de glomérulos (42%) e a presença de glomérulos imaturos nos animais expostos ao losartan durante o desenvolvimento pós-natal, quando avaliados na vida adulta. Contudo, Guron e cols utilizando inibidor da ECA (enalapril) em ratos durante o desenvolvimento renal avaliados na vida adulta, não observaram aumento da PAS, e nem redução do número de glomérulos nesses animais (Guron e cols 1997). A razão para essa discrepância, segundo Woods e cols 1998 pode ser pela diferença do modelo experimental, eles utilizaram um bloqueador específico (losartan) por um longo período de tempo nesses animais. O bloqueio de ambas as vias por uma inibição da enzima conversora (ECA) é mais complexo, diferente do bloqueio de um receptor específico que não pode mascarar o papel do outro. Assim, a All pode normalmente promover o crescimento e a diferenciação celular via receptores AT_1 , enquanto que as ações do receptor AT_2 podem retardar o ou inibir este efeito. A diminuição do número de glomérulos pode estar contribuindo com o aumento da PAS na vida adulta (Woods e cols.). O rim possui uma participação fundamental na regulação da PAS há longo prazo (Guyton e cols 1972). Brenner e cols, demonstraram que o risco de desenvolver hipertensão essencial na vida adulta estava inversamente proporcional ao número de nefro ao nascimento (Brenner e cols1988). Dessa forma a incidência de hipertensão é maior na população humana que nasce com malformação renal (Tauchi e cols 1971) Os animais que foram expostos ao losartan e tratados com Vit.D apresentaram uma atenuação do aumento da PAS, que pode estar relacionada com a maior diferenciação dos glomérulos e tubulos renais nesses animais, como observado nesse estudo.

Esse aumento da PAS em nosso modelo pode ser explicado pelo aumento da All também, através do aumento compensatório na síntese de renina, como proposto por Li e cols 2010. A renina é sintetizada, nos rins, pelo gene da renina que cliva o angiotensinogênio em angiotensina I (AI), que será clivada em All para atuar em seu receptor (AT_1), fechando a alça de retroalimentação negativa devido à atividade supressora de AT_1 em relação à expressão gênica de renina. O losartan bloqueando o receptor AT_1 ocasionará uma interrupção nessa alça de retroalimentação negativa, o que levará uma superexpressão do gene da renina. Esse aumento compensatório aumentará a All. A análise imunoistoquímica no córtex renal para All demonstrou um aumento na marcação de All nos animais que foram

expostos ao losartan quando comparados com os controles. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, também demonstraram que proles expostas ao losartan na lactação apresentavam aumento de células positivas para All no compartimento intersticial (Balbi e cols 2008). Com a retirada do losartan logo após a lactação e o aumento compensatório da renina durante esse período de bloqueio, a All estaria agindo em seu receptor AT₁ de forma mais intensa, contribuindo para o aumento da PAS. No presente estudo o grupo que foi exposto ao losartan e que recebeu tratamento com Vit.D demonstrou uma redução na marcação para All, acompanhado de uma atenuação da PAS ocasionado pela exposição ao losartan. O que pode ser explicado em partes com os achados da literatura que demonstram que a Vit.D atua como um regulador negativo da expressão do gene da renina via inibição da transcrição do CREB (*cAMP response element-binding protein*), necessário para a expressão do gene da renina. Isso resultaria na inibição do aumento compensatório desse gene causado pelo losartan (Li e cols 2002, Yuan e cols 2005, Freundliche e cols 2008). Lin e cols estudando nefropatia diabética em modelos experimentais, demonstraram que a Vit.D possui também um efeito supressor na expressão das enzimas ECA e ECA2, evidenciando a ação renoprotetora da Vit.D na modulação do SRA, tendo como seus principais alvos o angiotensinogênio e a renina (Lin e cols 2016).

A excreção urinária de albumina estava aumentada nos animais com 60 dias de idade embora essa alteração tenha sido discreta. A presença de albuminúria foi observada também em estudos anteriores em nosso laboratório. Marin e cols usando losartan no período de lactação observaram aumento da albuminúria nos animais logo após a lactação, sendo mais intensa aos 60 dias de idade (Marin e cols 2013). Esse aumento estava associado com aumento na expressão da desmina na região periférica do tufo glomerular, diminuição do GLEPP1 (*Glomerular Epithelial Protein-1*) nos glomérulos e redução da podocina no córtex renal. Além disso, a avaliação da ultraestrutura glomerular pela microscopia eletrônica evidenciou uma fusão parcial dos pedicélios (processos podais) nesses animais. A lesão dos processos podais deve estar contribuindo, portanto, para a proteinúria (Patrakka; Tryggvason, 2009). Existem evidências que essa lesão pode evoluir levando a uma proteinúria maciça. Machado e cols acompanhando animais tratados losartan na lactação até os 10 meses de idade observaram aumento progressivo na albuminúria nesses animais (Machado e cols 2008). O tratamento com Vit.D, no nosso estudo,

reduziu a albuminúria nos animais expostos ao losartan. Um grande número de estudos vem confirmado o potente efeito anti-proteinúrico da Vit. D, em diversos modelos de doença renal (Agarwal e cols 2005, Alborzi e cols 2006, Li e cols 2010). A *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), demonstrou a relação entre a deficiência da Vit.D e o aumento da albuminúria, sugerindo o papel anti proteinúrico intrínseco da Vit.D (Boer e cols 2007). Wang e cols, em seu estudo com a sinalização da Vit.D nos podócitos de camundongos diabéticos, mostrou que os podócitos expressam o receptor da Vit.D (VDR), e que a ligação da Vit. D com seu receptor (VDR) estimula a transcrição da expressão da nefrina, uma proteína chave da fenda diafragmática sintetizada pelo podócitos, e esses animais que receberam Vit.D tiveram uma redução na expressão da MAPK p-38, uma citocina que induz apoptose e inflamação (Wang e cols 2006). Esse mesmo grupo de pesquisadores mostrou que camundongos diabéticos com deleção do gene que expressa o receptor VDR, apresentam um albuminúria precoce quando comparados aos camundongos apenas diabéticos (Wang e cols 2012). Avaliamos essas MAPKs através de imunoistoquímica para MAPK p-p38 e p-JNK, e observamos que p-p38 e p-JNK estavam aumentadas nos animais expostos ao losartan quando comparados aos controles e os animais expostos ao losartan que receberam tratamento com Vit.D tiveram uma redução nessas marcações. Essas MAPKs são ativadas pela AII e a Vit. D atuando como moduladora inibindo a expressão da renina, ECA e ECA2, promoveria a *down-regulation* das MAPKs (Wang e cols 2012). A proteinúria provocada pelas alterações da barreira de filtração pode levar a distúrbios progressivos no compartimento túbulo-intersticial com perda da função renal (Patrakka, Tryggvason, 2009). Contudo, as alterações observadas na proteinúria em nosso estudo (animais com 60 dias) e de estudos anteriores em nosso laboratório (animais com 30 e 60 dias) foram discretas e não devem ser responsáveis pelas alterações tubulo-intersticiais que são bem mais proeminentes.

O metabolismo da Vit.D possui um alto grau de complexidade, sendo o rim um órgão chave nesse processo. Não apenas por seu sistema enzimático responsável pela ativação da Vit.D, mas também pela filtração e reabsorção do complexo Vit.D/DBP por endocitose nos túbulos proximais, através de seus receptores: megalina e cubulina. Em nosso modelo experimental, observamos uma falta de diferenciação celular nos túbulos proximais, o que poderá estar comprometendo a integridade desses receptores megalina e cubilina, diminuindo

assim sua reabsorção e posterior ativação pelas enzimas mitocrôndrias. Como a Vit.D é carregada na circulação por sua proteína carreadora DBP, uma proteína que compete pelo sítio de ligação com a albumina nos receptores megalina/cubulina nos túbulos proximais, o aumento da excreção de albumina urinária poderia estar competindo com a DBP para a reabsorção. Contudo, a albuminúria nessa fase é de pequena intensidade. Assim, a falta de diferenciação nos túbulos proximais, ocasionado pelo losartan, deve ser a principal responsável pela provável alteração na ativação da Vit.D. Nossos animais controles e que foram expostos ao losartan, receberam tratamento com Vit.D na sua forma ativa 1,25(OH)D (calcitriol), para repor essa provável redução na ativação da Vit.D ativada, que é reconhecida pelo VDR.

CONCLUSÃO

Concluindo, o tratamento com a Vit. D na sua forma ativa reduziu a pressão arterial, albuminúria, inflamação e as alterações observadas na diferenciação dos glomérulos e túbulos proximais. O efeito reno protetor da Vit.D deve estar relacionado, pelo menos em parte as suas ações na diferenciação das células renais, no processo inflamatório e na pressão arterial .

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

Agarwal R, Acharya A, Tian J e cols. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. **Kidney Int.** 2005; (68): 2823-2828.

Albori P, Patel NA, Peterson C e cols. Paracalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. **Hypertension.** 2008; (52): 249-255.

Akil I, Inam S, Gurcu B, Nazikoglu A, Ozbilgin K, Muftuoglu S. Histopatological and ultrastructural effects of losartan on embryonic rat kidney. **Acta Histochem.** 2005; 107 (4): 291-300.

Bagby SP, Holden W. Angiotensin II stimulates proliferation of aortic endothelial cells. **Clin. Res.** 1988; 36:259.

Balbi APC, Marin ECS, Francescato HDC, Costa RS, Coimbra TM MAPK and angiotensin II receptor in kidney of newborn rats from losartan-treated dams. **Pediatr. Nephrol.** 2008; (9): 1433-1444.

Bartlett CS, Jeansson M, Quaggin SE. Vascular growth factor and glomerular disease. **Annu Ver. Physiol.** 2016; 78:437-61.

Bill W, Keith G, The evolution of the cytoskeleton. **J. Cell. Biol.** 2011; 194:513-525.

Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2009; 94: 26-34.

Border WA, Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. **Kidney Int.** 1990; 37(2): 689-695.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **N. Engl. J. Med.** 1994; 331(19):1286-1292.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023

Brehier A, Thomasset M. Human colon cell line HT-29: characterisation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and induction of differentiation by the hormone. **J. Steroid. Biochem.** 1988; (2):265-70.

Brenner, BM. Determinants of epithelial differentiation during early nephrogenesis. **J. Am Soc. Nephrol.** 1990; (1):127-139.

Calton EK, Keane KN, Soares MJ. The potential regulatory role of vitamin D in the bioenergetics of inflammation. **Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab.Care.** 2015; (18):367-373.

Campbell-Boswell M, Robertson AL Jr. Effects angiotensin II and vasopressina on human smooth muscle cells in vitro. **Exp. Mol. Pathol.** 1981; 35(2):265-276.

Carey AV, Carey RM, Gomez RA. Expression of alpha-smooth muscle actin in the developing kidney vasculature. **Hypertension.** 1992; 19(2 suppl): II 168.

Carlberg C, Campbell MJ, Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor, **Steroids**, 2013; 78:127-136.

Charbit M, Déchaux M, Blazy I. Deleterious effects of inhibition of the renin-angiotensin system in neonatal rats. **Pediatr.Nephrol.** 1995; 9(3): 303-308.

Ciuffo GM, Viswanathan M, Seltzer AM, Tsutsumi K, Saavedra SM. Glomerular angiotensin II receptor subtypes during development of rat kidney. **Am. J. Physiol.** 1993; 265:264-271.

Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, Brabant G, Floege J. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. **Kidney Int.** 2000; 57(1):167-182.

Coimbra TM, Wiggins RC, NOH JW, Merritt S, Phan SH. Transforming growth factor- β production in antiglomerular basement disease in the rabbit. **Am. J. Pathol.** 1991; 138(1): 223-234.

Coimbra TM, Silva CGA, Lachat JJ. Renal transforming growth factor beta 1 production in neonate rats. **Cell.Prolif.** 1994; 27:669-675.

Coles HS, Burne, JF, Raff MC. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. **Development.** 1993; (118):777-784.

Christensen EI, Birn H. Megalin and Cubilin: multifunctional endocytic receptors. **Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.** 2002; (3):258-268.

Chun RF, Peercy BR, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS. Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 2014; (144):132-137.

Danielpour D, Dart LL, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. Immunodetection and quantitation of the two forms of transforming growth factor-beta (TGF-beta 1 and TGF-beta 2) secreted by cells in culture. **J. Cell Physiol.** 2013; (139): 79-86.

Daikha-Dahmane F, Levy-Beffe, Jugie M, Lenclen R. Foetal kidney maldevelopment in maternal use of angiotensin II type I receptor antagonists. **Pediatr. Nephrol.** 2006; (21):729-732.

de Bragança AC, Volpini RA, Canale D, et al. Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats. **Physiol Rep.** 2015; (3):12331.

de Al Negri. Proximal tubule endocytic apparatus as the specific renal uptake mechanism for vitamin D-binding protein/25(OH)D3 complex. **Nephrology.** 2006; (11):510-515.

do C Maquiaveli C, da Silva ER, Francescato HD, Costa RS, Silva CG, Casarini DE, Ronchi FA, Coimbra TM. Brazilian embauba (*Cecropia pachystachya*) extract reduces renal lesions in 5/6 nephrectomized rats. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** 2014; (4):9-15.

Dusso, AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. **Am J Renal Physiol.** 2005; F8-F28.

Dzau, VJ, Burt, DW, Pratt, RE. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Am. J. Physiol.** 1988, 255: 573.

Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Witham SE, Dockerty AJP, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor- β modulates the expression of collagen and metalloproteinase inhibitor. **Embo J.** 1987; (7):1899-1904.

El Nahas AM, Muchaneta-Kubara EC, Zhang G, Adam A, Goumenos D. Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. **Kidney Int.** 1996; (54):23-27.

Ferder M, Inserra F, Manucha W, Ferder L. **Am. J. Physiol-Cell Physiol.** 2013. (11):1027-1039.

Fernandez LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. **J. Lab. Clin. Med.** 1985; (105): 141-145.

Fiselier TJW, Lynex P, Monnens L, Munster VP, Jansen M, Peer P. Levels of renin, angiotensin I and II, angiotensin-converting enzyme and aldosterone in infancy and childhood. **Eur. J. Pediatr.** 1983, 141: 206A.

Freitas, ASM. Urinary Transforming Growth Factor- β (TGF- β) excretion and renal production of TGF- β in rats with subtotal renal ablation: Effect of enalapril and nifedipine. **Nephron.** 1998; (78):302-309.

Freundlich M, Yasmir Q, Zhongyi Z, Yan Zhang, Bravo Y, Weisinger JR, LI YC, Iturbe BR. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. **Kid Int.** 2008; (74): 1394-1402.

Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, Bobik A, Nilsson H, Wickman A, Gustafsson H, Petersen J, Adams MA. Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonismo. **Kidney Int.** 1994, (45): 485-492.

Fuhr J, Kaczmarczyk Y, Kruttgen CD. Eine einfache colorimetrische Methode zur Inulinbesimmung fur Nierenclearance untersuchegen bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern. **Klin Wochenchr**, 1955; 33(29-30):729-730.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.** 1992; (3):493-501.

Gay O, Gilquin B, Nakamura F, Jenkins ZA, McCartney R, Krakow D, Deshiere A, Assard N, Hartwig JH, Robertson SP, Baudier J. RefilinB (FAM101B) targets filamin A to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2011 (28):11464-9.

Geisterfer, A.A.T., Peach, M.J., Queens, G.K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circ. Res.** 1998; (62): 749-756.

Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, ElwoodJP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ (1989) Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. **Am. J Physiol.** 1989; (257):850-858.

Gomez RA, Tufro-McReddie A, Everret AD, Pentz ES. Ontogeny of renin and AT1 receptor in the rat. **Pediatr. Nephrol.** 1993; (7):635-638.

Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schamberlan M, Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the development rat fetus. **J.Clin. Invest.** 1991;(3): 921-933.

Hall PA, Levison, Woods DA, YU AL, Kellock CC, Watkins DB, Barnes JA, Gillett DM, Camplejohn CE, Dove R, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in parafin sections: the index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **J. Pathol.** 1990; (4): 285-294.

Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria, **Physiol Rev.** 2008; (2):451-87.

Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal.Biochem.** 1972; (2):422-427.

Haygen HN. The determination of "endogenous creatinine" in the plasma and urine. **Scand.J.Clin. Lab. Invest.** 1953; (1):48-57.

Helvig CF, Cuerrier D, Hosfield CM, Ireland B, Kharebov AZ, Kim JW, Ramjit NJ, Ryder K, Tabash SP, Herzenberg AM, Epps TM, Petkovich M, Dysregulation of renal vitamin D metabolism in the uremic rat. **Kidney Int.** 2010; (5):72-78.

Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW.eds. Clinical Chemistry, Principles and Tecnics 2°ed. New York: Harper&row 1974.

Hilgers KF, Norwood VF, Gomez RA. Angiotensin's role in renal development. **Semin.Nephrol.** 1997;17(5):492-501.

Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clin. Sci.** 2007; (8):417-428.

Holick MF. Vitamin D Deficiency, **N. Engl. J. Med.** 2007; (357):266-281.

Holick MF. Vitamin D: a d-lightful solution for health. **J. Investig. Med.** 2011; (6):872-80.

Holick MF. Vitamin D, sunlight and cancer connection. **Ant. Canc. Ag Med. Chem.** 2013; (13), 70-82.

Horiushi M, Akishita M, Dzau V.J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. **Hypertension.** 1999; (33):613-621.

Homma T, Hoover RL, Ichikawa I, Harris, RC. Angiotensin II induces hypertrophy and stimulates collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. **Clin. Res.** 1990; (38): 258A.

Ignatz, RA, Endo T, Massagé J. Regulation fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . **J. Biol. Chem.** 1987; (14): 6443-6446.

Johnson, RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM. Expression of smooth cell phenotype by rat mesangial cells immune complex nephritis. **J. Clin. Invest.** 1991. 87:847-858.

Junqueira LC, Carneiro J. Orgãos associados ao trato digestivo. In: **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., 2008. p. 324-34.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. **J. Clin. Invest.** 1994, (6): 2431-2437.

Kakushi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I. Development expression of renal angiotensin II receptor genes in mouse. **Kidney Int.** 1995; (47): 140-147.

Kerjaschki D and Farquhar MG. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1982; (79): 5557-5581.

Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG., Koch KM, Floege J. Mechanism involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney Int.** 1996; 49(3): 666-678.

Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development. **J. Cell Biol.** 1992; 119(5): 1327-1333.

Kotchen TA, Strickland AL, Rice TW, Walters DR. A study of renin angiotensin system in newborn infants. **J. Pediatr.** 1972;80: 938-946.

Kuhlmann A, Haas SC, Gross ML, Udo Reulbach, Holzinger M, Schwarz U, Ritz E, Amann K, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. **Am J Physiol - Renal Physiol** 2004, (3): 526-533.

Laurell CB. Eletroimmuno assay. **Scand J Clin Lab Invest.** 1972; 124:21-23.

Lennon R, Randles MJ, Humphries JM, The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus, **Frontiers in Endocrinology.** 2014; (5):160.

Loria A, Reverte V, Salazar F, Saez F, Llinas MT, Salazar FJ. Changes in renal hemodynamics and excretory function induced by a reduction of ANG II effects during renal development. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 2007; 293(2):695-700.

Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **J. Clin. Invest.** 2002; (2):229-238.

Li YC. Podocytes as Target of Vitamin D. **Current. Diabetes. Reviews.** 2011; (7):35-40.

Liu PT, Stenger S, Li H, e cols. Toll-like receptor triggering of a vitamin-mediated human antimicrobial response. **Science.** 2006; (311):1770-1773.

LUNA LG. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.** 3ed. NewYork: McGraw Hill, 1968; 258p.

Lyons RM, Moses HL. Transforming growth factors and regulation of cell proliferation. **Eur. J. Biochem.** 1990; (3):467-473.

Machado FG, Poppi EPB, Fanelli C, Malheiros DMAC, Zatz R, Fujihara CK. AT1 blockade during lactation as a model of chronic nephropathy: mechanism of renal injury, **AM. J. Physiol. Renal.** 2008; (294):1345-1353.

McCausland JE, Ryan GB, Alcorn D. The effects of angiotensin converting enzyme inhibition on postnatal renal development in rats. **J. Hypertension.** 1994; (Suppl.3) 89.

Macdonald MS, Emery JL. The late intrauterine and postnatal development of human renal glomeruli. **J. Anat.** 1959; (93):331-334.

Madsen K, Marcussen N, Pedersen M, Kjaersgaard G, Facemire C, Coffman TM, Jensen BL. Angiotensin II promotes development of the renal microcirculation through AT1 receptors. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2010; (3):448-459.

Marin EC, Francescato HD, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM. The role of oxidative stress in renal injury induced in rats by losartan exposition during lactation. **J. Renin.Angiotensin.Aldosterone Syst.** 2013; (0):1-16.

Marquez MG, Cabrera I, Serrano, DG, Speziale N. Cell proliferation and morphometric changes in rat kidney during postnatal development. **Ant. Embryol.** 2002; (6):431-40.

Millan MA, Carvalho P, Izumi SI, Zemel S, Catt KJ, Aguilera G. Novel sites of expression. of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus. **Science.** 1989; (244):1340-1342.

Mirković K, Doorenbos CRC, Dam WA, Lambers Heerspink HJ, Slagman MCJ, Nauta FL. Urinary Vitamin D Binding Protein: A Potential Novel Marker of Renal Interstitial Inflammation and Fibrosis. **PLoS ONE.** 2013 (2): 55887.

Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The filamins: organizers of cell structure and function. **Cell Adh Migr.** 2011; (2):160-9.

Naurese K, Fujieda M, Miyasaki E, Hayashi Y, Toi M, Fukui T, Kuroda N, Hiroi M, Kurashige T, Enzan H. An immunohistochemical study of developing glomeruli in human fetal kidneys. **Kidney Int.** 2000; (57):1836-1846.

Nigan SK, Aperia AC, Brenner BM. Development and maturation of the kidney, in: Brenner BM, Rector FC: **The Kidney: Physiology and Pathology.** Philadelphia, WB Saunders; 2008. P. 72-98.

Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. **Kidney Int.** 2016, 89:58-67.

Noh JW, Wiggins R and Phan SH. Urine TGF- β activity is related to the degree of scarring in crescentic nephritis in the rabbit. **Nephron**. 1993; (63):73-78.

Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. **Cell**. 1999; (4):507-15.

Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, Muñoz A. Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. **J Cell Biol**. 2001 (2):369-87.

Panichi V, Migliori M, Taccola D, Filippi C, Nisco DL, Giovannini L, Palla R, Tetta C, Camussi G. Effects of 1,25(OH)₂D₃ in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. **Kidney Int**. 2001; 60: 87-95.

Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte, **Physiol Rev**. 2003; (1):253-307.

Patrakka J, Tryggvason K. New insights into the role of podocytes in proteinuria. **Nat. Rev. Nephrol**. 2009 (8):463-8.

Peng W, Wang K, Zheng R, Derwahl M. 1,25 dihydroxyvitamin D₃ inhibits the proliferation of thyroid cancer stem-like cells via cell cycle arrest. **End. Res**. 2016; (41):71-80.

Pereira F, Larriba MJ and Muñoz A. Vitamin D and colon cancer. **Endoc. Rel. Canc** 2012 (19):51-71.

Philadelphia, pp 72-98 Patrakka J, Tryggvason K (2009) New insights into the role of podocytes in proteinuria. **Nat. Rev. Nephrol** 5:463-468.

Norwood VF, Harris JM, Gomez RA. Angiotensin II (All) receptors (AT-1 and AT-2) are developmentally regulated during early nephrogenesis. **J. Am. Soc. Nephrol**. 1994; (5): 632A.

Omori S, Hida M, Ishikura K, Kuramoshi S, Awazu M. Expression of mitogen-activated protein kinase Family in rat renal development. **Kidney Int**. 2000; (58):27-37.

Reeves W, Caulfield JP, Farquhar MG. Differentiation of epithelial foot process and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion and slit membranes in developing glomeruli. **Lab Invest.** 1978; (39):90-100.

Rizzino A. Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. **Dev. Biol.** 1988, (130):411-422.

Roberts AB, Spon MB. Transforming growth factor betas. In Sporn MB, Roberts AB. **Handbook of experimental pharmacology: peptide growth factors and their receptors.** Vol.95. Heidelberg, Springer. Verlag, 1990. p.419-472.

Roberts AB, McCune BK, Spon MB. TGF- β : Regulation of extracellular matrix. **Kidney Int.** 1992; (3):551-559.

Romano LA, Ferder L, Inserra F, Ercole L, Gómez R. Intraglomerular expression of α -smooth muscle actin in aging mice. **Hypertension.** 1994, (23):889-893.

Rosenberg ME, Correa-Rotter R, Perez-Catillo A, Hostetter TH. Renin gene expression in the growing rat kidney. **Kidney Int.** 1990; (37): 358.

Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. Development of renin expression in the mouse kidney. **Kidney Int.** 2008; (73):43–51.

Schreuder MF, Nyengaard JR, Remmers F, Van Wijk JA, Delemarre-van de Waal H.A. Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. **Am. J. Physiol.** 2006; (5):1104-1107.

Shankhagit De, Kuwahara S, Saito A. The Endocytic Receptor Megalin and its Associated Proteins in Proximal Tubule Epithelial Cells. **Membranes.** 2014;(3):333-355.

Sedman AB, Kershaw DB, Bunchman TE. Recognition and management of angiotensin converting enzyme inhibitor fetopathy. **Pediatr. Nephrol.** 1995; (3):382-5.

Serón D, Alexopoulos E, Raftery MJ, Hartley B, Cameron JS. Number of interstitial capillary cross-sections assessed by monoclonal antibodies: relation to interstitial damage. **Nephrol. Dial. Transplant.** 1990; (10):889-93.

Singhal, P.C., Franki, N., Hays, R.M. Angiotensin II induces actin synthesis in cultured mesangial cells. **Clin. Res.** 1990; 38: 401A.

Schwartz GG, Eads D, Rao A, Cramer SD, Willingham MC, Chen TC, Jamieson DP, et al. Pancreatic cancer cells express 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and their proliferation is inhibited by the prohormone 25-hydroxyvitamin D3. **Carcinogenesis** 2004; (25):1015-1026.

Shin W, Hines WH, Nielasen EG. Effects of cyclosporin A on the development of incubated with the antibody immunemediated interstitial nephritis. **Kidney Int.** 1988; (33):1113-1118.

Spence SG, Allen H.L, Cukiersky MA, Manson JM, Robertson RT, Eydeloth RS. Defining the susceptible period of developmental toxicity for the AT1 selective angiotensin II receptor antagonist Losartan in rats. **Teratology.** 1995; (51): 367-382.

Spence SG, Zacchei AG, Lee LL, Baldwin CL, Berna RA, Mattson BA, Eydeloth RS. Toxicokinetic analysis of losartan during gestation and lactation in the rat. **Teratology.** 1996; (4):254-252.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. **J. Cell. Biol.** 1987; (105): 1039-1045.

Stewart T, Jung FF, Manning J, Vehaskari VM. Kidney immune cell infiltration and oxidative stress contribute to prenatally programmed hypertension. **Kidney Int.** 2005; (5): 2180-2188.

Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2006; (17): 3382–3393.

Taubman MB, Berk BC, Izumo S, Tsuda T, Alexander RW, Nadal-Ginard B. Angiotensin II induces of *c-fos* mRNA in aortic smooth muscle. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. **J. Biol. Chem.** 1989; (1):526-530.

Tian Y, Lv G, Yang Y, et al. Effects of vitamin D on renal fibrosis in diabetic nephropathy model rats. **Int. J. of Clin Exp Pathol.** 2014; (6):3028-3037.

Thiery JP, Duband JL, Dufour S, Savagner P, Imhof BA. Role of fibronectins in embryogenesis, in: Mosher DF (ed): *Biology of extracellular matrix: fibronectin* Academic Press, 1989; Inc, San Diego, pp. 181-212.

Tufro-McCreddie A, Johns DW, Geary KM, Dagli H, Everett AD, Chevalier RL, Carey RM, Gomez RA. Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. **Am. J. Physiol.** 1994; (266): 911-918.

- Tufro-Mcreddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA. Angiotensin regulates nephrogenesis and renal vascular development. **Am. J. Physiol.** 1995; (269):110-115.
- Wallace KB, Hook JB, Baile MD. Postnatal developmental development of the renin angiotensin system in rats. **Am. J. Physiol.** 1980; (5):432-437.
- Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. **Mol Endocrinol.** 2005; (19):2685-95.
- Wilson TA, JR JMA, Juno CJ, Kaskel FJ, Partin JS. Ontogeny of plasma renin activity in the Dahl rat model of essential hypertension. **J. Hypertension.** 1996; 4(Suppl.5):23-26.
- Woolf AS, Winyard PJ. Advances in the cell biology and genetics of human Kidney malformations. **J. Am. Soc. Nephrol.** 1998; (9):1114-1125.
- Wolf G. Angiotensin II and tubular development. **Nephrol. Dial. Transplant.** 2002 (17)[suppl 9]:48-51.
- Xu F, Mao C, Liu Y, Wu L, Xu Z, Zhang L. Losartan chemistry and its effects via AT1 mechanisms in the kidney. **Curr. Med. Chem.** 2009; (28):3701.
- Yamada KM. Fibronectin and cell surface interactions, in: Cell Biology of Extracellular Matrix, edited by Hay, ED, New York, **Plenum Press.** 1991, pp 111-146.
- Yamamoto S, Yancey PG, Zuo Y, Ma LJ, Kaseda R, Fogo AB, Ichikawa I, Linton MF, Fazio S, Kon V. Macrophage polarization by angiotensin II-type 1 receptor aggravates renal injury-acceleration of atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 2011 (12):2856-64.
- Yun Chen, Lasaitiene D, Gabrielsson BG, Carlsson LMS, Billig H, Bjorn C, Niells M, Xiao FS, Friberg P. Neonatal losartan treatment suppresses renal expression of molecules involved in cell-cell and cell-matrix interactions. 2004. **J. Am. Soc. Nephrol.** (15):1232-1243.
- Yousefzadeh P, Shapses SA, Xiangbing W. Vitamin D Binding Protein Impact on 25-Hydroxyvitamin D Levels under Different Physiologic and Pathologic Conditions. **Int. J. Endocrinol.** 2014. 981581, 6 pages.

Zoja C, Donadelli P, Colleoni RS. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-Kappa B activation. **Kidney Int.** 1998; (53):1608-1615.

Zhang Y, Leung DY, Richers BN e cols. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. **J. Immunol.** 2012; (188):2127-2135.

ANEXO

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 nº 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 nº 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