**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

CARLA DA SILVA MACHADO

**Avaliação da instabilidade genômica, estresse oxidativo e
modulação da expressão gênica pela vitamina D em modelo
de ratos espontaneamente hipertensos**

Ribeirão Preto
2016

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

CARLA DA SILVA MACHADO

**Avaliação da instabilidade genômica, estresse oxidativo e
modulação da expressão gênica pela vitamina D em modelo
de ratos espontaneamente hipertensos**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências, área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria
Greggi Antunes

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto
2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Carla da Silva Machado
Machado, C.S.

Avaliação da instabilidade genômica, estresse oxidativo e modulação da expressão gênica pela vitamina D3 em modelo de ratos espontaneamente hipertensos

Ribeirão Preto: FMRP, 2016

Número de Páginas: 123

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/USP. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

1. colecalciferol; 2. hipertensão; 3. expressão gênica; 4. dano ao DNA; 5. Nutrigenômica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carla da Silva Machado

Avaliação da instabilidade genômica, estresse oxidativo e modulação da expressão gênica pela vitamina D em modelo de ratos espontaneamente hipertensos

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências, área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria
Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Normalização Adotada

Este documento foi elaborado de acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR 6023

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentações de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. São Paulo, 2004.

Apoio e suporte financeiro

Este projeto foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), por meio de concessão de bolsa de doutorado, Processo FAPESP nº 2012/04325-9.

Dedico...

*Com amor, à minha família:
pai, mãe, Cris e Leonardo*

Agradeço...

À Deus, por direcionar toda a minha trajetória acadêmica, desde a pré-escola até a pós-graduação. Obrigada por me proteger, iluminar e abençoar com muitas alegrias e boas emoções, e por estar presente nos momentos de dificuldade ou quando a saudade aperta. Obrigada pelos amigos mais que especiais que colocou em meu caminho, e pela minha linda família, meus maiores amores.

À minha mãe **Elíana Lúcia da Silva Machado**, pelo amor incondicional e por estar presente em todos os momentos. Obrigada pelas orações diárias, pela calorosa recepção ao chegar em casa, pela comida especial feita com todo amor e carinho, pelo sorriso mais lindo e contagiante, por sempre confiar nas minhas escolhas e por me ensinar o verdadeiro significado da palavra AMOR. Ao meu pai **João Carlos da Rosa Machado**, pelo exemplo de honestidade e por sempre estar presente em minha vida. Obrigada pela dedicação, por acreditar em mim e por todo amor dispensado. Obrigada também pelo "PAITROCÍNIO" que sempre me salva nos momentos de aperto e dificuldade. À minha irmã **Cristiane da Silva Machado**, a minha Cris. Obrigada por ser minha melhor amiga e confidente para todas as horas! Obrigada por acreditar em mim, pela paciência em relação à distância e, principalmente, por sentir orgulho dessa "mana" que tanto te ama!

Ao meu "eterno namorado" **Leonardo Meneghin Mendonça**, pela amizade, parceria, carinho, dedicação, aprendizado e amor incondicional. Obrigada **Léo** por sempre acreditar em nosso relacionamento e pela paciência em suportar mais de três anos de distância!!! Ao longo desses cinco anos e meio de namoro, noivado e casamento, ao seu lado encontrei a paz, a serenidade e o amor mais puro e verdadeiro. Meu coração vibra de alegria a cada encontro, e chora de saudade a cada despedida. Hoje, posso dizer que essa conquista também é sua: afinal de contas, sempre estive presente ao longo da minha caminhada como pós-graduanda, me ajudando e apoiando! Você é minha inspiração e meu orgulho: te amo!

À minha orientadora de mestrado e doutorado **Profa. Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes**, por me conceder essa grande oportunidade e permitir que eu realize um dos maiores sonhos da minha vida: ser doutora! Obrigada **Lusânia** por acreditar e confiar no meu trabalho, por me animar em momentos difíceis, pela atenção na leitura dos relatórios, resumos e tese, por me ensinar a valorizar mais a cultura e a arte, pelas pacientes conversas em sua sala, pela companhia e aventuras nos congressos internacionais e pela amizade ao longo desses 6 anos! Com a sua ajuda,

consegui amadurecer pessoal e cientificamente, e por esse e outros motivos, tenho muito orgulho de ter sido sua orientada! À **Lusânia**, minha eterna gratidão por todos os ensinamentos!

À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi**, por todo apoio, auxílio, incentivo, amizade e boa convivência, além da disponibilização de verba e infraestrutura do laboratório de Nutrigenômica.

Às amigas pós-graduandas do laboratório de Nutrigenômica **Livia Cristina Hernandez**, **Michela Bianchi de Mello** e **Ana Rita Thomazela Machado**, por toda amizade e carinho recebidos, além da aprendizagem e parceria ao longo desses anos! Com a **Livia** aprendi a sorrir mais e reclamar menos, a observar a natureza com mais atenção e dar mais valor às "coisas simples" da vida! Obrigada, amiga **Livia**, pelos 5 anos de amizade, pela ajuda com os experimentos, pelas caronas para o centro e por disponibilizar seu carro, com muita boa vontade, para buscar "meus" ratos em Uberaba! Tenho muito orgulho de você! Com a **Michela** dei boas risadas no ônibus, almocei junto em muitos domingos após a missa, conversei sobre a vida e os planos futuros, além de aprender um novo vocabulário, repleto de expressões como "capaz", "bah", "mazah" e "vou ir". Obrigada, amiga **Michela**, pelos 3 anos de amizade e boas risadas! Você me deu muita força ao longo da pós-graduação, e sem você aqui seria muito mais difícil concluir essa etapa! Com a **Ana Rita** tenho aprendido a simplificar e não esquentar a cabeça com o que não vale a pena! A Ana é cheia de conselhos e experiências, além de ter inúmeras qualidades como o bom coração, a alegria, a espontaneidade e o bom humor! Amiga **Ana Rita**, apesar de conhecê-la a apenas um ano, agradeço a Deus por colocá-la em meu caminho! Com certeza, tornou meu último ano de doutorado mais agradável, leve e divertido! Muito obrigada por tudo!

Aos amigos pós-graduandos do laboratório de Nutrigenômica **Alexandre Ferro Aíssa** e **Diego Luís Ribeiro**, pelos aprendizados, discussões científicas enriquecedoras e pela amizade! Obrigada **Alexandre (Xandão)** por me auxiliar nos experimentos, por ajudar no meu desenvolvimento como pesquisadora e pelas agradáveis conversas e conselhos ao longo desses quase 6 anos! Obrigada **Diego**, por toda ajuda com a leitura de resumos, artigos e tese, pelas caronas para o centro e pelas conversas sempre agradáveis e descontraídas! Obrigada pela amizade nesses últimos 2 anos!

Ao pós-graduando do laboratório de Nutrigenômica **Vinicius de Paula Venâncio**, por toda ajuda experimental e científica, especialmente nos primeiros dois anos de doutorado.

À Joana D'Arc Castania Darin, Regislaine Valéria Burim e Jefferson Leandro Codognotto por todo apoio técnico e especialista concedidos, pelo auxílio na realização dos experimentos e pela especial convivência diária!

À secretária da pós-graduação Susie Adriana Penha Nalon, pelo excelente atendimento e disposição na resolução das dificuldades que surgiram ao longo do doutorado.

À grande amiga Jhenifer Kliemchen Rodrigues, imprescindível na minha chegada a Ribeirão Preto. Obrigada por me oferecer moradia, pelas longas conversas com café e pão de queijo, pelos passeios sempre divertidos, pela amizade verdadeira e pela energia positiva que transmite!

Aos queridos "bióamigos" da graduação Natália dos Santos Mamede, Juliana Clemente Machado, Camila de Souza Queiroz e Fausto Bahia pela amizade, paciência e principalmente pelo incentivo e torcida que me motivaram a estudar na Universidade de São Paulo!

Aos amigos de infância e de escola Cíntia Monteiro de Sousa, Lillian Henriques do Amaral, Gabriel Norbert, Gustavo Badolati Racca, André Rosa Abreu, Alessandra Speranza Iacaz e Natalia D'Ávila que, mesmo de longe, sempre me encorajaram através de e-mails, telefonemas e nos (sempre divertidíssimos) encontros de finais de ano!

A todos os meus familiares, tios, padrinhos, primos, primas, e em especial a minha avó Orlandina Joaquim da Rosa Machado, que sempre reza e torce pelo meu desempenho!

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP/USP), que possibilitou o meu ingresso na pós-graduação e me proporcionou grandes conhecimentos, e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP/USP), onde realizei a maioria dos experimentos do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (processo nº 2012/04325-9) e pelo auxílio técnico disponibilizado ao longo do doutorado.

Ao Conselho Superior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa no primeiro ano de doutorado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio à pesquisa desenvolvida no Laboratório de Nutrigenômica.

*"Mas as coisas findas
muito mais que lindas,
essas ficarão."*

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

MACHADO, C. S. **Avaliação da instabilidade genômica, estresse oxidativo e modulação da expressão gênica pela vitamina D em modelo de ratos espontaneamente hipertensos**. 2016. 123p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A vitamina D3 é um micronutriente obtido da dieta ou pela conversão do 7-deidrocolesterol na epiderme após exposição à radiação UVB. A vitamina D (D2 ou D3) atua sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona, e sua deficiência vem sendo associada ao desenvolvimento da hipertensão. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação ou deficiência de vitamina D3 em ratos espontaneamente hipertensos (SHR - *spontaneously hypertensive rats*) e seus controles normotensos (Wistar Kyoto – WKY) sobre a pressão arterial sistólica, danos ao DNA e cromossomos, marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, *burst* oxidativo dos neutrófilos, análise de fibrose no rim e perfil de expressão de genes relacionados com a hipertensão arterial no rim e coração. Os animais foram alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 ao longo de 12 semanas. A quantificação plasmática de vitamina D3 foi avaliada pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e a pressão arterial sistólica foi aferida semanalmente, por método não invasivo de pletismografia da artéria caudal. Os danos ao material genético foram avaliados pelo ensaio do cometa nas células do sangue periférico, rim e coração e pelo teste do micronúcleo nos eritrócitos da medula óssea e sangue periférico; o estresse oxidativo foi avaliado pelos ensaios de quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) e glutathiona (GSH) no rim e coração; o *burst* oxidativo em neutrófilos do sangue periférico; a quantificação de fibrose por histologia renal e a expressão gênica por RT² Profiler™ PCR Arrays no rim e coração. Os resultados obtidos com os ratos SHR mostraram que a suplementação com vitamina D3 reduziu a pressão arterial sistólica, não induziu danos ao DNA e aos cromossomos, estresse oxidativo ou fibrose renal, e regulou a expressão de quatro genes envolvidos com a hipertensão arterial no rim (*Ace*, *Agt*, *Ren* e *Edn1*) e cinco genes no coração (*Ace*, *Avp*, *Ephx2*, *Mylk3* e *Ren*). A deficiência em vitamina D3 aumentou a pressão arterial sistólica, os danos ao DNA e aos cromossomos, a peroxidação lipídica no rim e coração, o *burst* oxidativo dos neutrófilos, o percentual de fibrose no rim, e a expressão de treze genes envolvidos com a hipertensão arterial no rim (*Ace*, *Acta2*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Alox5*, *Cacna1c*, *Ece1*, *Ednra*, *Kcnma1*, *P2rx4*, *Scnn1g* e *Slc7a1*) e nove genes no coração (*Ace*, *Agtr1b*, *Cacna1c*, *Drd5*, *Mylk2*, *Nostrin*, *Scnn1a*, *Scnn1g* e *Sphk1*). Nos animais WKY, a dieta suplementada alterou a expressão do gene *Ren* no rim e de dez genes no coração (*Ace2*, *Bdkrb2*, *Drd3*, *Drd5*, *Itpr1*, *Itpr2*, *Itpr3*, *Ptgs1*, *Scnn1a* e *Scnn1g*); e a dieta deficiente em vitamina D3 aumentou os danos ao DNA nos eritrócitos, induziu fibrose no rim e alterou a expressão de três genes no rim (*Ace*, *Cps1* e *Arg2*) e de seis genes no coração (*Ace*, *Cacna1c*, *Ednra*, *Ephx2*, *Itpr1* e *Itpr2*). Nos parâmetros pressão arterial sistólica, danos aos cromossomos, peroxidação lipídica e *burst* oxidativo, os ratos WKY alimentados com as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3 não diferiram em relação aos animais que receberam a dieta controle. Em conclusão, a variação da concentração de vitamina D3 da dieta alterou a fisiologia da hipertensão arterial, atuando como um anti-hipertensivo na suplementação e agravando os efeitos da hipertensão na deficiência.

Palavras-chave: colecalciferol, hipertensão, expressão gênica, dano ao DNA, Nutrigenômica

ABSTRACT

MACHADO, C. S. **Evaluation of genomic instability, oxidative stress and modulation of gene expression by vitamin D in a model of spontaneously hypertensive rats.** 2016. 123p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Vitamin D3 is a micronutrient obtained from diet or by conversion of 7-dehydrocholesterol in the skin after exposure to UVB radiation. Vitamin D (D2 or D3) acts on the renin-angiotensin-aldosterone system, and its deficiency has been associated with hypertension development. This study aimed to evaluate the effect of vitamin D3 supplementation or deficiency in spontaneously hypertensive rats (SHR - spontaneously hypertensive rats) and their normotensive controls (Wistar Kyoto - WKY) on systolic blood pressure, DNA and chromosomes damage, biochemical markers of oxidative stress, oxidative burst in neutrophils, renal fibrosis and the gene expression profile of genes related to hypertension in kidney and heart. The rats were fed a vitamin D3 control diet (1,000 IU/kg) supplemented diet (10,000 IU/kg) or deficient diet (0 IU / kg) during 12 weeks. Vitamin D3 plasma quantification was performed by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) technique and systolic blood pressure was measured weekly by noninvasive plethysmography of the caudal artery. DNA and chromosomal damage was evaluated by the comet assay in the peripheral blood, kidney and heart cells and by the micronucleus test in erythrocytes from bone marrow and peripheral blood; oxidative stress was evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione (GHS) assays in kidney and heart; oxidative burst in neutrophils of peripheral blood; renal fibrosis by histology and gene expression by RT² Profiler™ PCR Arrays in kidney and heart. The results obtained for SHR rats showed that vitamin D3 supplementation reduced systolic blood pressure, did not induced DNA or chromosomal damage, oxidative stress or renal fibrosis, and regulated the expression of four genes involved with hypertension in the kidney (*Ace*, *Agt*, *Ren* and *Edn1*) and five genes in the heart (*Ace*, *Avp*, *Ephx2*, *Myk3* and *Ren*). Vitamin D3 deficiency increased systolic blood pressure, DNA damage in erythrocytes, lipid peroxidation in kidney and heart, oxidative burst in neutrophils and the renal fibrosis, and regulates the expression of thirteen genes involved with hypertension in kidney (*Ace*, *Acta2*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Alox5*, *Cacna1c*, *Ece1*, *Ednra*, *Kcnma1*, *P2rx4*, *Scnn1g* and *Slc7a1*) and nine genes in heart (*Ace*, *Agtr1b*, *Cacna1c*, *Drd5*, *Myk2*, *Nostrin*, *Scnn1a*, *Scnn1g* and *Sphk1*). In WKY rats, vitamin D3 supplementation altered the expression of *Ren* gene in the kidney and of ten genes in the heart (*Ace2*, *Bdkrb2*, *Drd3*, *Drd5*, *Itpr1*, *Itpr2*, *Itpr3*, *Ptgs1*, *Scnn1a* and *Scnn1g*); and vitamin D3 deficiency increased DNA damage in erythrocytes and renal fibrosis, and altered the expression of three genes in the kidney (*Ace*, *Cps1* and *Arg2*) and six genes in the heart (*Ace*, *Cacna*, *Ednra*, *Ephx2*, *Itpr1* and *Itpr2*). In the parameters systolic blood pressure, chromosomal damage, lipid peroxidation and oxidative burst, WKY rats fed with vitamin D3 supplemented or deficient diet did not differ compared to rats that received vitamin D3 control diet. In conclusion, the variation of dietary vitamin D3 levels altered the physiology of hypertension, acting as an antihypertensive in supplementation and aggravating the hypertension effects in its deficiency.

Keywords: cholecalciferol, hypertension, gene expression, DNA damage, Nutrigenomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese e metabolismo da vitamina D. Adaptado de Kitson; Roberts (2012).....	6
Figura 2. Representação esquemática dos domínios de ligação do receptor da vitamina D, o VDR (<i>Vitamin D Receptor</i>). Adaptado de Brown; Dusso; Slatopolsky (1999).....	7
Figura 3. Representação esquemática da modulação da expressão gênica pela vitamina D. 1,25 [OH] ₂ D ₃ (1,25 dihidroxivitamina D ₃ , forma ativa da vitamina D ₃), DBP (<i>Vitamin D Binding Protein</i> , proteína transportadora da vitamina D), VDR (<i>Vitamin D Receptor</i> , receptor da vitamina D), RXR (<i>Retinoid X Receptor</i> , receptor do retinóide X). Adaptado de: Reddy Vanga et al. (2010).....	8
Figura 4. Representação esquemática do modelo de repressão da expressão do gene da pró-renina pela forma ativa da vitamina D ₃ , proposto por Yuan et al. (2007). Adaptado de: Yuan et al. (2007).....	13
Figura 5. Esquema simplificado do delineamento experimental. S: semana.....	26
Figura 6. Imagens de nucleoides capturados com o software CometAssay IV. (A) Nucleoide com ausência de dano ao DNA e (B) nucleoide com elevado grau de dano ao DNA.....	30
Figura 7. Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo em células da medula óssea de ratos. Coloração Giemsa e aumento original de 1.000 x. (a) Eritrócito policromático (PCE), (b) Eritrócito normocromático (NCE), (c) Eritrócito policromático com micronúcleo.	31
Figura 8. Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos. A seta indica um eritrócito policromático micronucleado. Coloração laranja de acridina e aumento original de 1.000 x.....	31
Figura 9. Fotomicrografia que mostra a população de neutrófilos obtida a partir do método de separação por gradiente Histopaque 1077. Coloração Giemsa, aumento original de 1.000 x.	33
Figura 10. Ganho de massa corpórea de (A) ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e (B) seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/Kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D ₃ durante o período de 12 semanas. Os dados representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo (n=6). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle (p>0,05). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.....	39
Figura 11. Consumo de dieta de (A) ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e (B) seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle	

(1.000 UI/Kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante o período de 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo (n=6). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle ($p>0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett. 40

Figura 12. Pressão arterial sistólica de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/Kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante o período de 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo (n=6). *Significativamente diferente do grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3 ($p<0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett. 44

Figura 13. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides (% DNA) avaliada pelo ensaio do cometa em células do coração, rim e sangue periférico de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo (n=6), sendo analisados 100 nucleóides por animal. * $p<0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett. 46

Figura 14. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) após tratamento com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão da frequência de MNPCE de cada grupo de tratamento (n=6). 2.000 PCE analisados por animal. * $p<0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett. 48

Figura 15. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) no sangue periférico de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3, avaliada em três tempos: t1 = início do experimento; t2 = sexta semana; t3 = décima segunda semana. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão da frequência de MNPCE de cada grupo de tratamento (n=6). 2.000 PCE analisados por animal. * $p<0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett. 50

Figura 16. *Burst* oxidativo dos neutrófilos no sangue periférico, representado pela resposta relativa de quimioluminescência, de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 4 animais por grupo (n=4). * $p<0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett. 51

Figura 17. Fotomicrografias de secções do córtex renal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) coradas com picrossírius para a avaliação da deposição de colágeno. Os ratos SHR e WKY foram submetidos a tratamento com dietas com diferentes concentrações de vitamina D3 ao longo de 12 semanas (aumento original de 800 x). As imagens **A, B, C, G, H e I**

são provenientes de microscopia de luz, e as imagens **D**, **E**, **F**, **J**, **K** e **L** são provenientes de microscopia de luz polarizada. **A** e **D**, ratos SHR alimentados com dieta controle em vitamina D3 (1.000 UI/kg); **B** e **E**, ratos SHR alimentados com dieta suplementada em vitamina D3 (10.000 UI/kg); **C** e **F**, ratos SHR alimentados com dieta deficiente em vitamina D3 (0 UI/kg); **G** e **J**, ratos WKY alimentados com dieta controle em vitamina D3 (1.000 UI/kg); **H** e **K**, ratos WKY alimentados com dieta suplementada em vitamina D3 (10.000 UI/kg); **I** e **L**, ratos WKY alimentados com dieta deficiente em vitamina D3 (0 UI/kg). As setas mostram o aumento de colágeno nos ratos SHR e WKY alimentados com a dieta deficiente em vitamina D3. 54

Figura 18. Quantificação de fibrose (percentual/área) no rim de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo (n=6). * $p < 0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fontes alimentares de vitamina D2 e D3	5
Tabela 2. Composição das dietas AIN-93 M (para roedores adultos).....	24
Tabela 3. Concentração por quilograma de dieta (U/kg de dieta) das vitaminas que compõem o mix vitamínico na dieta AIN-93 M (para roedores adultos)	25
Tabela 4. Grupos funcionais de genes envolvidos em vias que estão associadas com a hipertensão	36
Tabela 5. Relação entre a massa do rim, fígado e coração e a massa corpórea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3.....	41
Tabela 6. Concentrações de 25-hidroxivitamina D3 no plasma dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (Wistar Kyoto - WKY) alimentados com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3.....	42
Tabela 7. Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e total de eritrócitos (PCE+ eritrócitos normocromáticos - NCE) na medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) após tratamento com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas	47
Tabela 8. Concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona (GSH) no rim e coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) após 12 semanas de tratamento com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3.....	53
Tabela 9. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no rim de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência <i>Rpl13a</i> , <i>Ldha</i> e <i>Actb</i>	57
Tabela 10. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no rim de ratos Wistar Kyoto (WKY), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência <i>Rpl13a</i> , <i>Ldha</i> e <i>Actb</i>	60
Tabela 11. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência <i>Rpl13a</i> , <i>Ldha</i> e <i>Actb</i>	63

Tabela 12. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no coração de ratos Wistar Kyoto (WKY), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência *Rpl13a*, *Ldha* e *Actb* 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% DNA na cauda	Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides
ACE	Enzima Conversora de Angiotensina I
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina II
ACTA2	Alfa-actina da musculatura lisa
AGT	Angiotensinogênio
AGTR1A	Receptor da angiotensina II, subtipo 1a
AGTR1B	Receptor de angiotensina II, subtipo 1b
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
AIN-93	<i>American Institute of Nutrition</i> , reunião de 1993
ANOVA	Análise de variância
AVP	Arginina vasopressina
CACNA1C	Canal da cálcio voltagem-dependente, subunidade alfa 1C
CEUA	Comissão de Ética no Uso dos Animais
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
DRD3	Receptor de dopamina D3
DRD5	Receptor de dopamina D5
ECE	Enzima conversora de endotelina 1
EDN1	Endotelina 1
EDNRA	Receptor de endotelina tipo A
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
GSH	Glutathiona
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
KCNMA1	Canal de potássio de larga condutância ativado por cálcio
MED	<i>Minimal Erythematol Dose</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

REN	Renina
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SCNN1A	Canal de sódio não-voltagem dependente, subunidade 1 alfa
SCNN1G	Canal de sódio não-voltagem dependente, subunidade 1 gama
sEH	<i>soluble epoxide hydrolase</i>
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>
VDRE	<i>Vitamin D Response Elements</i>
Vit D3	Vitamina D3
WKY	Wistar Kyoto

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. NUTRIGENÔMICA	1
1.2. VITAMINA D	3
1.3. HIPERTENSÃO ARTERIAL E VITAMINA D	11
1.4. RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. ANIMAIS	23
3.2. ESTABELECIMENTO DAS DIETAS DE VITAMINA D3 E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
3.3. AGENTES QUÍMICOS	26
3.4. MÉTODOS.....	27
3.4.1. Ganho de massa corpórea e consumo de dieta	27
3.4.2. Massa relativa do rim e do coração	27
3.4.3. Aferição da pressão arterial	27
3.4.4. Quantificação de 25-hidroxivitamina D3 no plasma	28
3.4.5. Ensaio do cometa em células do sangue periférico, coração e rim	28
3.4.6. Teste do Micronúcleo.....	30
3.4.7. <i>Burst</i> oxidativo em neutrófilos do sangue periférico.....	32
3.4.8. Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona (GSH) no rim e coração	33
3.4.9. Quantificação de fibrose intersticial no rim por análise histológica	34
3.4.10. Análise da expressão gênica por <i>RT² PROFILER^{TM} PCR Arrays</i> no rim e coração	34
3.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1. AVALIAÇÃO DO GANHO DE MASSA CORPÓREA E CONSUMO DE DIETA	39

4.2. VARIAÇÃO DA MASSA RELATIVA DO RIM E CORAÇÃO	41
4.3. CARACTERIZAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E DEFICIÊNCIA EM VITAMINA D3 APÓS QUANTIFICAÇÃO PLASMÁTICA	42
4.4. ALTERAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	43
4.5. AVALIAÇÃO DOS DANOS AO DNA EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO, RIM E CORAÇÃO PELO ENSAIO DO COMETA.....	45
4.6. AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA NA MEDULA ÓSSEA E NO SANGUE PERIFÉRICO	46
4.6. AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO	51
4.7. AVALIAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS TBARS E GSH NO RIM E CORAÇÃO	52
4.8. QUANTIFICAÇÃO DA FIBROSE INTERSTICIAL NO RIM	53
4.9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A HIPERTENSÃO NO RIM E CORAÇÃO	55
5. DISCUSSÃO	62
5. 1. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO E DEFICIÊNCIA EM VITAMINA D3 SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, QUANTIFICAÇÃO PLASMÁTICA, DANOS GENÉTICOS, PRODUÇÃO DE ERO, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E FIBROSE RENAL	62
5.2. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA VITAMINA D3.....	69
5.2.1. No rim	70
5.2.2. No coração	77
5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICES	117
ANEXOS	122

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nutrigenômica

Fatores ambientais como os poluentes atmosféricos, o cigarro, o álcool, os medicamentos e a dieta são capazes de regular a expressão de genes e atuar sobre a atividade celular, estabelecendo uma interação gene-ambiente (GOHLKE et al., 2009). A dieta é o fator ambiental de maior exposição ao longo do ciclo de vida dos animais, e estima-se que os componentes da dieta são os principais moduladores da expressão gênica em todos os estágios do desenvolvimento humano (DARNTON-HILL; NISHIDA; JAMES, 2004).

Dietas desbalanceadas, desde deficiências até o excesso de consumo de micronutrientes, macronutrientes e compostos bioativos da dieta, podem regular a expressão gênica, alterar o metabolismo celular e potencializar o surgimento de doenças como as cardiovasculares e respiratórias, cânceres e diabetes (FENECH et al., 2011; KAPUT; RODRIGUEZ, 2004; MULLER; KERSTEN, 2003).

A Nutrigenômica é uma ciência multidisciplinar que, com auxílio de pesquisadores das áreas de Genética, Biologia Molecular e Nutrição, vem se desenvolvendo para investigar as interações gene-dieta e suas influências, na estabilidade do DNA e na modulação da expressão gênica (NEEHA; KINTH, 2013). Do ponto de vista dessa ciência, os nutrientes são sinais que, detectados por sistemas celulares, podem influenciar a expressão de genes, proteínas e também a produção de metabólitos (AFMAN; MULLER, 2006).

Por meio da Nutrigenômica tem-se demonstrado que a dieta não é apenas uma fonte de energia para os tecidos, mas que pode atuar regulando, direta ou indiretamente, a expressão gênica e os eventos epigenéticos (NORHEIM et al., 2012). A Nutrigenômica avalia como os compostos da dieta contribuem para estabelecer um fenótipo (KANG, 2012; MANSEGO et al., 2013), e tem por objetivo compreender como a dieta interage com os genes e influencia a fisiologia normal e a patofisiologia, combinando as tecnologias avançadas da biologia molecular aos estudos citogenéticos clássicos (MATHERS, 2002).

Com a introdução das tecnologias "ômicas", fornecendo dados em grande escala a respeito das respostas biológicas em relação aos componentes da dieta, o conhecimento sobre a ação preventiva da dieta começou a crescer rapidamente

(VAN BREDA et al., 2015). As pesquisas em Nutrigenômica utilizam como principais ferramentas moleculares de estudo a transcriptômica, a proteômica, a metabolômica e a epigenética, além das interações proporcionadas por essas tecnologias, a fim de que haja uma maior compreensão dos efeitos dos nutrientes e compostos bioativos da dieta a nível molecular e tecidual, e que as vias regulatórias influenciadas pela dieta sejam identificadas (DAVIS; MILNER, 2004). Por meio da análise dos transcritos, feita pela quantificação do RNA mensageiro produzido por um gene, é possível avaliar a resposta de um gene a um nutriente específico ou à sua deficiência/ausência em diferentes tecidos (AFMAN; MULLER, 2006; VAN OMMEN; STIERUM, 2002).

A transcriptômica possibilita uma análise inicial da atividade dos genes, e direciona os estudos subsequentes em proteômica e metabolômica, atuando como uma ferramenta em grande escala para os estudos em Nutrigenômica. Tecnologias transcriptômicas como os *arrays* têm avaliado com sucesso as interações gene-dieta, uma vez que são ferramentas sensíveis e informativas para avaliar o efeito nutricional, incluindo variações mínimas e respostas metabólicas à dieta (FUKASAWA et al., 2010; HARVEY; MCARDLE, 2008).

Além das "ômicas", o campo da Nutrigenômica também inclui os estudos dos efeitos da dieta sobre a estabilidade genômica, que são avaliados pela presença ou ausência de danos ao DNA, a nível molecular e cromossômico. Os danos ao DNA podem ser identificados por meio de vias complementares, como o de quebras de fitas simples e duplas do DNA, mensurados pelo ensaio do cometa, e de quebra ou perda de cromossomos, avaliado pelo teste do micronúcleo ou análise de aberrações cromossômicas (FENECH et al., 2011). É crescente a necessidade de se estudar os efeitos da deficiência ou do excesso de nutrientes importantes para a alimentação humana, uma vez que o DNA está continuamente susceptível a alterações causadas por uma variedade de mecanismos, entre os quais as mutações pontuais, as modificação de bases devido à reação com as espécies reativas de oxigênio (ERO), as perdas ou ganhos de cromossomos, quebras ou rearranjos cromossômicos, a redução telomérica e o silenciamento gênico devido à metilação de regiões promotoras de determinados genes (BULL; FENECH, 2008).

Muitos micronutrientes, macronutrientes, minerais e outros compostos da dieta atuam interagindo, direta ou indiretamente, com o DNA. Macronutrientes como proteínas, carboidratos e gorduras; minerais como o cálcio, o ferro e o zinco;

micronutrientes como as vitaminas; e compostos da dieta, como os flavonoides e as fibras, compartilham a propriedade de regular a expressão de genes e modular eventos epigenéticos (MULLER; KERSTEN, 2003).

Entre os micronutrientes reguladores da expressão gênica, destacam-se as vitaminas lipossolúveis, como as vitaminas A, E e D, especialmente pelos mecanismos pelas quais exercem suas ações intracelulares (MCGRANE, 2007; MULLER; KERSTEN, 2003). As vitaminas, em sua maioria, também são requeridas como cofatores para enzimas envolvidas na síntese e no reparo do DNA, na prevenção dos danos oxidativos e na manutenção da metilação do DNA (FENECH, 2003).

As vitaminas A, E e D regulam a expressão gênica de forma direta, por meio da ligação do micronutriente com seu respectivo receptor nuclear (que atua como um fator de transcrição, possibilitando que haja uma ligação entre a RNA polimerase e o sítio de transcrição do gene), ativando ou inibindo a expressão dos genes responsivos a essas vitaminas (MULLER; KERSTEN, 2003; NAGPAL; CHANDRARATNA, 1998).

A vitamina D é um micronutriente muito estudado por estar envolvido com processos relacionados à progressão de doenças crônicas não-transmissíveis, como a obesidade, o diabetes *mellitus* tipo 1 e 2, os cânceres e as doenças cardiovasculares, e por interagir com o DNA de forma direta, por meio da ligação da sua forma ativa com o seu receptor nuclear específico (HOLICK, 2004; HOLICK, 2004; MUSCOGIURI et al., 2015; PILZ et al., 2015). Recentemente, estudos têm demonstrado que o receptor nuclear específico da vitamina D, além de atuar na modulação da expressão gênica em diversos tecidos, também é regulado por fatores epigenéticos e ambientais, aumentando a complexidade da relação vitamina D, genes e o ambiente (SACCONE; ASANI; BORNMAN, 2015). Uma maior compreensão da interação entre a vitamina D e os genes poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias para a prevenção de doenças e promoção da saúde.

1.2. Vitamina D

Vitamina D é o termo geral utilizado para referir-se a dois micronutrientes lipofílicos relacionados, o ergocalciferol (vitamina D₂) e o colecalciferol (vitamina D₃), que compartilham a capacidade de modular efeitos endócrinos, como a

homeostase do paratormônio e o metabolismo do cálcio e do fósforo. É reconhecido que a vitamina D (D2 ou D3) atua como um hormônio endócrino e está envolvida em diversos processos celulares, como a diferenciação e a proliferação celular, e tem um papel relevante no desenvolvimento de doenças não transmissíveis (KIM; CHUNG; KIM, 2011; ZITTERMANN et al., 2013).

Classicamente, a vitamina D contribui para manter as concentrações séricas e extracelulares de cálcio constantes, e atua modulando a absorção de fósforo pelo intestino (LEVINE, 2003). Na manutenção da massa óssea, a forma ativa da vitamina D possibilita que ocorra a mineralização óssea normal, além de mobilizar o cálcio ósseo para a circulação (NORMAN, 2001). Atualmente, estudos têm demonstrado que a vitamina D participa de múltiplos processos celulares, além de estar relacionada ao desenvolvimento e progressão de doenças. Ela está envolvida na modulação do sistema imune (YIN; AGRAWAL, 2014), atua na resposta à insulina (WALLACE et al., 2015), e a sua deficiência está relacionada ao desenvolvimento da doença renal crônica (KIM; KIM, 2014) e à progressão de doenças cardiovasculares (FORD et al., 2014).

A vitamina D2 é produzida após a incidência da radiação ultravioleta B (UVB) no esterol ergosterol, e pode ser obtida pela ingestão do cogumelo shiitake, de gemas de ovos, de alimentos fortificados ou como suplemento alimentar. A vitamina D3 é obtida pela conversão do 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D3 na camada de Malpighi da epiderme, após exposição à radiação UVB, ou encontrada na dieta (LAVIE; LEE; MILANI, 2011). Estudos apontam que, em humanos, a vitamina D3 é mais efetiva na conversão da forma ativa da vitamina D (1,25-dihidroxitamina D) do que a vitamina D2, sendo clinicamente mais relevante (ARMAS; HOLLIS; HEANEY, 2004; HEANEY et al., 2011).

Existe um número limitado de alimentos não fortificados que contém naturalmente a vitamina D3, e as maiores fontes são os peixes gordurosos como o salmão, a sardinha, a cavalinha e o atum, e o óleo de fígado de bacalhau. O leite e os produtos lácteos, o suco de laranja, a barra de cereais e a margarina destacam-se entre os alimentos fortificados com as vitaminas D2 ou D3 (BAILEY et al., 2010; HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2013). As principais fontes alimentares das vitaminas D2 e D3 estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Fontes de vitamina D2 e D3

Fontes	Vitamina D (UI)
Fontes Naturais	
Óleo de fígado de bacalhau	De 400-1000 UI de vitamina D3 por colher de chá
Salmão	De 600-1000 UI de vitamina D3 por 100 gramas
Salmão enlatado	De 300-600 UI de vitamina D3 por 100 gramas
Sardinha enlatada	Em média, 300 UI de vitamina D3 por 100 gramas
Cavalinha enlatada	Em média, 250 UI de vitamina D3 por 100 gramas
Atum enlatado	Em média, 240 UI de vitamina D3 por 100 gramas
Cogumelo shiitake fresco	Em média, 100 UI de vitamina D2 por 100 gramas
Cogumelo shiitake seco ao sol	Em média, 1600 UI de vitamina D2 por 100 gramas
Gema de ovo	Em média, 20 UI de vitamina D2 ou D3
Luz do sol/ radiação UVB	Em média 20000 UI, equivalente a uma exposição capaz de produzir uma dose eritemal mínima (<i>Minimal Erythema Dose</i> , MED)

Alimentos fortificados

Leite	Em média, 100 UI de vitamina D3 (geralmente) por 225 gramas
Suco de laranja	Em média, 100 UI de vitamina D3 (geralmente) por 225 gramas
Iogurte	Em média, 100 UI de vitamina D3 (geralmente) por 225 gramas
Manteiga	Em média, 60 UI de vitamina D3 (geralmente) por 100 gramas
Margarina	Em média, 430 UI de vitamina D3 (geralmente) por 100 gramas

Unidade Internacional (UI) = 25 ng. Adaptado de Hossein-Nezhad e Holick (2013).

A vitamina D (D2 ou D3), obtida de fontes da dieta, é absorvida no intestino delgado na presença de ácidos biliares. Após a absorção, é secretada, incorporada aos quilomícrons e transportada pelo sistema linfático na circulação venosa, até o fígado. A vitamina D, sintetizada na pele ou ingerida pela dieta, também pode ser

armazenada nos adipócitos e liberada, quando necessário, para o organismo (HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2012).

Tanto a vitamina D obtida da exposição ao sol quanto a vitamina D proveniente da dieta, após serem absorvidas, necessitam de um metabolismo adicional para atingir a sua forma ativa. Quando não estocada nos adipócitos, a vitamina D₂ ou D₃ é transportada para o fígado pela proteína transportadora de vitamina D (DBP, *vitamin D binding protein*), onde é hidroxilada no carbono 25 pela enzima 25-hidroxilase (CYP2R1) em 25-hidroxivitamina D no fígado, e posteriormente convertida em 1,25-dihidroxivitamina D pela enzima 25-hidroxivitamina D 1- α -hidroxilase (CYP27B1) no rim (CASTRO, 2011) (Figura 1).

Figura 1. Síntese e metabolismo da vitamina D. Adaptado de Kitson; Roberts (2012).

A vitamina D₃, assim como os hormônios esteroides, tireoidianos e retinoides, age por meio da ligação a receptores hormonais nucleares, que possuem a propriedade de se ligarem a sítios específicos no DNA e modularem a expressão gênica (LAVIE; LEE; MILANI, 2011). Os efeitos biológicos da forma ativa da vitamina

D3 são mediados pelo receptor da vitamina D (VDR, *Vitamin D Receptor*), um fator de transcrição que pertence à família dos receptores hormonais nucleares 1 (CASTRO, 2011; EYLES et al., 2005).

O VDR está presente em vários tecidos, glândulas e células do organismo humano, como o tecido e glândulas mamárias, a próstata, os macrófagos e o cérebro, e o mais relevante é que esses locais não apenas expressam o VDR, mas também apresentam a capacidade de converter a 25-hidroxivitamina D em 1,25-dihidroxivitamina D quando as concentrações plasmáticas não estiverem adequadas (HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2012; HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2013).

Na regulação da expressão gênica pela vitamina D, o VDR exerce um papel crucial. A forma ativa da vitamina D é transportada na circulação pela DBP e, no núcleo das células-alvo, forma um complexo heterodímero com o VDR e o receptor do retinoide X (RXR, *Retinoid X Receptor*), iniciando a cascata de interações moleculares que modula a expressão de genes (KLIEWER et al., 1992). Em sua estrutura (Figura 2), o VDR apresenta domínios específicos para o acoplamento da forma ativa da vitamina D, para a heterodimerização com o RXR, ligação a sítios específicos do DNA e ativação da expressão gênica (MOTIWALA; WANG, 2011).

Figura 2. Representação esquemática dos domínios de ligação do receptor da vitamina D, o VDR (*Vitamin D Receptor*). Adaptado de Brown; Dusso; Slatopolsky (1999).

Mais detalhadamente, a regulação da expressão gênica pela vitamina D ocorre do seguinte modo: a forma ativa da vitamina D (1,25-dihidroxivitamina D) liga-se à porção hidrofóbica do VDR, induzindo uma mudança conformacional e a formação do complexo transcricional hormônio-receptor. O complexo 1,25-

dihidroxitamina D - VDR é heterodimerizado com o RXR, e o complexo formado pela 1,25-dihidroxitamina D - VDR - RXR acopla-se a sequências específicas, localizadas na região promotora do gene, nos chamados elementos de resposta à vitamina D (VDRE, *Vitamin D Response Elements*) (CASTRO, 2011). Para que ocorra o aumento ou a diminuição da expressão de genes, o complexo heterodímero recruta complexos de proteínas regulatórias, e são essas moléculas coativadoras ou correpressoras que permitem a ligação do VDR à maquinaria de transcrição, desencadeando a ativação ou a repressão da expressão gênica (MCKENNA; O'MALLEY, 2002). Esse mecanismo no qual a vitamina D modula a expressão gênica é conhecido como via genômica (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática da modulação da expressão gênica pela vitamina D. $1,25 [OH]_2 D3$ (1,25 dihidroxivitamina D3, forma ativa da vitamina D3), DBP (*Vitamin D Binding Protein*, proteína transportadora da vitamina D), VDR (*Vitamin D Receptor*, receptor da vitamina D), RXR (*Retinoid X Receptor*, receptor do retinóide X). Adaptado de: Reddy Vanga et al. (2010).

Um único estudo identificou mais de 200 genes que sofrem influência direta da vitamina D e 2.776 sítios de ação para o VDR, localizados próximos a genes associados à susceptibilidade para doenças como a esclerose múltipla, lúpus, artrite reumatoide, leucemia linfocítica crônica e câncer colorretal (RAMAGOPALAN et al., 2010). Outro estudo que combinou a técnica de *microarray* e análise *in silico*

mostrou que a forma ativa da vitamina D tem mais de 900 genes-alvo em potencial, sendo possivelmente responsável pela modulação de aproximadamente 3% do genoma humano (PILZ et al., 2009; WANG et al., 2005). Outras investigações têm sugerido que a forma ativa da vitamina D regula, direta ou indiretamente, a expressão de mais de 2.000 genes no organismo humano (HOLICK et al., 2011; NAIR; MASEEH, 2012).

A vitamina D também pode atuar por vias não genômicas, de respostas rápidas, que envolvem a ligação da forma ativa da vitamina D ao VDR associado à membrana plasmática. Os efeitos definidos como não genômicos são ações transitórias que estão relacionados com o transporte transmembrana de íons cálcio, ou com as vias de transdução de sinais, como o AMP cíclico e a fosfolipase C (REVELLI; MASSOBRIO; TESARIK, 1998).

Devido à influência que a vitamina D exerce em vários processos de equilíbrio metabólico sistêmico, é importante que as metodologias utilizadas para a avaliação da concentração plasmática de vitamina D apresentem acurácia e expressem adequadamente o seu grau de reserva no organismo. A melhor indicadora do conteúdo corporal de vitamina D é a concentração sérica de 25-hidroxivitamina D₃, que além de ser um excelente marcador biológico de exposição, também é determinante para a quantificação de vitamina D no plasma. Embora a 1,25 dihidroxivitamina D seja mais potente que a 25-hidroxivitamina D, ela não é comumente utilizada para determinar o *status* de vitamina D, uma vez que está presente na circulação em concentrações muito inferiores à de 25-hidroxivitamina e possui uma meia-vida muito curta (menor do que 4 horas) (CASTRO, 2011).

A concentração ideal de 25-hidroxivitamina D é aquela necessária para manter as concentrações adequadas de paratormônio, e que não permita o aparecimento de distúrbios clínicos e metabólicos relacionados à sua deficiência. No entanto, a faixa de normalidade da 25-hidroxivitamina D ainda não é consenso na literatura (CASTRO, 2011). As diretrizes do *Institute of Medicine* (IOM) e da *Endocrine Society*, ambas as organizações dos Estados Unidos, diferem na classificação do *status* de vitamina D (MITRI; PITTAS, 2014).

O IOM concluiu que concentrações plasmáticas próximas a 20 ng/mL de 25-hidroxivitamina D são consistentes com concentrações adequadas de vitamina D, e as superiores a 50 ng/mL podem trazer efeitos adversos. Segundo a *Endocrine Society*, as concentrações sanguíneas superiores a 30 ng/mL de 25-hidroxivitamina

D proporcionam níveis séricos adequados de vitamina D, e não há um limite máximo relacionado ao aparecimento de efeitos adversos (MITRI; PITTAS, 2014; ROSEN et al., 2012). Em ratos, concentrações plasmáticas de 25-hidroxivitamina D acima de 643 ng/mL estão relacionadas a efeitos tóxicos graves, que resultam em hipercalcemia e, com o aumento das concentrações, em morte do animal (JONES, 2008; SHEPHARD; DELUCA, 1980).

O IOM recomenda a ingestão diária de 600 UI de vitamina D para indivíduos na faixa etária de 9 a 70 anos, e de 800 UI para indivíduos acima de 70 anos. A *Endocrine Society* sugere que a ingestão diária seja de 1500-2000 UI de vitamina D, a fim de que concentrações séricas acima de 30 ng/mL sejam alcançadas (MITRI; PITTAS, 2014). Para ratos adultos, 1.000 UI de vitamina D3 por kg de dieta (concentração recomendada pelo *American Institute of Nutrition*, Reeves; Nielsen; Fahey, 1993), resulta em níveis séricos de 12,7 ng/mL depois da ingestão de 16,5 g de dieta por dia, avaliado após 18 meses de tratamento (KEENEY et al., 2013).

A deficiência em vitamina D (considerando uma concentração de 25-hidroxivitamina D < 20 ng/mL) está presente em 30-50% da população humana (BREYSSE; GUILLOT; BERRUT, 2015; KENNEL; DRAKE; HURLEY, 2010; PILZ et al., 2009), e vem sendo associada ao desenvolvimento de inúmeras doenças, como a esclerose múltipla e o diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2, doença de Crohn (inflamação do intestino), infecções do trato respiratório superior, cânceres como o de cólon e o de mama, desordens neurocognitivas, como a doença de Alzheimer, e doenças cardiovasculares como a insuficiência cardíaca e a hipertensão (GROBER et al., 2013; HOLICK et al., 2011; LEE et al., 2008; PILZ et al., 2013; VANGA et al., 2010; ZITTERMANN et al., 2012). A deficiência em vitamina D vem sendo associada com o aumento da instabilidade cromossômica e do dano oxidativo na molécula de DNA (NAIR-SHALLIKER; ARMSTRONG; FENECH, 2012).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma parcela significativa da população mundial apresenta deficiência em vitamina D (CASTRO, 2011). Essa deficiência é particularmente observada em indivíduos de pele negra, uma vez que o elevado teor de melanina da pele reduz a eficácia da síntese de vitamina D após a exposição à radiação UVB (ROSTAND, 2010). No Brasil, estudos evidenciam a ocorrência de baixas concentrações de 25-hidroxivitamina D em cerca de 60% dos adolescentes (PETERS et al., 2012), 40 a 68% dos adultos jovens (PREMAOR et al., 2008) e 42 a 83% dos idosos (BANDEIRA et al., 2010; PREMAOR et al., 2008).

O reconhecimento da importância da vitamina D na homeostase sistêmica, e o aumento de publicações que identificam uma inadequação global das concentrações séricas de vitamina D têm despertado o interesse da comunidade científica, uma vez que a vitamina D está relacionada ao desenvolvimento de doenças do sistema imune, hormonal e cardiovascular (PILZ et al., 2013).

1.3. Hipertensão Arterial e Vitamina D

As doenças cardiovasculares representam um grande problema de saúde pública. Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que as enfermidades envolvendo o sistema cardiovascular são uma das principais causas de morte em todo o mundo, representando, em média, 30% dos casos (LAZZINI; LAZZINI, 2009). No Brasil, as doenças crônicas não-transmissíveis (câncer, doença respiratória crônica, diabetes e doenças cardiovasculares) foram responsáveis por 73,9% dos óbitos no ano de 2010, e dentre os óbitos ocorridos, a principal causa foi a ocorrência de doenças cardiovasculares (GUIMARÃES et al., 2015).

Em países em desenvolvimento como o Brasil, o aumento da expectativa de vida e o crescimento da população idosa, associados às alterações nos padrões da dieta e do estilo de vida, estão relacionados ao aumento dos casos de doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão arterial (ILIESCU; ZANOSCHI, 2005). A hipertensão arterial é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças que acometem os sistemas cardíaco, nervoso, renal e vascular periférico, além de ser uma das principais causas de redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos adultos (BAKRIS et al., 2013; LATADO et al., 2006).

Conceitualmente, a hipertensão arterial é uma doença sistêmica que envolve alterações na estrutura das artérias e da musculatura cardíaca associada à disfunção endotelial, constrição e remodelamento da musculatura lisa vascular. Até o momento, a hipertensão arterial é diagnosticada a partir dos dados obtidos por meio de aferição sistólica e diastólica, nos quais níveis pressóricos iguais ou superiores a 140/90 mmHg, obtidos em duas ou mais aferições, constataam a doença (MANCIA et al., 2013).

Quanto à sua etiologia, classifica-se a hipertensão arterial em essencial e secundária. A essencial é multifatorial, e a secundária está envolvida com a presença de uma doença de base. A hipertensão secundária tem prevalência de 3-5% dos casos, enquanto a hipertensão essencial compreende aproximadamente 95-

97% e é resultante da interação de fatores genéticos (herança poligênica) e ambientais, como o consumo excessivo de sal, estresse, tabagismo, sobrepeso e obesidade (COWLEY, 2006).

A pressão arterial é controlada por mecanismos de regulação neural, pelo sistema nervoso autônomo e pela regulação humoral, realizada por substâncias liberadas pelas células endoteliais e justaglomerulares, e envolvidas com o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Alterações em um ou ambos os mecanismos de controle da pressão arterial poderão resultar em um quadro de hipertensão arterial (MACHADO; MAUAD; GLASS, 1992).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona corresponde a um complexo eixo endócrino, parácrino e autócrino que exerce papel relevante na manutenção da estabilidade hemodinâmica cardiovascular e renal. A ativação desse sistema contribui para a elevação da pressão arterial (AFMAN; MULLER, 2006). No corpo humano, existem diferentes tipos de sistema renina-angiotensina-aldosterona: o circulante, conhecido há bastante tempo; o local, caracterizado pela capacidade de síntese de angiotensina II em tecidos como o cardíaco, renal, cerebral e adiposo (DANSER, 2003; HALLER et al., 2006; SAKAI; SIGMUND, 2005); e o intracelular, caracterizado mais recentemente (GOOSSENS et al., 2007).

A renina é uma enzima proteolítica sintetizada como pré-pró-renina, que é clivada em pró-renina e posteriormente em renina, onde é armazenada e liberada após estímulos como *feedback* negativo por ação direta da angiotensina I, e alterações na concentração de cloreto de sódio detectadas pela mácula densa do tubo distal. Com a liberação da renina pelas células justaglomerulares renais, a cascata bioquímica do sistema renina-angiotensina-aldosterona é iniciada (LAVIE; LEE; MILANI, 2011).

A renina tem grande especificidade pelo angiotensinogênio, seu substrato que é sintetizado no fígado. Uma vez sintetizado, o angiotensinogênio é clivado pela renina na circulação, formando a angiotensina I que, posteriormente, é convertida na angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina I (ACE, *Angiotensin I Conversion Enzyme 1*), que é encontrada no endotélio vascular de inúmeros tecidos. Embora a angiotensina II seja o principal peptídeo vasoativo circulante do sistema renina-angiotensina-aldosterona, outros peptídeos como a angiotensina III, a angiotensina IV e a angiotensina 1-7 também são produzidos pelo sistema (HAULICA et al., 2004). A angiotensina II se liga e ativa receptores específicos (AT1

e AT2), promovendo vasoconstrição e estimulando a liberação de aldosterona pela glândula adrenal. O hormônio aldosterona promove a secreção do íon potássio (K^+) e a reabsorção do íon sódio (Na^+). A vasoconstrição e a reabsorção de Na^+ resultam no aumento da pressão arterial (CHOPRA; CHERIAN; JACOB, 2011; LAVIE; LEE; MILANI, 2011).

A vitamina D tem conhecida influência no sistema renina-angiotensina-aldosterona por atuar regulando negativamente a expressão do gene da pré-pró-renina, enzima precursora da renina. Segundo modelo proposto por Yuan et al. (2007), a 1,25 dihidroxivitamina D ligada ao VDR silencia a expressão do gene da pré-pró-renina pela ligação ao fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding protein*). Como resultado, a proteína CREB não é capaz de se ligar ao elemento de resposta CRE (*cAMP response element*), que se localiza na região promotora do gene da pré-pró-renina, e não ocorre a formação do complexo CREB-CRE-CBP/p300, impedindo a sua expressão, o que leva a uma diminuição das concentrações de renina (Figura 4).

CREB: *cAMP response element-binding protein*
 CRE: *cAMP response element*
 Pol II: RNA polimerase II

CBP/p300: proteína coativadora transcricional
 ⓓ : 1,25(OH)₂D₃
 VDR: receptor da vitamina D

Figura 4. Representação esquemática do modelo de repressão da expressão do gene da pré-renina pela forma ativa da vitamina D3, proposto por Yuan et al. (2007). Adaptado de: Yuan et al. (2007).

A vitamina D também participa do controle da função cardíaca e da pressão arterial por meio da regulação do crescimento das células musculares lisas e da contratilidade miocárdica, além de atuar sobre o endotélio, regulando a vasodilatação (LEE et al., 2008; SUGDEN et al., 2008). Outros efeitos da vitamina D sobre o sistema cardiovascular incluem a regulação da secreção dos hormônios

natriuréticos, das citocinas inflamatórias e da proliferação dos cardiomiócitos (AYPAK; TUREDI; YUCE, 2013; VANGA et al., 2010).

Estudos apontam que as concentrações plasmáticas de vitamina D3 estão inversamente relacionadas à pressão arterial e à atividade da renina plasmática em indivíduos hipertensos (LI et al., 2002). A primeira evidência da associação entre a baixa radiação solar UVB (essencial para a síntese de vitamina D) e a mortalidade cardiovascular, mostrando uma relação inversa, foi relatada em 1981 (SCRAGG, 1981). A partir de então, a associação entre a deficiência em vitamina D e a elevada incidência de eventos cardiovasculares e mortalidade têm sido confirmada em muitos estudos (DRECHSLER et al., 2010; MATYJASZEK-MATUSZEK; LENART-LIPINSKA; WOZNIAKOWSKA, 2015; ZITTERMANN et al., 2012).

Além de atuar como um importante fator no desenvolvimento da hipertensão, a deficiência em vitamina D3 também pode estar envolvida com a hipertrofia das células musculares lisas e do ventrículo esquerdo, fibrose, disfunção endotelial, calcificação do miocárdio, aumento da inflamação e indução de fibrose cardíaca, hepática e renal (LISS; FRISHMAN, 2012).

A fibrose renal é uma das complicações associadas ao desenvolvimento e progressão da hipertensão. Ocorre devido a uma acumulação anormal de colágeno ao redor dos vasos sanguíneos renais, e contribui para o remodelamento da vasculatura e progressão da insuficiência renal (LEKGABE et al., 2005). Um estudo relatou um forte envolvimento da deficiência em vitamina D3 com a fibrose no rim, mostrando que baixas concentrações de vitamina D3 são um fator agravante de dano tubulointersticial, progressão de fibrose e insuficiência renal aguda (GONCALVES et al., 2014). Em contrapartida, outros estudos demonstraram que a suplementação com a forma ativa da vitamina D3 é capaz de atenuar a quantidade de fibrose renal em modelo de camundongos *Homozygous Klotho mutant* (KI/KI), que naturalmente exibiam elevada porcentagem de fibrose renal (SUN et al., 2014), e em modelo de rato com nefropatia diabética (TIAN et al., 2014).

Na regulação da pressão arterial, estima-se que um grande número de genes está potencialmente envolvido (BUTLER, 2010). Estimativas de herdabilidade sugerem que 15-60% da variação da pressão sistólica e diastólica podem ser atribuídas a fatores genéticos (NORTON; BROOKSBANK; WOODIWISS, 2010). Dessa forma, muitos genes candidatos têm sido investigados, incluindo os que codificam componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona, aducinas, β -

adrenoreceptores e proteínas regulatórias de sinalização (ROSSKOPF et al., 2007). No entanto, o exato papel de muitos destes genes no desenvolvimento da hipertensão ainda é pouco compreendido (BUTLER, 2010).

Avanços na biologia molecular têm tornado possível o monitoramento simultâneo de vários genes relacionados à hipertensão (PRAVENEC et al., 2003). A tecnologia transcriptômica de *microarrays* é um dos recursos usados para aumentar a probabilidade de caracterização de funções biológicas, sendo possível obter, simultaneamente, a expressão de múltiplos genes (STORHOFF et al., 2004). O sistema RT² Profiler™ PCR Arrays, que representa a união da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real e a capacidade de avaliação de múltiplos genes do *microarrays*, pode ser aplicado ao estudo de diversas vias metabólicas (BALUCHAMY et al., 2010), com o potencial de identificar genes que podem ser regulados pela vitamina D, bem como indicar seus possíveis alvos moleculares.

Além da influência de múltiplos genes, as espécies reativas de oxigênio (ERO) também estão envolvidas na patogênese da hipertensão arterial, e estudos têm demonstrado que a vitamina D tem a capacidade de modular sistemas celulares envolvidos com o balanço do estado redox e com a resposta ao estresse oxidativo (BANAKAR et al., 2004). A 1,25 dihidroxivitamina D pode atuar como pró-oxidante ou como antioxidante, de acordo com suas concentrações teciduais, e um estudo demonstrou que a redução das suas concentrações está envolvida com alterações nas enzimas antioxidantes no tecido muscular de ratos com miopatia alcoólica (GONZALEZ-REIMERS et al., 2010).

As ERO podem ser produzidas no endotélio, no músculo liso e nas células mesenquimais. Na hipertensão arterial, as fontes mais importantes de ERO são a xantina oxidase (XO), a óxido nítrico sintase (NOS) desacoplada e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A produção de ERO ocorre por meio das reações de oxiredução do oxigênio (O₂) a água (H₂O), podendo ser formados radicais livres como o ânion superóxido [O₂^{•-}], o radical hidroxil [OH[•]] e o óxido nítrico (NO), e espécies não-radicalares derivadas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio [H₂O₂] e o peroxinitrito [ONOO⁻] (COLLETT et al., 2013; TOUYZ, 2003).

O aumento da atividade da NADPH oxidase, principal enzima envolvida com o *burst* (explosão) oxidativo dos neutrófilos, cuja ativação está relacionada com a geração de ERO, também atua na hipertensão essencial (SAGAR et al., 1992). Os neutrófilos são células fagocíticas muito importantes na defesa do organismo contra

partículas exógenas e um dos maiores produtores de ERO (BABIOR, 1988; EL-BENNA et al., 2005), e o *burst* oxidativo dos neutrófilos está associado com a disfunção endotelial, um desequilíbrio na produção de mediadores que regulam o tônus vascular, e um dos principais eventos na hipertensão arterial (CHATTERJEE et al., 2009; LEE et al., 2003).

Estudos têm sugerido que o estresse oxidativo encontrado nos neutrófilos de pacientes com hipertensão arterial ocorre devido ao aumento da atividade de NADPH oxidase, pelo surgimento do processo de peroxidação lipídica das membranas, e pela diminuição das concentrações mitocondrial e citosólica da enzima superóxido dismutase (DELLES; MILLER; DOMINICZAK, 2008; RAMASAMY et al., 2010).

Dados experimentais demonstraram que os ratos espontaneamente hipertensos (SHR- *Spontaneously Hypertensive Rats*) apresentam um aumento na geração de ERO como consequência de alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona (COLLETT et al., 2013). Os ratos SHR possuem, naturalmente, um aumento na produção do ânion superóxido nas artérias cerebrais e aorta, quando comparados aos seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) (FORTUNO et al., 2004; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; ZALBA et al., 2000).

1.4. Ratos Espontaneamente Hipertensos

O uso de modelos experimentais de hipertensão tem contribuído para a compreensão dos mecanismos envolvidos com a elevação da pressão arterial e auxiliado no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e intervenções dietéticas (DORNAS; SILVA, 2011).

No modelo de ratos SHR, o aumento da pressão arterial ocorre de forma progressiva, e a hipertensão arterial associa-se a outros fatores de risco, como a hipertrofia ventricular esquerda, resistência à insulina e a intolerância à glicose (LERMAN et al., 2005). Os ratos SHR são reconhecidos como um bom modelo experimental para o estudo da hipertensão essencial humana (DORNAS; SILVA, 2011), uma vez que apresentam um período pré-hipertensivo, uma fase de progressão da hipertensão e uma fase de hipertensão estabelecida, cuja consequência tardia é a insuficiência cardíaca congestiva (BELL et al., 2004).

Desenvolvido originalmente em 1959, a partir de endocruzamentos seletivos de ratos da linhagem Wistar Kyoto (WKY) no Japão, o modelo SHR tem sido estudado em estratégias terapêuticas anti-hipertensivas (OKAMOTO; AOKI, 1963). Em média, os ratos iniciam o desenvolvimento da pressão arterial com quatro a seis semanas de idade (pressão arterial sistólica aproximadamente entre 125-145 mmHg), apresentando níveis tensionais considerados hipertensivos entre a 7ª e a 15ª semanas (pressão arterial sistólica aproximadamente entre 150-180 mmHg), atingindo um platô entre a 16ª e a 40ª semanas (pressão arterial sistólica aproximadamente entre 180-220 mmHg). A partir do período de platô, a hipertensão se estabiliza até aproximadamente 18 meses, e após esse período, os animais desenvolvem um quadro de insuficiência cardíaca congestiva associada a uma elevada taxa de mortalidade (DORNAS; SILVA, 2011; YAMORI et al., 1984).

A provável causa do desenvolvimento de hipertensão arterial nos ratos SHR é essencial, ou seja, tem origem multifatorial, e decorre da estimulação do sistema nervoso simpático, ativado pela insulina e leptina. Entretanto, existe a hipótese de que a hipertensão seja secundária ao aumento da produção de endotelina, hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, decréscimo da taxa de filtração glomerular, retenção de água e sódio, diminuição da síntese de óxido nítrico ou aumento da produção de ERO (GOULDSBOROUGH; LINDOP; ASHTON, 2003). Outro fator possivelmente relacionado ao desenvolvimento da hipertensão arterial nos ratos SHR é a elevada atividade da enzima xantina oxidase (XO) na microcirculação mesentérica, que está associada ao aumento da produção de ânion superóxido [$O_2^{\cdot-}$] e consequente manutenção de tônus arteriolar elevado (FORTUNO et al., 2004).

Os ratos SHR apresentam hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, principalmente a nível tecidual, a qual resulta em aumento da produção de angiotensina II vascular (COLLETT et al., 2013). Esses animais também apresentam disfunção endotelial e uma biodisponibilidade reduzida de NO, provavelmente resultante de elevado estresse oxidativo endotelial (KERR et al., 1999).

Considerando o modelo de hipertensão SHR e seu controle normotenso WKY, e os estudos epidemiológicos que sugerem uma relação inversa entre as concentrações plasmáticas da forma ativa da vitamina D3 e a pressão arterial, a hipótese deste estudo é que a suplementação com a vitamina D3 atenuaria os efeitos da hipertensão arterial nos animais SHR, por meio da regulação da

expressão gênica e redução da pressão arterial sistólica, enquanto a dieta deficiente em vitamina D3 elevaria a pressão arterial sistólica dos animais SHR e WKY, induziria danos oxidativos e ao DNA, e modularia a expressão de genes envolvidos com vias de regulação da hipertensão arterial nos dois modelos experimentais.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito de dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3 sobre a modulação da expressão de genes relacionados à hipertensão no rim e coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY) adultos e, adicionalmente, avaliar as alterações na pressão arterial, nas concentrações plasmáticas de 25-hidroxivitamina D3, nos danos ao DNA, na instabilidade cromossômica, nos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo e na fibrose renal.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o consumo de dieta e possíveis alterações na massa corpórea e massa relativa do rim, fígado e coração de ratos adultos SHR e WKY, durante e após o período de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3;
- Quantificar a concentração de 25-hidroxivitamina D3 no plasma de ratos adultos SHR e WKY após o período de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3;
- Investigar alterações na pressão arterial sistólica de ratos adultos SHR e WKY durante as 12 semanas de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3;
- Determinar os danos ao DNA em células do sangue periférico, rim e coração de ratos adultos SHR e WKY, após o período de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3;
- Avaliar a estabilidade/instabilidade cromossômica na medula óssea e no sangue periférico de ratos adultos SHR e WKY antes, durante e após o período de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3;
- Investigar o *burst* oxidativo dos neutrófilos em ratos adultos SHR e WKY, após período de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3;

- Avaliar os parâmetros bioquímicos GSH e TBARS no rim e coração de ratos adultos SHR e WKY, após período de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3;
- Avaliar o efeito das dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3 sobre a fibrose no rim de ratos adultos SHR e WKY;
- Investigar a expressão de 84 genes relacionados com a hipertensão no rim e coração de ratos adultos SHR e WKY, após período de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos machos adultos das linhagens SHR e WKY com idade de 20 semanas, provenientes do Biotério do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), sob a supervisão do Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva. Os animais SHR e WKY foram recebidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), entre a 5ª e a 12ª semanas de idade, e mantidos em caixa de polietileno (2 animais por caixa), sob condições controladas de temperatura e ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas. Durante esse período inicial, receberam *ad libitum* água e ração Nuvilab CR1, da empresa Nuvital® (Canguri, Paraná, Brasil). A partir da 20ª semana de vida, os ratos SHR e WKY começaram a se alimentar com dieta seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition*, reunião de 1993 (AIN-93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). As dietas AIN-93 estão detalhadas no item 3.2 “Estabelecimento das dietas de vitamina D3 e delineamento experimental”.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP (FCFRP/USP), e o projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), sob o número de protocolo 12.1.344.53.6 (ANEXO A). Os animais foram divididos em 6 animais por grupo de tratamento (n=6).

3.2. Estabelecimento das dietas de vitamina D3 e delineamento experimental

Da vigésima (20ª) à trigésima segunda (32ª) semanas, os ratos SHR e WKY receberam dieta AIN-93 manutenção (AIN-93 M) para roedores adultos (REEVES, 1997; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), obtidas da empresa Rhoster® Indústria e Comércio Ltda, com alterações na concentração de vitamina D3 (Tabela 2). A composição das dietas com diferentes concentrações de vitamina D3 está descrita nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Composição das dietas AIN-93 M (para roedores adultos)

Componentes (g/kg dieta)	Dietas		
	Controle	Suplementada	Deficiente
Caseína	140,0	140,0	140,0
Amido de milho	483,29	483,29	483,29
Amido de milho dextrinizado	155,0	155,0	155,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Celulose	50,0	50,0	50,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0
Mix de minerais	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico	10,0	10,0	10,0
Vitamina D3	0,000025	0,00025	0
Bitartrato de colina	2,5	2,5	2,5
Tert-Butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008
L-Cistina	1,8	1,8	1,8

AIN-93 M: dieta AIN-93 manutenção. Vitamina D3 Rhoster® = 40.000.000 UI/g
 Fonte: Reeves; Nielsen; Fahey (1993).

A dieta controle consiste em uma dieta com conteúdo basal em vitamina D3 (1.000 UI/kg de dieta) (REEVES, 1997; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993); a dieta suplementada em vitamina D3 (10.000 UI/kg de dieta) corresponde a uma suplementação de 10x em relação à dieta controle; e a dieta deficiente em vitamina D3 (0 UI/kg de dieta) consiste na total remoção dessa vitamina da dieta (Tabela 3). As concentrações utilizadas foram estabelecidas a partir de dados da literatura sobre a ingestão diária e estudos de toxicidade da vitamina D3 (JONES, 2008; PILZ et al., 2009; ROSS, 2011; VIETH, 1999).

Tabela 3. Concentração por quilograma de dieta (U/kg de dieta) das vitaminas que compõem o mix vitamínico na dieta AIN-93 M (para roedores adultos)

Vitaminas	Controle	Dietas Suplementada	Deficiente
	U/kg de dieta	U/kg de dieta	U/kg de dieta
Ácido nicotínico (mg)	30	30	30
Pantotenato (mg)	15	15	15
Piridoxina (mg)	6	6	6
Tiamina (mg)	5	5	5
Riboflavina (mg)	6	6	6
Ácido fólico (mg)	2	2	2
Vitamina K (µg)	750	750	750
D-biotina (µg)	200	200	200
Vitamina B12 (µg)	25	25	25
Vitamina A (UI)	4000	4000	4000
Vitamina D3 (UI)	1.000	10.000	0
Vitamina E (UI)	75	75	75

AIN-93 M: dieta AIN-93 manutenção. U: unidade. Fonte: Reeves; Nielsen; Fahey (1993).

As dietas AIN-93 controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3 foram administradas durante 12 semanas aos ratos SHR e WKY. Desta forma, os animais foram divididos em 6 grupos de tratamento, como apresentado na Figura 5.

- Grupo 1: SHR com dieta controle em vitamina D3;
- Grupo 2: WKY com dieta controle em vitamina D3;
- Grupo 3: SHR com dieta suplementada em vitamina D3;
- Grupo 4: WKY com dieta suplementada em vitamina D3;
- Grupo 5: SHR com dieta deficiente em vitamina D3;
- Grupo 6: WKY com dieta deficiente em vitamina D3.

Figura 5. Esquema simplificado do delineamento experimental. S: semana.

Ao final dos experimentos (12^a semana), todos os animais SHR e WKY foram previamente anestesiados com ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e a eutanásia ocorreu por exsanguinação precedida de punção cardíaca, e os materiais biológicos (sangue periférico, plasma, rim e coração) foram coletados e armazenados em freezer -80°C.

3.3. Agentes Químicos

A laranja de acridina (CAS 10127-02-3), o *trypan blue* (CAS 72-57-1), o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, CAS 60-00-4), o triton X-100 (CAS 9002-93-1), o tris (CAS 77-86-1), o luminol (produto n° A8511), o *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA; CAS 16561-29-8) e o gradiente Histopaque®-1077 (número de catálogo 10771) foram obtidos da Sigma–Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). A agarose de baixo ponto de fusão e a agarose de ponto de fusão normal (CAS: 9012-36-6) foram obtidas da Invitrogen (Carlsbad, California, Estados Unidos), o GelRed™ (CAS 7732-18-5) foi adquirido da Uniscience (São Paulo, São Paulo,

Brasil), a xilazina (nome comercial Virbaxil 2%®) foi adquirida da Virbac do Brasil, Indústria e Comércio Ltda (Jurubatuba, São Paulo, Brasil), e a ketamina foi obtida da Agener União® (Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.4. Métodos

3.4.1. Ganho de massa corpórea e consumo de dieta

Os animais foram pesados semanalmente durante o período total de tratamento (12 semanas) para detectar possíveis alterações na massa corpórea devido à administração das dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3.

O consumo das diferentes dietas em vitamina D3 foi avaliado pela pesagem diária, estabelecendo-se a diferença entre a quantidade de dieta fornecida e a quantidade presente no próximo dia. O consumo das dietas foi avaliado durante as 12 semanas de tratamento. A balança utilizada para a pesagem das dietas foi da marca Marte (São Paulo, São Paulo, Brasil), modelo 015000.

3.4.2. Massa relativa do rim e do coração

O rim e o coração de cada animal foram pesados (balança Marte, modelo 015000) após a eutanásia, a fim de se estabelecer a relação entre a massa do órgão e a massa corpórea ao final das 12 semanas de tratamento com as diferentes dietas em vitamina D3.

3.4.3. Aferição da pressão arterial

A aferição da pressão arterial sistólica dos animais SHR e WKY foi realizada semanalmente por meio de sistema não invasivo, de pletismografia da artéria caudal, como realizado por Vianna et al. (1992). Foram realizadas 5 aferições por animal, feitas com os animais acordados e previamente aclimatados em caixa de aquecimento por 10 minutos, considerando apenas as aferições obtidas em ausência de movimentação do animal.

3.4.4. Quantificação de 25-hidroxivitamina D3 no plasma

Para a quantificação de 25-hidroxivitamina D3 no plasma dos animais SHR e WKY, foi utilizado o kit imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) da *General Cholecalciferol ELISA Kit* (EiAab®, Wuhan, Hubei, China), e o ensaio foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante. 50 µL das amostras ou padrões contendo vitamina D3 (0,00; 1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 ng/mL) foram adicionadas à microplaca de 96 poços previamente sensibilizada com anticorpo anti-vitamina D3, e a microplaca foi incubada a 37°C por 1h e 45 min. Subsequentemente, o excesso de conjugado e as amostras não ligadas foram removidos pela solução de lavagem (*Wash Solution*). Em seguida, 90 µL de avidina conjugada com peroxidase de rábano (HRP - *Horseradish Peroxidase*) foi adicionada à microplaca e incubada por 30 minutos a 37°C. A reação enzima-substrato foi interrompida pela adição de 100 µL de *Stop Solution* e a alteração da cor foi mensurada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 450 nm (leitor Biotek EL800, Highland Park, Winooski, Estados Unidos). A concentração de 25-hidroxivitamina D3 foi determinada pela comparação da densidade óptica das amostras com a curva padrão, sendo a densidade óptica inversamente proporcional à concentração de 25-hidroxivitamina D3 no plasma.

3.4.5. Ensaio do cometa em células do sangue periférico, coração e rim

O ensaio do cometa foi realizado segundo a metodologia proposta por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com pequenas alterações da técnica. Foram avaliadas amostras de sangue periférico, coração e rim dos animais SHR e WKY coletadas após o período de 12 semanas de tratamento. Das amostras de rim e coração foram preparadas suspensões celulares obtidas por separação mecânica, na qual 300 mg de tecido foram processados em 1800 µL de solução de Hanks (HBSS - *Hanks' Balanced Salt Solution*) + 200 µL de DMSO. Das amostras de sangue periférico, foram coletados 25 µL de sangue da veia caudal dos animais e, ao material obtido, foi adicionado 10 µL do anticoagulante EDTA. Alíquotas das suspensões celulares foram utilizadas para a determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan, e as lâminas só foram confeccionadas

quando a viabilidade foi igual ou superior a 70% comparado com a viabilidade do grupo controle em vitamina D3.

No preparo das lâminas das amostras de coração e rim foram utilizados 80 µL de suspensão celular de cada tecido homogeneizada com 240 µL de agarose de baixo ponto de fusão. No preparo das lâminas das amostras de sangue periférico foram utilizados 35 µL do material coletado (25 µL de sangue e 10 µL de EDTA) homogeneizado com 270 µL de agarose de baixo ponto de fusão. Uma alíquota de 80 µL de cada amostra (sangue periférico, coração e rim) foi depositada sobre lâminas previamente revestidas com agarose normal.

As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 30 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise recém preparada (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris adicionado de 1% de triton X-100 e 10% de DMSO antes do uso, pH 10), e mantidas por 24 horas a 4°C.

Após a lise, as lâminas foram submersas em solução alcalina (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos a 4°C, e posteriormente levadas à cuba de eletroforese. A eletroforese foi conduzida em solução alcalina (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos, com voltagem (0,87 V/cm) e amperagem (300 mA) constantes. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Depois de secarem a temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 2 minutos.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA GelRED™ [1:10.000 (v/v)] por 4 minutos, e examinadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss-AxioStar Plus, Jena, Thuringia, Alemanha), acoplado a uma câmera usando filtro 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 20 x. Para cada animal foram analisados 100 nucleoides. As imagens dos nucleoides foram avaliadas com o auxílio do *software* CometAssay IV (Perceptive Instruments®, Bury St Edmunds, Suffolk, Inglaterra), sendo analisado o parâmetro *Tail intensity*, referente à porcentagem de DNA na cauda (Figura 6).

Fonte: Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP/USP
 Autoria: Carla da Silva Machado

Figura 6. Imagens de nucleoides capturados com o software CometAssay IV. **(A)** Nucleoide com ausência de dano ao DNA e **(B)** nucleoide com elevado grau de dano ao DNA.

3.4.6. Teste do Micronúcleo

3.4.6.1. Teste do Micronúcleo em células da medula óssea

O teste do micronúcleo em células da medula óssea seguiu o protocolo descrito por Schmid (1975), com pequenas modificações. Após as 12 semanas de tratamento, as células da medula óssea foram coletadas dos fêmures e depositadas em soro bovino fetal. O material coletado foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 270 xg, o pellet ressuspendido em 0,3 mL de sobrenadante, e a suspensão celular foi utilizada para confecção de lâminas por meio de esfregaços. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto durante 10 minutos.

As lâminas foram coradas durante 10 minutos com Giemsa diluído em tampão Sorensen (pH 5,4), na proporção de 1mL de corante para 20 mL da solução tampão (modificação da técnica original implantada pelo Laboratório de Nutrigenômica). Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Zeiss, modelo Primostar®) em objetiva de imersão com aumento de 1.000 x (Figura 7).

A frequência de micronúcleos em 2.000 eritrócitos policromáticos (PCE) foi avaliada para cada animal. A relação entre o número de PCE e o número total de eritrócitos [PCE + NCE (eritrócitos normocromáticos)] foi analisada em 500 células como parâmetro de citotoxicidade. Os critérios para identificação dos micronúcleos seguiram as recomendações propostas por Titenko-Holland et al. (1997).

Fonte: Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP/USP
Fotomicrografia: Livia Cristina Hernandez

Figura 7. Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo em células da medula óssea de ratos. Coloração Giemsa e aumento original de 1.000 x. **(a)** Eritrócito policromático (PCE), **(b)** Eritrócito normocromático (NCE), **(c)** Eritrócito policromático com micronúcleo.

3.4.6.2. Teste do Micronúcleo em células do sangue periférico

No primeiro dia (antes do início do tratamento, tempo 1 - t1), na sexta semana (tempo 2 - t2) e na décima segunda semana (tempo 3 - t3), 10 µL de sangue da cauda dos animais foram coletados e realizados esfregaços sanguíneos. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos.

Imediatamente antes da análise, as lâminas foram coradas com laranja de acridina na concentração de 18 µg/mL e cobertas com lamínula, seguindo o protocolo de Celik, Ogenier e Comelokoglu (2005). A análise citogenética foi realizada em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss-AxioStar Plus, Jena, Thuringia, Alemanha) em objetiva de imersão com aumento de 1.000 x (Figura 8). Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos por animal e anotadas as frequências de micronúcleos segundo proposto por Hayashi et al. (1990).

Fonte: Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP/USP
Fotomicrografia: Vinicius de Paula Venâncio

Figura 8. Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos. A seta indica um eritrócito policromático micronucleado. Coloração laranja de acridina e aumento original de 1.000 x.

3.4.7. *Burst* oxidativo em neutrófilos do sangue periférico

Para a realização do ensaio de *burst* oxidativo, no momento da eutanásia dos animais SHR e WKY, foram coletados 5 mL de sangue periférico por punção cardíaca, e esse material foi armazenado em tubo de coleta contendo EDTA. O protocolo de gradiente Histopaque®-1077 foi utilizado para o isolamento dos neutrófilos, e o método obteve rendimento de uma população de células de aproximadamente 95% de neutrófilos (Figura 9).

O volume de 5 mL do reagente foi colocado em um tubo de 15 mL e o mesmo volume de sangue do animal foi adicionado acima do gradiente (Histopaque 1077 + sangue). As amostras foram centrifugadas a 400 xg por 45 minutos para a separação em duas fases: a superior, contendo plasma, células mononucleares e gradiente Histopaque®-1077 (que foi descartada), e a inferior, rica em neutrófilos e eritrócitos. À fase inferior foi adicionado 2 mL de solução de dextrana 6% (m/v) em NaCl 0,15M e PBS (*phosphate buffer solution*) até o volume de 7 mL. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 270 xg por 10 min, o *pellet* ressuspenso em NH₄Cl 0,83%, e centrifugado a 480 xg por 10 min. As células foram lavadas com solução de Hanks no pH 7,2 e ressuspenso em 1mL de Hanks com gelatina 1%. O ensaio de quimioluminescência dependente de luminol foi utilizado para avaliar o estresse oxidativo durante a fagocitose, por meio do monitoramento da indução da atividade de NADPH oxidase, seguindo o protocolo de Alves et al. (2003). Para o ensaio de quimioluminescência foram utilizados 1×10^5 neutrófilos/tubo de reação, 1 µg/mL de *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (CAS 16561-29-8) e $2,8 \times 10^{-5}$ mol de luminol. Durante 20 minutos de incubação com as partículas de zymosan opsonizadas, a quimioluminescência produzida foi registrada em luminômetro (Berthold Autolumat Plus LB 953). Os resultados foram apresentados como resposta relativa de quimioluminescência (grupos tratados em relação aos grupos controle).

Os experimentos de *burst* oxidativo dos neutrófilos foram realizados em parceria com o Laboratório de Imunologia e Citologia dos Fluidos Biológicos da FCFRP/USP.

Fonte: Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP
Fotomicrografia: Vinicius de Paula Venancio

Figura 9. Fotomicrografia que mostra a população de neutrófilos obtida a partir do método de separação por gradiente Histopaque 1077. Coloração Giemsa, aumento original de 1.000 x.

3.4.8. Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona (GSH) no rim e coração

Para a quantificação de TBARS e GSH, no rim e coração, foi obtido uma amostra do rim ou coração por meio da homogeneização de 0,2 g de cada órgão em 2 mL de KCl 1,15% refrigerado. As concentrações de TBARS no rim e coração foram determinadas segundo Draper e Hadley (1990), com pequenas modificações da técnica. A uma alíquota de 0,2 mL de cada homogenato foi adicionada 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,8%, 500 µL de tampão ácido acético, 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1%, e 100 µL de H₂O destilada. Essa preparação permaneceu em banho-fervente por 2 horas. A absorbância do sobrenadante foi determinada em 532 nm (espectrofotômetro RayLeigh UV-1601, Chaoyang , Beijing, China), sendo os resultados expressos em nmol de TBARS por mg de proteína. A curva padrão foi feita a partir de diluições de malondialdeído (MDA) 0,03 mM (de 1,5 a 9,0 nmol/mL) .

As concentrações de GSH nos tecidos renal e cardíaco foram determinadas segundo o método de Sedlak e Lindsay (1968), com alterações da técnica. Os homogenatos das amostras foram diluídos em água (1:4), precipitados com ácido tricloroacético 50% e posteriormente centrifugados a 270 xg por 10 minutos. Um volume de 2,0 mL de tampão Tris-EDTA (0,2 M, pH 8,9) e 0,1 mL de ácido 5,5 '-dithio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,01 M foi adicionado a 0,5 mL do sobrenadante, e as amostras mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura foi realizada a 412 nm (espectrofotômetro RayLeigh UV-1601, Chaoyang , Beijing, China) com

curva padrão de α -cisteína nas concentrações de 0,10; 0,04; 0,02 e 0,01 $\mu\text{mol/mL}$. Os resultados foram expressos em nmol GSH por mg de proteína. A quantificação das proteínas totais foi realizada em 650 nm (espectrofotômetro Rayleigh UV-1601, Chaoyang, Beijing, China) utilizando o método de Lowry (HARTREE, 1972).

3.4.9. Quantificação de fibrose intersticial no rim por análise histológica

Os rim esquerdo dos animais foi fixado em formaldeído a 10% tamponado por 72 horas. Após a fixação, foram submetidos ao processo de desidratação em uma série crescente de alcoóis etílicos, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes seriados com 5 μm de espessura, e os mesmos foram aderidos às lâminas com o adesivo polilisina e submetidos à secagem. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (solução aquosa de stock de eosina e floxina a 1% adicionada a ácido acético glacial e álcool a 95%) e com a coloração picrossírius (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada à 0,1g de vermelho da Síria F3b, *Sirius red F3B-Bayer*) com contra coloração pela hematoxilina para a avaliação do tecido fibroso por morfometria digital. A morfometria foi realizada com o auxílio do Sistema Analisador de Imagem Automático KS 300 – Carl Zeiss, Jena, Thuringia, Alemanha). O campo quantificado foi capturado por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização da imagem. A fibrose total no compartimento intersticial foi quantificada em toda a área do corte envolvendo o córtex renal, sendo excluída a adventícia dos vasos e a medular renal.

As análises de fibrose renal foram realizados em parceria com o Laboratório de Patologia Geral e de Microscopia Eletrônica da UFTM.

3.4.10. Análise da expressão gênica por *RT² PROFILER^{TM} PCR Arrays* no rim e coração

O RNA total foi extraído do rim e coração dos animais de cada grupo de tratamento. Cada amostra de RNA total foi extraída com o auxílio do *Kit RNeasy Lipid Tissue Mini* (Qiagen, Valencia, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada por leitura

espectrofotométrica no comprimento de onda UV 260 nm, em NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos).

A pureza das amostras foi avaliada pela razão A_{260}/A_{280} , que mostra possíveis contaminações por proteínas e DNA; e pela razão A_{260}/A_{230} , que mostra possíveis contaminações por sais e compostos orgânicos, como a guanidina ou o fenol. Amostras de RNA total com aceitável grau de pureza apresentam razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} próximas a 2,0 (BUSTIN et al., 2009).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A agarose foi diluída em 50 mL de tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0), e adicionado 5 μ L do corante intercalante GelRed®. As amostras aplicadas no gel de agarose foram normalizadas à concentração de 1 μ g de RNA e 20% v/v de tampão de aplicação 6x (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol). O gel contendo as amostras foi submetido à eletroforese em tampão TAE por 90 minutos a 80 V e, posteriormente, fotografado em foto-documentador UV (Molecular Imager® Gel Doc™ XR, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos).

Para a síntese de cDNA, a partir de 1 μ g de RNA, foi utilizado o *Kit RT² First Strand cDNA Synthesis* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Antes da realização do procedimento de síntese de cDNA, todas as amostras foram tratadas com o *kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), a fim de eliminar a presença de qualquer DNA genômico.

O kit *RT² SYBR Green qPCR Mastermix* (Qiagen) foi adicionado ao cDNA recém sintetizado para quantificar o RNAm dos genes estudados. As análises foram realizadas no termociclador StepOnePlus® (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), e as eficiências das reações de RT² *Profiler™* PCR Arrays foram calculadas de acordo com as instruções do fabricante.

A expressão dos 84 genes de diversas vias relacionadas com a hipertensão (Tabela 4) foi determinada pelo método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2001). Os valores de C_t (*Cycle Threshold*), o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (*Threshold*), foram obtidos para cada amostra, e os genes *Rpl13a* (proteína ribossomal L13a), *Ldha* (lactato desidrogenase A) e *Actb* (beta-actina) foram utilizados como genes de referência.

Tabela 4. Grupos funcionais de genes envolvidos em vias que estão associadas com a hipertensão

Grupos Funcionais (vias)	Genes*
Vasodilatação	<i>Ace, Ace2, Adm, Adrb1, Agtr1a, Agtr1b, Agtr2, Calca, Cps1, Ednrb, Ephx2, Gch1, Kcnj8, Nos3, Nppb, Nppc, Npr1, P2rx4, Pde5a</i>
Vasoconstrição	<i>Ace, Ace2, Adm, Adra1b, Agt, Agtr1a, Agtr1b, Alox5, Avp, Avpr1a, Bdkrb2, Bmpr2, Cacna1c, Cav1, Ece1, Edn1, Edn2, Ednra, Ednrb, Nppc, Npy1r, Ptgs1, Ptgs2, Uts2r.</i>
Tônus vascular	<i>Agtr1a, Agtr1b, Drd3, Nos3, Nppb, Nppc, Ren.</i>
Contração da musculatura lisa	<i>Acta2, Adra1b, Adrb1, Bdkrb2, Cacna1c, Cav1, Edn1, Edn2, Ednra, Ednrb, Kcnma1, P2rx4, Ptgs1, Ptgs2, Uts2.</i>
Relaxamento da musculatura lisa	<i>Gucy1a3, Kcnma1, P2rx4</i>
Quinases de cadeia leve de miosina	<i>Mylk, Mylk2, Mylk3</i>
Regulação da pressão arterial	<i>Ace, Ace2, Acta2, Agt, Agtr2, Avp, Avpr1a, Avpr1b, Bdkrb2, Cacna1c, Calca, Drd3, Drd5, Ece1, Edn1, Edn2, Ednrb, Ephx2, Gch1, Gucy1a3, Nos3, Nppb, Nppc, Npr1, Npy1r, P2rx4, Ptgs1, Ptgs2, Ren, Uts2, Uts2r.</i>
Sistema renina-angiotensina	<i>Ace, Ace2, Agt, Agtr1a, Agtr1b, Ece1, Ren</i>
Sinalização do óxido nítrico	<i>Agt, Agtr2, Gucy1a3, Gucy1b3, Nosip, Nostrin</i>
Metabolismo do óxido nítrico	<i>Agtr2, Arg2, Cav1, Cps1, Edn1, Gch1, Gchfr, Hif1a, Nos3, P2rx4</i>
Síntese e sinalização do GMP-cíclico	<i>Adra1d, Gucy1b3, Pde3b, Prkg1, Prkg2, Ptgir, S1pr1</i>
Choque osmótico	<i>Agt, Avp, Avpr1b, Bdkrb2, Kcnma1</i>
Resposta à hipóxia	<i>Ace, Adm, Cav1, Ece1, Edn1, Ednra, Hif1a, Kcnma1, Nos3, Nppc, Pde5a</i>
Sinalização mediada pelo segundo mensageiro	<i>Adra1d, Pde3b, Ptgir, S1pr1, Sphk1</i>
Transporte de íons	<i>Atp2c1, Atp6ap2, Bdkrb1, Chrna1, Chrb1, Clic1, Clic4, Clic5, Cnga1, Cnga2, Cnga3, Cnga4, Cngb1, Itpr1, Itpr2, Itpr3, Plcg2, Scnn1a, Scnn1b, Scnn1g, Slc7a1</i>
Metabolismo de lipídeos	<i>Pde3a, Pde3b, Plcg1, Plcg2, Sphk1, Sphk2</i>

*Genes que estão presentes em mais de uma via desempenham mais de uma função celular.

3.5. Análise dos resultados

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e primeiramente avaliados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Dunnett, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5, e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para os parâmetros avaliados. Para os ensaios de RT² *Profiler*^{TM} PCR Arrays, a análise estatística foi feita pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$) associado à expressão relativa com variação maior do que 1,5 vezes em relação ao grupo controle.

As análises estatísticas foram realizadas por meio da comparação dos grupos tratados (grupo suplementado e grupo deficiente em vitamina D3) com o grupo controle em vitamina D3. O grupo controle SHR também foi comparado com o grupo controle WKY nos parâmetros citogenéticos e bioquímicos avaliados.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do ganho de massa corpórea e consumo de dieta

A Figura 10 mostra o ganho médio de massa corpórea dos ratos SHR (Figura 10 A) e WKY (Figura 10 B) durante as 12 semanas de tratamento com as dietas com diferentes concentrações de vitamina D3.

Tanto os ratos SHR quanto os ratos WKY, alimentados com as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3, apresentaram ganho de massa corpórea semelhante ao respectivo grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento.

Figura 10. Ganho de massa corpórea de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/Kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante o período de 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por

grupo (n=6). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle ($p>0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

A Figura 11 mostra a média do consumo das dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3 durante as 12 semanas de tratamento dos ratos SHR (Figura 11 A) e WKY (Figura 11 B). Os grupos suplementado ou deficiente não apresentaram diferenças significativas em relação ao consumo de dieta do grupo alimentado com a dieta controle em vitamina D3, nos dois modelos experimentais avaliados, e ao longo de todo o período experimental. Os ratos SHR e WKY, alimentados com a dieta controle consumiram, em média, 27 UI de vitamina D3 por dia. Os ratos SHR e WKY, alimentados com a dieta suplementada consumiram, em média, 270 UI de vitamina D3 por dia. Os ratos SHR e WKY, alimentados com a dieta deficiente em vitamina D3, consumiram 0 UI de vitamina D3 por dia.

Figura 11. Consumo de dieta de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/Kg),

suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante o período de 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo (n=6). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle ($p>0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.2. Variação da massa relativa do rim e coração

A relação entre a massa do rim e coração/massa corpórea foi avaliada após o tratamento com a vitamina D3 (grupos controle, suplementado e deficiente). A média da massa relativa do rim e coração foi expressa em porcentagem em relação à média da massa corpórea, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

A relação entre a massa do órgão/massa corpórea não foi alterada com o consumo das dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3, quando comparado ao grupo controle, tanto nos ratos SHR quanto nos ratos WKY. No entanto, quando comparado o grupo controle dos ratos SHR com o dos ratos WKY, foi observado um aumento significativo na relação massa do coração/massa corpórea dos animais SHR.

Tabela 5. Relação entre a massa do rim e coração e a massa corpórea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3

Grupos (SHR)	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Massa rim/ massa corpórea (%)	Massa coração/ massa corpórea (%)
controle vit D3	285,12 $\pm$ 10,20	382,87 $\pm$ 16,42	0,75 $\pm$ 0,07	0,52 $\pm$ 0,11*
suplementado vit D3	285,25 $\pm$ 23,19	392,37 $\pm$ 22,54	0,69 $\pm$ 0,21	0,47 $\pm$ 0,17
deficiente vit D3	302,87 $\pm$ 26,29	390,87 $\pm$ 17,97	0,76 $\pm$ 0,11	0,51 $\pm$ 0,27
Grupos (WKY)	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Massa rim/ massa corpórea (%)	Massa coração/ massa corpórea (%)
controle vit D3	383,12 $\pm$ 18,41	447,00 $\pm$ 23,08	0,73 $\pm$ 0,07	0,39 $\pm$ 0,07
suplementado vit D3	381,75 $\pm$ 9,93	441,25 $\pm$ 14,50	0,73 $\pm$ 0,21	0,37 $\pm$ 0,13
deficiente vit D3	371,50 $\pm$ 18,55	442,87 $\pm$ 28,56	0,75 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,27

Os valores de massa corpórea e massa do órgão representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo de tratamento (n=6). Vit D3: vitamina D3. *Diferente do grupo WKY controle em vitamina D3 ($p<0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.3. Caracterização da suplementação e deficiência em vitamina D3 após quantificação plasmática

A quantificação plasmática de 25-hidroxivitamina D3 foi realizada ao final das 12 semanas de tratamento com o objetivo de caracterizar a suplementação e a deficiência em vitamina D3 nos ratos SHR e WKY, e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados mostraram que, tanto nos ratos SHR quanto nos ratos WKY, a dieta deficiente em vitamina D3 reduziu as concentrações plasmáticas de 25-hidroxivitamina D3 em aproximadamente 6 vezes quando comparado aos respectivos grupos que receberam a dieta controle. De forma contrária, a dieta suplementada com vitamina D3 aumentou mais de 2 vezes a concentração plasmática nos ratos SHR e WKY, quando comparado aos respectivos grupos que receberam a dieta controle.

Tabela 6. Concentrações de 25-hidroxivitamina D3 no plasma dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (Wistar Kyoto - WKY) alimentados com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3

Ratos	25-hidroxivitamina D3 (ng/mL)		
	Dieta controle em vit D3	Dieta suplementada em vit D3	Dieta deficiente em vit D3
SHR	19.39 $\pm$ 2.74	46.99 $\pm$ 1.32*	3.11 $\pm$ 0.41*
WKY	23.96 $\pm$ 0.57	51.68 $\pm$ 0.84*	3.45 $\pm$ 0.43*

Os valores de concentração plasmática de 25-hidroxivitamina D3 representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo de tratamento (n=6). vit D3: vitamina D3. *Significativamente diferente do respectivo grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3 ($p<0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.4. Alterações na pressão arterial sistólica

A aferição semanal da pressão arterial sistólica nos ratos SHR e WKY foi realizada com o objetivo de caracterizar a hipertensão/normotensão nos dois modelos experimentais, e os resultados estão apresentados na Figura 12.

Nos ratos SHR, a dieta suplementada com vitamina D3 diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a pressão arterial sistólica a partir da quarta semana de tratamento, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle, e essa redução manteve-se até o final do tratamento (Figura 12 A). Os ratos que receberam a dieta suplementada com vitamina D3 iniciaram o tratamento com níveis tensionais médios de $188,12 \pm 3,72$ mmHg, e ao final das 12 semanas de tratamento, apresentaram pressão arterial sistólica média de $166,25 \pm 3,53$ mmHg. Os ratos SHR alimentados com a dieta deficiente em vitamina D3 aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a pressão arterial sistólica na décima segunda semana de tratamento, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle. Os ratos SHR iniciaram o tratamento com pressão arterial sistólica média de $188,75 \pm 3,53$ mmHg, e na última semana de tratamento obtiveram pressão arterial sistólica média de $192,50 \pm 3,78$ mmHg (Figura 12 A).

As médias das pressões arteriais sistólicas dos animais WKY, alimentados com as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3, não diferiram do grupo que recebeu a dieta controle ao longo das 12 semanas de tratamento, como pode ser observado na Figura 12 B.

Figura 12. Pressão arterial sistólica de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/Kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante o período de 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo (n=6). *Significativamente diferente do grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3 ($p < 0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.5. Avaliação dos danos ao DNA em células do sangue periférico, rim e coração pelo ensaio do cometa

Para a realização do ensaio do cometa é necessária a prévia avaliação da viabilidade celular dos tecidos a serem avaliados. Pelo método de exclusão por azul de tripan, a viabilidade das células sanguíneas, renais e cardíacas foi superior a 85% em todos os grupos de tratamento, tanto para os animais SHR quanto para os animais WKY (Apêndice A), sendo possível prosseguir com os procedimentos do ensaio do cometa.

No ensaio do cometa, a determinação da extensão dos danos ao DNA foi realizada pelo parâmetro *Tail Intensity*, equivalente à porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides (% DNA na cauda). Os resultados obtidos para as células do sangue periférico, rim e coração estão apresentados na Figura 13.

Nas células dos rins e coração, não foi observada alterações na % DNA na cauda após tratamento dos ratos SHR (Figura 13 A) e WKY (Figura 13 B) com as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3, quando comparado aos animais que receberam a dieta controle em vitamina D3. No entanto, no sangue periférico, a dieta deficiente em vitamina D3 foi capaz de aumentar significativamente os danos ao DNA, tanto nos ratos hipertensos SHR (Figura 13 A) quanto nos ratos normotensos WKY (Figura 13 B).

Figura 13. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides (% DNA na cauda) avaliada pelo ensaio do cometa em células do coração, rim e sangue periférico de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo ($n=6$), sendo analisados 100 nucleoides por animal. * $p<0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.6. Avaliação da instabilidade cromossômica na medula óssea e no sangue periférico

A determinação da citotoxicidade das dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3 na medula óssea foi feita por meio da porcentagem de PCE em relação

ao total de eritrócitos (PCE + NCE), como indicado na fórmula $PCE/(PCE + NCE)$. Quando ocorre uma redução na relação $PCE/(PCE + NCE)$ superior a 20% em relação ao grupo controle, o tratamento pode ter sido citotóxico aos animais (VENKATESH et al., 2007). A frequência de micronúcleos em 2000 PCE da medula óssea foi avaliada nos ratos SHR e WKY.

A relação $PCE/(PCE + NCE)$ para os ratos SHR e WKY está apresentada na Tabela 7, e mostra que não houve diferenças significativas entre os grupos alimentados com as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3.

Tabela 7. Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e total de eritrócitos [PCE+ eritrócitos normocromáticos (PCE)] na medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) após tratamento com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas

Grupos (SHR)	PCE/(PCE + NCE)
controle vit D3	45,7 ± 3,7
suplementado vit D3	45,3 ± 2,9
deficiente vit D3	47,1 ± 2,5
Grupos (WKY)	PCE/(PCE + NCE)
controle vit D3	52,3 ± 3,1
suplementado vit D3	50,1 ± 1,9
deficiente vit D3	50,7 ± 2,3

Vit D3: vitamina D3. Os valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo de tratamento (n=6). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle em vitamina D3. ($p>0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

Os resultados do teste do micronúcleo na medula óssea, apresentados na Figura 14, mostraram que a deficiência em vitamina D3 aumentou significativamente a frequência de micronúcleos nos ratos SHR, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3. A dieta suplementada com vitamina D3

não alterou a frequência de micronúcleos nos ratos SHR, em comparação ao grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3.

A suplementação ou a deficiência em vitamina D3 não alteraram significativamente a frequência de micronúcleos nos animais WKY, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3, como observado na Figura 14. Em relação ao número basal de micronúcleos, os animais SHR do grupo controle em vitamina D3 apresentaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em relação aos animais controles WKY.

Figura 14. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) após tratamento com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão da frequência de MNPCE de cada grupo de tratamento (n=6). 2.000 PCE analisados por animal. * $p < 0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

O teste do micronúcleo no sangue periférico dos animais SHR e WKY foi avaliado em três tempos: no primeiro dia, antes do início dos tratamentos (tempo 1 -

t1), na sexta semana de tratamento (tempo 2 - t2) e na décima segunda semana, no momento da eutanásia (tempo 3 - t3).

Os resultados do teste do micronúcleo nos reticulócitos do sangue periférico estão apresentados na Figura 15. Nos animais SHR (Figura 15 A), o grupo tratado com a dieta deficiente em vitamina D3 apresentou um aumento significativo da frequência de micronúcleos em relação aos animais tratados com a dieta controle ($p < 0,05$), nos tempos 2 e 3. O grupo tratado com a dieta suplementada com vitamina D3 não apresentou diferença na frequência de micronúcleos em relação aos animais alimentados com a dieta controle, nos três tempos avaliados (Figura 15 A).

Nos animais WKY, os resultados mostraram que as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3 não alteraram a frequência de micronúcleos, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle, nos três tempos avaliados (Figura 15 B).

Figura 15. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) no sangue periférico de **(A)** ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e **(B)** seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3, avaliada em três tempos: t1 = início do experimento; t2 = sexta semana; t3 = décima segunda semana. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão da frequência de MNPCE de cada grupo de tratamento (n=6). 2.000 PCE analisados por animal. * $p < 0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.6. Avaliação do *burst* oxidativo em neutrófilos do sangue periférico

A Figura 16 mostra o *burst* oxidativo em neutrófilos do sangue periférico de ratos SHR e WKY alimentados com dieta controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3. Os resultados mostraram que a suplementação com a vitamina D3 não alterou o *burst* oxidativo nos neutrófilos dos ratos SHR, enquanto a deficiência em vitamina D3 levou a um aumento do *burst* oxidativo dos neutrófilos, quando comparado aos animais que receberam a dieta controle ($p < 0,05$).

O *burst* oxidativo nos neutrófilos do sangue periférico dos ratos WKY não foi alterado após tratamento com as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3, quando comparado aos animais que receberam a dieta controle, como observado na Figura 16.

Figura 16. *Burst* oxidativo dos neutrófilos no sangue periférico, representado pela resposta relativa de quimioluminescência, de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 4 animais por grupo ($n=4$). * $p < 0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.7. Avaliação dos marcadores bioquímicos TBARS e GSH no rim e coração

As concentrações renais e cardíacas de TBARS e GSH foram avaliadas nos ratos SHR e WKY após 12 semanas de tratamento com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3, e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Nos ratos SHR, os resultados mostraram que a dieta deficiente em vitamina D3 aumentou as concentrações de TBARS no rim e coração, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle, indicando que a deficiência em vitamina D3 está relacionada ao aumento da peroxidação lipídica nesse modelo experimental. Nos tecidos renal e cardíaco dos ratos SHR, a dieta deficiente em vitamina D3 não alterou as concentrações de GSH, e a suplementação com vitamina D3 não modificou as concentrações de TBARS e GSH, comparado com os ratos que receberam a dieta controle em vitamina D3. Nos ratos WKY, a suplementação ou a deficiência em vitamina D3 não alteraram as concentrações de TBARS ou GSH.

No rim, a concentração de GSH dos ratos SHR que receberam a dieta controle em vitamina D3 foi significativamente maior que a concentração de GSH dos ratos WKY que receberam a mesma dieta, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona (GSH) no rim e coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) após 12 semanas de tratamento com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3

Grupos (SHR)	TBARS (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)
Rim		
Controle vit D3	0,68 ± 0,47	47,73 ± 12,05 [#]
Suplementado vit D3	0,71 ± 0,67	45,71 ± 08,42
Deficiente vit D3	1,09 ± 0,68*	48,86 ± 12,74
Coração		
Controle vit D3	0,64 ± 0,16	29,12 ± 03,25
Suplementado vit D3	0,62 ± 0,57	28,30 ± 03,57
Deficiente vit D3	0,81 ± 0,63*	32,85 ± 07,91
Grupos (WKY)		
Rim		
Controle vit D3	0,63 ± 0,81	37,31 ± 10,72
Suplementado vit D3	0,59 ± 0,72	33,17 ± 11,44
Deficiente vit D3	0,62 ± 0,37	36,74 ± 09,37
Coração		
Controle vit D3	0,61 ± 0,40	27,19 ± 5,39
Suplementado vit D3	0,64 ± 0,58	25,51 ± 9,21
Deficiente vit D3	0,65 ± 0,12	28,67 ± 3,29

Vit D3: vitamina D3. Os valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo de tratamento (n=6). *Significativamente diferente do grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3. [#]Significativamente diferente do grupo controle WKY. ($p < 0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.8. Quantificação da fibrose intersticial no rim

A Figura 17 mostra fotomicrografias de secções do córtex renal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY), após tratamento com as dietas com diferentes concentrações em vitamina

D3 para a avaliação do tecido fibroso por morfometria digital. A dieta deficiente em vitamina D3 induziu um aumento na quantidade de fibras colágenas no rim dos ratos SHR e WKY, quando comparado aos respectivos grupos que receberam a dieta controle em vitamina D3. A dieta suplementada com vitamina D3 não teve efeito sobre a quantidade de fibras colágenas, tanto nos animais SHR quanto nos animais WKY.

Figura 17. Fotomicrografias de secções do córtex renal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) coradas com picrossírius para a avaliação da deposição de colágeno. Os ratos SHR e WKY foram submetidos a tratamento com dietas com diferentes concentrações de vitamina D3 ao longo de 12 semanas (aumento original de 800 x). As imagens **A, B, C, G, H e I** são provenientes de microscopia de luz, e as imagens **D, E, F, J, K e L** são provenientes de microscopia de luz polarizada. **A e D**, ratos SHR alimentados com dieta controle em vitamina D3 (1.000 UI/kg); **B e E**, ratos SHR alimentados com dieta suplementada em vitamina D3 (10.000 UI/kg); **C e F**, ratos SHR alimentados com dieta deficiente em vitamina D3 (0 UI/kg); **G e J**, ratos WKY alimentados com dieta controle em vitamina D3 (1.000 UI/kg); **H e K**, ratos WKY alimentados com dieta suplementada em vitamina D3 (10.000 UI/kg); **I e L**, ratos WKY alimentados com dieta deficiente em vitamina D3 (0 UI/kg). As setas mostram o aumento de colágeno nos ratos SHR e WKY alimentados com a dieta deficiente em vitamina D3.

A figura 18 mostra o percentual de fibrose no rim de ratos SHR e WKY alimentados com as dietas controle, suplementada ou deficiente em vitamina D3. Os resultados da análise morfométrica revelaram que, nos ratos SHR e WKY, a dieta

deficiente em vitamina D3 levou a um aumento significativo da fibrose no rim ($p<0,05$), enquanto a dieta suplementada não alterou o percentual de fibrose quando comparado aos respectivos grupos que receberam a dieta controle em vitamina D3.

Na figura 18 também foi possível observar uma diferença significativa ($p<0,05$) no percentual de fibrose no rim dos ratos SHR que receberam a dieta controle em vitamina D3, quando comparado aos ratos WKY alimentados com a mesma dieta.

Figura 18. Quantificação de fibrose (percentual/área) no rim de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com dieta controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3 durante 12 semanas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo ($n=6$). * $p<0,05$. ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

4.9. Análise da expressão de genes relacionados com a hipertensão no rim e coração

Os resultados da quantificação do RNA total extraído das amostras de rim (Apêndice B) e coração (Apêndice C) mostraram bom rendimento para a realização dos ensaios de RT² *Profiler*^{TM} PCR Arrays, e todos os grupos apresentaram razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} próximas a 2,0, indicando a pureza das amostras após a extração de RNA. A integridade das amostras de RNA total do rim (Apêndice D) e do coração (Apêndice E) dos ratos SHR e WKY foram avaliadas em gel de agarose a 1%, e todas as amostras dos grupos que receberam as diferentes dietas em

vitamina D3 apresentaram grau de integridade satisfatória para a realização dos experimentos de RT-qPCR.

As reações de RT² *Profiler*^{TM} PCR Arrays obtiveram eficiências de amplificação dentro do limite recomendado, e os resultados da expressão relativa dos genes relacionados com a hipertensão nos animais SHR e WKY, no rim e coração, estão apresentados nas Tabelas 9, 10, 11 e 12.

A Tabela 9 mostra a expressão de genes no rim dos ratos SHR, e os resultados mostraram que a suplementação com vitamina D3 reduziu a expressão de quatro genes (*Ace*, *Edn1*, *Ren* e *Agt*), enquanto a deficiência em vitamina D3 induziu a expressão de treze genes no tecido renal: *Ace*, *Acta2*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Alox5*, *Cacna1c*, *Ece1*, *Ednra*, *Kcnma1*, *P2rx4*, *Scnn1g* e *Slc7a1*.

Nos animais WKY, os resultados da expressão gênica no rim (Tabela 10), mostraram que a suplementação com vitamina D3 reduziu a expressão do gene *Ren*, e a deficiência em vitamina D3 induziu a expressão dos genes *Ace* e *Cps1*, e reduziu a expressão do gene *Arg2* no tecido renal.

Tabela 9. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no rim de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência *Rpl13a*, *Ldha* e *Actb*

Gene (Símbolo)	Descrição do gene	Sequência de referência (GeneBank)	Suplementado Vit D3 Redução (-) na expressão ^a	Deficiente Vit D3 Aumento (+) na expressão ^a
Ace	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	NM_012544	- 2,63	+ 3,48
Ace2	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	NM_001012006	Na	Na
Acta2	Smooth muscle alpha-actin	NM_031004	Na	+ 2,15
Adm	Adrenomedullin	NM_012715	Na	Na
Adra1b	Adrenergic, alpha-1B-, receptor	NM_016991	Na	Na
Adra1d	Adrenergic, alpha-1D-, receptor	NM_024483	Na	Na
Adrb1	Adrenergic, beta-1-, receptor	NM_012701	Na	Na
Agt	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	NM_134432	Na	+ 2,15
Agtr1a	Angiotensin II receptor, type 1a	NM_030985	Na	+ 2,71
Agtr1b	Angiotensin II receptor, type 1b	NM_031009	Na	+ 1,98
Agtr2	Angiotensin II receptor, type 2	NM_012494	Na	Na
Alox5	Arachidonate 5-lipoxygenase	NM_012822	Na	+ 1,72
Arg2	Arginase type II	NM_019168	Na	Na
Atp2c1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1	NM_131907	Na	Na
Atp6ap2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	NM_001007091	Na	Na
Avp	Arginine vasopressin	NM_016992	Na	Na
Avpr1a	Arginine vasopressin receptor 1A	NM_053019	Na	Na
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	NM_017205	Na	Na
Bdkrb1	Bradykinin receptor B1	NM_030851	Na	Na
Bdkrb2	Bradykinin receptor B2	NM_173100	Na	Na
Bmpr2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	NM_080407	Na	Na
Cacna1c	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_012517	Na	+ 1,62
Calca	Calcitonin-related polypeptide alpha	NM_017338	Na	Na
Cav1	Caveolin 1, caveolae protein	NM_031556	Na	Na
Chrna1	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)	NM_024485	Na	Na
Chrn1b	Cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	NM_012528	Na	Na
Clic1	Chloride intracellular channel 1	NM_001002807	Na	Na
Clic4	Chloride intracellular channel 4	NM_031818	Na	Na
Clic5	Chloride intracellular channel 5	NM_053603	Na	Na
Cnga1	Cyclic nucleotide gated channel alpha 1	NM_053497	Na	Na

Cnga2	Cyclic nucleotide gated channel alpha 2	NM_012928	Na	Na
Cnga3	Cyclic nucleotide gated channel alpha 3	NM_053495	Na	Na
Cnga4	Cyclic nucleotide gated channel alpha 4	NM_053496	Na	Na
Cngb1	Cyclic nucleotide gated channel beta 1	NM_031809	Na	Na
Cps1	Carbamoyl-phosphate synthetase 1	NM_017072	Na	Na
Drd3	Dopamine receptor D3	NM_017140	Na	Na
Drd5	Dopamine receptor D5	NM_012768	Na	Na
Ece1	Endothelin converting enzyme 1	NM_053596	Na	+ 1,66
Edn1	Endothelin 1	NM_012548	- 2,12	Na
Edn2	Endothelin 2	NM_012549	Na	Na
Ednra	Endothelin receptor type A	NM_012550	Na	+ 1,66
Ednrb	Endothelin receptor type B	NM_017333	Na	Na
Ephx2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	NM_022936	Na	Na
Gch1	GTP cyclohydrolase 1	NM_024356	Na	Na
Gchfr	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	NM_133595	Na	Na
Gucy1a3	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	NM_017090	Na	Na
Gucy1b3	Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	NM_012769	Na	Na
Hif1a	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	NM_024359	Na	Na
Itpr1	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	NM_001007235	Na	Na
Itpr2	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	NM_031046	Na	Na
Itpr3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_013138	Na	Na
Kcnj8	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_017099	Na	Na
Kcnma1	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	NM_031828	Na	+ 1,76
Mylk2	Myosin light chain kinase 2	NM_001105874	Na	Na
Mylk3	Myosin light chain kinase 3	NM_057209	Na	Na
Nos3	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	NM_021838	Na	Na
Nosip	Nitric oxide synthase interacting protein	NM_001106260	Na	Na
Nostrin	Nitric oxide synthase trafficker	NM_001024260	Na	Na
Nppb	Natriuretic peptide precursor B	NM_031545	Na	Na
Nppc	Natriuretic peptide precursor C	NM_053750	Na	Na
Npr1	Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	NM_012613	Na	Na
Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1	NM_001113357	Na	Na
P2rx4	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4	NM_031594	Na	+ 1,52
Pde3a	Phosphodiesterase 3A,	NM_017337	Na	Na

Pde3b	cGMP inhibited Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	NM_017229	Na	Na
Pde5a	Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	NM_133584	Na	Na
Plcg1	Phospholipase C, gamma 1	NM_013187	Na	Na
Plcg2	Phospholipase C, gamma 2	NM_017168	Na	Na
Prkg2	Protein kinase, cGMP- dependent, type II	NM_013012	Na	Na
Ptgir	Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	NM_001077644	Na	Na
Ptgs1	Prostaglandin- endoperoxide synthase 1	NM_017043	Na	Na
Ptgs2	Prostaglandin- endoperoxide synthase 2	NM_017232	Na	Na
Ren	Renin	NM_012642	- 2,22	Na
S1pr1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	NM_017301	Na	Na
Scnn1a	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	NM_031548	Na	Na
Scnn1b	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta	NM_012648	Na	Na
Scnn1g	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	NM_017046	Na	+ 1,72
Slc7a1	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	NM_013111	Na	+ 1,58
Sphk1	Sphingosine kinase 1	NM_133386	Na	Na
Sphk2	Sphingosine kinase 2	NM_001012066	Na	Na
Uts2	Urotensin 2	NM_019160	Na	Na
Uts2r	Urotensin 2 receptor	NM_020537	Na	Na

Na: não alterado. Vit D3: vitamina D3. ^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado em relação ao grupo controle. Teste *t* de *Student* ($p < 0,05$) associado à alteração na expressão relativa maior do que 1,5 em relação ao grupo controle.

Tabela 10. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no rim de ratos Wistar Kyoto (WKY), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência *Rpl13a*, *Ldha* e *Actb*

Gene (Símbolo)	Descrição do gene	Sequência de referência (GeneBank)	Suplementado Vit D3 Redução (-) na expressão ^a	Deficiente Vit D3 Redução (-) ou aumento (+) na expressão ^a
Ace	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl- dipeptidase A) 1	NM_012544	Na	+ 1,84
Ace2	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl- dipeptidase A) 2	NM_001012006	Na	Na
Acta2	Smooth muscle alpha- actin	NM_031004	Na	Na
Adm	Adrenomedullin	NM_012715	Na	Na
Adra1b	Adrenergic, alpha-1B-, receptor	NM_016991	Na	Na
Adra1d	Adrenergic, alpha-1D-, receptor	NM_024483	Na	Na
Adrb1	Adrenergic, beta-1-, receptor	NM_012701	Na	Na
Agt	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	NM_134432	Na	Na
Agtr1a	Angiotensin II receptor, type 1a	NM_030985	Na	Na
Agtr1b	Angiotensin II receptor, type 1b	NM_031009	Na	Na
Agtr2	Angiotensin II receptor, type 2	NM_012494	Na	- 2, 89
Alox5	Arachidonate 5- lipoxygenase	NM_012822	Na	Na
Arg2	Arginase type II	NM_019168	Na	Na
Atp2c1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1	NM_131907	Na	Na
Atp6ap2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	NM_001007091	Na	Na
Avp	Arginine vasopressin	NM_016992	Na	Na
Avpr1a	Arginine vasopressin receptor 1A	NM_053019	Na	Na
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	NM_017205	Na	Na
Bdkrb1	Bradykinin receptor B1	NM_030851	Na	Na
Bdkrb2	Bradykinin receptor B2	NM_173100	Na	Na
Bmpr2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	NM_080407	Na	Na
Cacna1c	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_012517	Na	Na
Calca	Calcitonin-related polypeptide alpha	NM_017338	Na	Na
Cav1	Caveolin 1, caveolae protein	NM_031556	Na	Na
Chrna1	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)	NM_024485	Na	Na
Chrb1	Cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	NM_012528	Na	Na
Clic1	Chloride intracellular channel 1	NM_001002807	Na	Na
Clic4	Chloride intracellular channel 4	NM_031818	Na	Na
Clic5	Chloride intracellular channel 5	NM_053603	Na	Na

Cnga1	Cyclic nucleotide gated channel alpha 1	NM_053497	Na	Na
Cnga2	Cyclic nucleotide gated channel alpha 2	NM_012928	Na	Na
Cnga3	Cyclic nucleotide gated channel alpha 3	NM_053495	Na	Na
Cnga4	Cyclic nucleotide gated channel alpha 4	NM_053496	Na	Na
Cngb1	Cyclic nucleotide gated channel beta 1	NM_031809	Na	Na
Cps1	Carbamoyl-phosphate synthetase 1	NM_017072	Na	Na
Drd3	Dopamine receptor D3	NM_017140	Na	Na
Drd5	Dopamine receptor D5	NM_012768	Na	Na
Ece1	Endothelin converting enzyme 1	NM_053596	Na	Na
Edn1	Endothelin 1	NM_012548	Na	Na
Edn2	Endothelin 2	NM_012549	Na	Na
Ednra	Endothelin receptor type A	NM_012550	Na	Na
Ednrb	Endothelin receptor type B	NM_017333	Na	Na
Ephx2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	NM_022936	Na	Na
Gch1	GTP cyclohydrolase 1	NM_024356	Na	Na
Gchfr	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	NM_133595	Na	Na
Gucy1a3	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	NM_017090	Na	Na
Gucy1b3	Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	NM_012769	Na	Na
Hif1a	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	NM_024359	Na	Na
Itpr1	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	NM_001007235	Na	Na
Itpr2	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	NM_031046	Na	Na
Itpr3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_013138	Na	Na
Kcnj8	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_017099	Na	Na
Kcnma1	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	NM_031828	Na	Na
Mylk2	Myosin light chain kinase 2	NM_001105874	Na	Na
Mylk3	Myosin light chain kinase 3	NM_057209	Na	Na
Nos3	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	NM_021838	Na	Na
Nosip	Nitric oxide synthase interacting protein	NM_001106260	Na	Na
Nostrin	Nitric oxide synthase trafficker	NM_001024260	Na	Na
Nppb	Natriuretic peptide precursor B	NM_031545	Na	Na
Nppc	Natriuretic peptide precursor C	NM_053750	Na	Na
Npr1	Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	NM_012613	Na	Na
Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1	NM_001113357	Na	Na
P2rx4	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel	NM_031594	Na	Na

4				
Pde3a	Phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited	NM_017337	Na	Na
Pde3b	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	NM_017229	Na	Na
Pde5a	Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	NM_133584	Na	Na
Plcg1	Phospholipase C, gamma 1	NM_013187	Na	Na
Plcg2	Phospholipase C, gamma 2	NM_017168	Na	Na
Prkg2	Protein kinase, cGMP-dependent, type II	NM_013012	Na	Na
Ptgir	Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	NM_001077644	Na	Na
Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	NM_017043	Na	Na
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_017232	Na	Na
Ren	Renin	NM_012642	- 1,53	Na
S1pr1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	NM_017301	Na	Na
Scnn1a	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	NM_031548	Na	Na
Scnn1b	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta	NM_012648	Na	Na
Scnn1g	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	NM_017046	Na	Na
Slc7a1	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	NM_013111	Na	Na
Sphk1	Sphingosine kinase 1	NM_133386	Na	Na
Sphk2	Sphingosine kinase 2	NM_001012066	Na	Na
Uts2	Urotensin 2	NM_019160	Na	Na
Uts2r	Urotensin 2 receptor	NM_020537	Na	Na

Na: não alterado. Vit D3: vitamina D3. ^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado em relação ao grupo controle. Teste *t* de Student ($p < 0,05$) associado à alteração na expressão relativa maior do que 1,5 em relação ao grupo controle.

A tabela 11 mostra a expressão dos genes relacionados com as vias gênicas da hipertensão no coração dos ratos SHR, e os resultados mostraram que a suplementação com vitamina D3 reduziu a expressão de quatro genes (*Ace*, *Avp*, *Ephx2* e *Ren*) e induziu a expressão do gene *Myk3*, e a deficiência em vitamina D3 induziu a expressão de nove genes (*Ace*, *Agtr1b*, *Cacna1c*, *Drd5*, *Myk2*, *Nostrin*, *Scnn1a*, *Scnn1g* e *Sphk1*).

Os resultados da expressão gênica no coração dos ratos WKY (Tabela 12), mostraram que a suplementação com vitamina D3 induziu a expressão do gene *Ace2* e reduziu a expressão de nove genes (*Bdkrb2*, *Drd3*, *Drd5*, *Itpr1*, *Itpr2*, *Itpr3*,

Kcnma1, *Scnn1a* e *Scnn1g*), e a deficiência em vitamina D3 induziu a expressão de seis genes (*Ace*, *Cacna1c*, *Ednra*, *Ephx2*, *Itpr1* e *Itpr2*).

Tabela 11. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência *Rpl13a*, *Ldha* e *Actb*

Gene (Símbolo)	Descrição do gene	Sequência de referência (GeneBank)	Suplementado Vit D3 Redução (-) ou aumento (+) na expressão ^a	Deficiente Vit D3 Aumento (+) na expressão ^a
Ace	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	NM_012544	- 1,78	+ 2,07
Ace2	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	NM_001012006	Na	Na
Acta2	Smooth muscle alpha-actin	NM_031004	Na	Na
Adm	Adrenomedullin	NM_012715	Na	Na
Adra1b	Adrenergic, alpha-1B-, receptor	NM_016991	Na	Na
Adra1d	Adrenergic, alpha-1D-, receptor	NM_024483	Na	Na
Adrb1	Adrenergic, beta-1-, receptor	NM_012701	Na	Na
Agt	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	NM_134432	Na	Na
Agtr1a	Angiotensin II receptor, type 1a	NM_030985	Na	Na
Agtr1b	Angiotensin II receptor, type 1b	NM_031009	Na	+ 7,16
Agtr2	Angiotensin II receptor, type 2	NM_012494	Na	Na
Alox5	Arachidonate 5-lipoxygenase	NM_012822	Na	Na
Arg2	Arginase type II	NM_019168	Na	Na
Atp2c1	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1	NM_131907	Na	Na
Atp6ap2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	NM_001007091	Na	Na
Avp	Arginine vasopressin	NM_016992	- 5,87	Na
Avpr1a	Arginine vasopressin receptor 1A	NM_053019	Na	Na
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	NM_017205	Na	Na
Bdkrb1	Bradykinin receptor B1	NM_030851	Na	Na
Bdkrb2	Bradykinin receptor B2	NM_173100	Na	Na
Bmpr2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	NM_080407	Na	Na
Cacna1c	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_012517	Na	+ 2,39
Calca	Calcitonin-related polypeptide alpha	NM_017338	Na	Na
Cav1	Caveolin 1, caveolae protein	NM_031556	Na	Na
Chrna1	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)	NM_024485	Na	Na

Chrn1b	Cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	NM_012528	Na	Na
Clic1	Chloride intracellular channel 1	NM_001002807	Na	Na
Clic4	Chloride intracellular channel 4	NM_031818	Na	Na
Clic5	Chloride intracellular channel 5	NM_053603	Na	Na
Cnga1	Cyclic nucleotide gated channel alpha 1	NM_053497	Na	Na
Cnga2	Cyclic nucleotide gated channel alpha 2	NM_012928	Na	Na
Cnga3	Cyclic nucleotide gated channel alpha 3	NM_053495	Na	Na
Cnga4	Cyclic nucleotide gated channel alpha 4	NM_053496	Na	Na
Cngb1	Cyclic nucleotide gated channel beta 1	NM_031809	Na	Na
Cps1	Carbamoyl-phosphate synthetase 1	NM_017072	Na	Na
Drd3	Dopamine receptor D3	NM_017140	Na	Na
Drd5	Dopamine receptor D5	NM_012768	Na	+ 9,30
Ece1	Endothelin converting enzyme 1	NM_053596	Na	Na
Edn1	Endothelin 1	NM_012548	Na	Na
Edn2	Endothelin 2	NM_012549	Na	Na
Ednra	Endothelin receptor type A	NM_012550	Na	Na
Ednrb	Endothelin receptor type B	NM_017333	Na	Na
Ephx2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	NM_022936	- 1,60	Na
Gch1	GTP cyclohydrolase 1	NM_024356	Na	Na
Gchfr	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	NM_133595	Na	Na
Gucy1a3	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	NM_017090	Na	Na
Gucy1b3	Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	NM_012769	Na	Na
Hif1a	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	NM_024359	Na	Na
Itpr1	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	NM_001007235	Na	Na
Itpr2	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	NM_031046	Na	Na
Itpr3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_013138	Na	Na
Kcnj8	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_017099	Na	Na
Kcnma1	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	NM_031828	Na	Na
Mylk2	Myosin light chain kinase 2	NM_001105874	Na	+ 7,07
Mylk3	Myosin light chain kinase 3	NM_057209	+ 1,73	Na
Nos3	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	NM_021838	Na	Na
Nosip	Nitric oxide synthase interacting protein	NM_001106260	Na	Na
Nostrin	Nitric oxide synthase trafficker	NM_001024260	Na	+ 2,41
Nppb	Natriuretic peptide precursor B	NM_031545	Na	Na
Nppc	Natriuretic peptide precursor C	NM_053750	Na	Na

Npr1	Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atriuretic peptide receptor A)	NM_012613	Na	Na
Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1	NM_001113357	Na	Na
P2rx4	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4	NM_031594	Na	Na
Pde3a	Phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited	NM_017337	Na	Na
Pde3b	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	NM_017229	Na	Na
Pde5a	Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	NM_133584	Na	Na
Plcg1	Phospholipase C, gamma 1	NM_013187	Na	Na
Plcg2	Phospholipase C, gamma 2	NM_017168	Na	Na
Prkg2	Protein kinase, cGMP-dependent, type II	NM_013012	Na	Na
Ptgir	Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	NM_001077644	Na	Na
Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	NM_017043	Na	Na
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_017232	Na	Na
Ren	Renin	NM_012642	- 2,72	Na
S1pr1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	NM_017301	Na	Na
Scnn1a	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	NM_031548	Na	+ 2,21
Scnn1b	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta	NM_012648	Na	Na
Scnn1g	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	NM_017046	Na	+ 2,23
Slc7a1	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	NM_013111	Na	Na
Sphk1	Sphingosine kinase 1	NM_133386	Na	+ 4,94
Sphk2	Sphingosine kinase 2	NM_001012066	Na	Na
Uts2	Urotensin 2	NM_019160	Na	Na
Uts2r	Urotensin 2 receptor	NM_020537	Na	Na

Na: não alterado. Vit D3: vitamina D3. ^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado em relação ao grupo controle. Teste *t* de *Student* ($p < 0,05$) associado à alteração na expressão relativa maior do que 1,5 em relação ao grupo controle.

Tabela 12. Expressão relativa de genes relacionados à hipertensão, no coração de ratos Wistar Kyoto (WKY), alimentados com a dieta suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3. Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência *Rpl13a*, *Ldha* e *Actb*

Gene (Símbolo)	Descrição do gene	Sequência de referência (GeneBank)	Suplementado Vit D3 Redução (-) ou aumento (+) na expressão ^a	Deficiente Vit D3 Aumento (+) na expressão ^a
Ace	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	NM_012544	Na	+ 2,14
Ace2	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	NM_001012006	+ 2,41	Na
Acta2	Smooth muscle alpha-actin	NM_031004	Na	Na
Adm	Adrenomedullin	NM_012715	Na	Na
Adra1b	Adrenergic, alpha-1B-, receptor	NM_016991	Na	Na
Adra1d	Adrenergic, alpha-1D-, receptor	NM_024483	Na	Na
Adrb1	Adrenergic, beta-1-, receptor	NM_012701	Na	Na
Agt	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	NM_134432	Na	Na
Agtr1a	Angiotensin II receptor, type 1a	NM_030985	Na	Na
Agtr1b	Angiotensin II receptor, type 1b	NM_031009	Na	Na
Agtr2	Angiotensin II receptor, type 2	NM_012494	Na	Na
Alox5	Arachidonate 5-lipoxygenase	NM_012822	Na	Na
Arg2	Arginase type II	NM_019168	Na	Na
Atp2c1	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1	NM_131907	Na	Na
Atp6ap2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	NM_001007091	Na	Na
Avp	Arginine vasopressin	NM_016992	Na	Na
Avpr1a	Arginine vasopressin receptor 1A	NM_053019	Na	Na
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	NM_017205	Na	Na
Bdkrb1	Bradykinin receptor B1	NM_030851	Na	Na
Bdkrb2	Bradykinin receptor B2	NM_173100	- 3,91	Na
Bmpr2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	NM_080407	Na	Na
Cacna1c	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_012517	Na	+ 1,81
Calca	Calcitonin-related polypeptide alpha	NM_017338	Na	Na
Cav1	Caveolin 1, caveolae protein	NM_031556	Na	Na
Chrna1	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)	NM_024485	Na	Na
Chrn1b	Cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	NM_012528	Na	Na
Clic1	Chloride intracellular channel 1	NM_001002807	Na	Na
Clic4	Chloride intracellular channel 4	NM_031818	Na	Na
Clic5	Chloride intracellular channel 5	NM_053603	Na	Na
Cnga1	Cyclic nucleotide gated	NM_053497	Na	Na

	channel alpha 1			
Cnga2	Cyclic nucleotide gated channel alpha 2	NM_012928	Na	Na
Cnga3	Cyclic nucleotide gated channel alpha 3	NM_053495	Na	Na
Cnga4	Cyclic nucleotide gated channel alpha 4	NM_053496	Na	Na
Cngb1	Cyclic nucleotide gated channel beta 1	NM_031809	Na	Na
Cps1	Carbamoyl-phosphate synthetase 1	NM_017072	Na	Na
Drd3	Dopamine receptor D3	NM_017140	- 1,62	Na
Drd5	Dopamine receptor D5	NM_012768	- 4,03	Na
Ece1	Endothelin converting enzyme 1	NM_053596	Na	Na
Edn1	Endothelin 1	NM_012548	Na	Na
Edn2	Endothelin 2	NM_012549	Na	Na
Ednra	Endothelin receptor type A	NM_012550	Na	+ 1,67
Ednrb	Endothelin receptor type B	NM_017333	Na	Na
Ephx2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	NM_022936	Na	+ 3,18
Gch1	GTP cyclohydrolase 1	NM_024356	Na	Na
Gchfr	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	NM_133595	Na	Na
Gucy1a3	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	NM_017090	Na	Na
Gucy1b3	Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	NM_012769	Na	Na
Hif1a	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	NM_024359	Na	Na
Itpr1	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	NM_001007235	- 2,36	+ 2,18
Itpr2	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	NM_031046	- 2,20	+ 2,20
Itpr3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_013138	- 1,60	Na
Kcnj8	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_017099	Na	Na
Kcnma1	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	NM_031828	- 3,45	Na
Mylk2	Myosin light chain kinase 2	NM_001105874	Na	Na
Mylk3	Myosin light chain kinase 3	NM_057209	Na	Na
Nos3	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	NM_021838	Na	Na
Nosip	Nitric oxide synthase interacting protein	NM_001106260	Na	Na
Nostrin	Nitric oxide synthase trafficker	NM_001024260	Na	Na
Nppb	Natriuretic peptide precursor B	NM_031545	Na	Na
Nppc	Natriuretic peptide precursor C	NM_053750	Na	Na
Npr1	Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	NM_012613	Na	Na
Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1	NM_001113357	Na	Na
P2rx4	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4	NM_031594	Na	Na

Pde3a	Phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited	NM_017337	Na	Na
Pde3b	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	NM_017229	Na	Na
Pde5a	Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	NM_133584	Na	Na
Plcg1	Phospholipase C, gamma 1	NM_013187	Na	Na
Plcg2	Phospholipase C, gamma 2	NM_017168	Na	Na
Prkg2	Protein kinase, cGMP-dependent, type II	NM_013012	Na	Na
Ptgir	Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	NM_001077644	Na	Na
Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	NM_017043	Na	Na
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_017232	Na	Na
Ren	Renin	NM_012642	Na	Na
S1pr1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	NM_017301	Na	Na
Scnn1a	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	NM_031548	- 2,91	Na
Scnn1b	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta	NM_012648	Na	Na
Scnn1g	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	NM_017046	- 3,79	Na
Slc7a1	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	NM_013111	Na	Na
Sphk1	Sphingosine kinase 1	NM_133386	Na	Na
Sphk2	Sphingosine kinase 2	NM_001012066	Na	Na
Uts2	Urotensin 2	NM_019160	Na	Na
Uts2r	Urotensin 2 receptor	NM_020537	Na	Na

Na: não alterado. Vit D3: vitamina D3. ^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado em relação ao grupo controle. Teste *t* de *Student* ($p < 0,05$) associado à alteração na expressão relativa maior do que 1,5 em relação ao grupo controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5. 1. Efeitos da suplementação e deficiência em vitamina D3 sobre a pressão arterial sistólica, quantificação plasmática, danos genéticos, produção de ERO, peroxidação lipídica e fibrose renal

A vitamina D possui ações biológicas em diversos tecidos e sistemas, incluindo os sistemas cardiovascular, renal e vascular periférico (AL MHEID et al., 2013; HANNAH; NORMAN, 1994). É conhecido que a vitamina D participa do controle das funções renais e cardíacas, além de atuar sobre a pressão arterial, interferindo na dinâmica do sistema renina-angiotensina-aldosterona (CASTRO, 2011).

Os resultados deste estudo mostraram que, nos animais SHR, a dieta suplementada com vitamina D3 aumentou significativamente a concentração plasmática de vitamina D3; reduziu a pressão arterial sistólica; manteve os danos ao DNA, os danos aos cromossomos e as concentrações de TBARS e GSH próximas ao basal; e não alterou o percentual de fibrose no rim. A deficiência em vitamina D3, nos animais SHR, reduziu significativamente a concentração plasmática de vitamina D3; elevou a pressão arterial sistólica; aumentou os danos ao DNA e aos cromossomos; induziu peroxidação lipídica no rim e coração; aumentou a produção de ERO nos neutrófilos e o percentual de fibrose no rim.

Nos animais WKY, a dieta deficiente em vitamina D3 aumentou os danos ao DNA no sangue periférico e o percentual de fibrose no rim. A dieta suplementada com vitamina D3, nos animais WKY, demonstrou efeito apenas na regulação da expressão gênica. Nos demais parâmetros avaliados (pressão arterial sistólica, dano aos cromossomos, marcadores do estresse oxidativo GSH e TBARS e *burst* oxidativo dos neutrófilos), os ratos WKY alimentados com as dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3 não diferiram em relação aos animais alimentados com a dieta controle.

Em relação ao possível efeito órgão-específico das dietas suplementada ou deficiente em vitamina D3, não foram observadas alterações significativas no ganho de massa corpórea, consumo das dietas e na relação massa do órgão e massa corpórea, tanto nos animais SHR, quanto nos animais WKY. Como o consumo das dietas suplementada e deficiente em vitamina D3 foi similar entre os grupos

experimentais, é possível inferir que a palatabilidade das dietas administradas aos animais SHR e WKY não foi alterada. Outros estudos de intervenções dietéticas com a vitamina D3 em ratos também observaram ausência de alterações significativas no ganho de massa dos animais que receberam as dietas suplementada (BORGES et al., 1999; BORGES et al., 2002) ou deficiente em vitamina D3 (CADE; NORMAN, 1986; FERON et al., 2005), durante longos períodos de tratamento.

Em estudos de intervenções dietéticas, é importante que se utilize uma metodologia para mensurar as concentrações séricas ou plasmáticas do composto da dieta avaliado, e para a identificação da deficiência ou suplementação em vitamina D3, grande parte dos estudos utilizam a quantificação de 25-hidroxivitamina D3 como parâmetro (FERON et al., 2005; WONG et al., 2010).

A quantificação plasmática de 25-hidroxivitamina D3 foi realizada com o objetivo de caracterizar a suplementação e a deficiência em vitamina D3 nos ratos SHR e WKY, como demonstrado nos resultados. Para a dieta controle em vitamina D3, um estudo com ratos Wistar alimentados com dieta AIN-93 mostrou uma concentração plasmática de vitamina D3 similar à observada para os ratos SHR e WKY controles (DOMINGUES-FARIA et al., 2014), sugerindo que os resultados obtidos nesse estudo estão dentro do padrão de referência para a concentração plasmática de vitamina D3 em roedores. No entanto, na literatura não há informações de referência sobre as concentrações alcançadas no plasma de ratos após suplementação com vitamina D3 (10 vezes, por ingestão de dieta AIN-93) ou após a total remoção desse micronutriente da dieta.

Em ambos os modelos experimentais estudados, a remoção do micronutriente vitamina D3 da dieta levou à sua deficiência, de forma que as concentrações plasmáticas ficaram próximas a 3 ng/mL. A administração da dieta suplementada 10 vezes, em relação à dieta controle, aumentou a concentração de 25-hidroxivitamina D3 no plasma em cerca de 2 vezes, tanto para os ratos SHR quanto para os ratos WKY. A vitamina D proveniente da dieta, ao ser transportada pelos quilomícrons, é comumente absorvida pelos tecidos periféricos, como os tecidos adiposo e muscular, e também é removida pelo fígado quando conjugada aos quilomícrons (JONES, 2008; MAWER et al., 1971). A absorção e o armazenamento tecidual, assim como a eliminação pelo fígado, justificam as mais baixas concentrações plasmáticas de vitamina D3 atingidas após a ingestão da dieta suplementada com vitamina D3.

Em relação à pressão arterial sistólica, a dieta suplementada com vitamina D3 foi capaz de reduzi-la em aproximadamente 12% nos animais SHR, quando comparado os níveis tensionais do início do tratamento com os obtidos ao final das 12 semanas. No estudo de Wong et al. (2010), no qual ratos SHR receberam suplementação com 1,25-dihidroxitamina D3 (na dose de 10 ng/100 g de massa corpórea/dia) via bombeamento osmótico ao longo de 6 semanas, foi observada uma redução da pressão arterial sistólica de aproximadamente 17%, quando comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que a suplementação com a vitamina D3 foi eficiente na redução da pressão arterial sistólica apenas no modelo de hipertensão arterial SHR, não alterando os níveis tensionais dos ratos normotensos WKY. No entanto, é importante considerar que a diminuição da pressão arterial sistólica dos animais SHR, após suplementação com a vitamina D3, não foi capaz de atingir níveis tensionais normotensivos, como os encontrados nos animais WKY.

A associação entre a vitamina D3 e a hipertensão arterial tem sido demonstrada em vários estudos. A maioria dos trabalhos demonstra uma relação inversa entre as concentrações plasmáticas de vitamina D3 e a hipertensão arterial (FORMAN et al., 2013; WITHAM; NADIR; STRUTHERS, 2009). Wong et al. (2010) mostraram que a suplementação com vitamina D3 é mais eficiente quando a pressão arterial sistólica inicial é maior do que 190 mmHg. Dessa forma, a ausência de efeitos da dieta suplementada com vitamina D3 nos animais WKY pode ter ocorrido devido aos baixos níveis tensionais relacionados à condição de normotensão.

A administração da dieta deficiente em vitamina D3 aos animais SHR aumentou significativamente a pressão arterial sistólica na décima segunda semana de tratamento (média de 192,50 mmHg), quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle em vitamina D3 (média de 186,25 mmHg). Um estudo demonstrou uma possível associação entre a deficiência em vitamina D e o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos jovens (TARE et al., 2011), sugerindo que a deficiência em vitamina D pode estar relacionada ao desenvolvimento de hipertensão nos primeiros estágios de desenvolvimento de um organismo, sendo também observada na vida adulta. No presente estudo, foi utilizado ratos adultos que se encontravam na fase platô do desenvolvimento da hipertensão arterial, com pressão arterial sistólica próxima ao limiar máximo obtido para os SHR e, dessa forma, só foi

possível estabelecer uma relação direta entre a deficiência em vitamina D3 e a elevação da pressão arterial sistólica nos SHR na última semana de tratamento. Os ratos SHR alimentados com dieta deficiente permaneceram hipertensos ao longo de todo o período experimental, e os resultados significativos obtidos apenas na décima segunda semana de tratamento, sugerem que períodos mais longos de deficiência em vitamina D3 poderiam culminar com maior elevação da pressão arterial sistólica.

Em relação aos danos ao DNA e aos cromossomos, a % DNA na cauda dos nucleóides e a frequência de micronúcleos não foram alteradas quando a dieta suplementada com vitamina D3 foi administrada aos animais SHR e WKY. Entretanto, a dieta deficiente em vitamina D3 aumentou as quebras de fitas simples e duplas do DNA, no sangue periférico dos ratos SHR e WKY, e elevou a frequência de micronúcleos no sangue periférico e na medula óssea dos ratos SHR. No rim e coração, não foi observado efeito da dieta deficiente sobre os danos ao DNA, tanto nos animais SHR quanto nos animais WKY. Esses resultados indicam que as células sanguíneas mostraram-se mais sensíveis à deficiência em vitamina D3 em relação às células cardíacas e renais, e foi possível observar que a dieta deficiente em vitamina D3 induziu quebras de fitas do DNA não apenas nos animais SHR, mas também nos animais WKY.

Na literatura, estudos demonstram que a suplementação com vitamina D3 está associada à manutenção da estabilidade cromossômica em ratos e humanos. Um estudo demonstrou que a frequência de aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs foi reduzida em ratos com linfoma, após suplementação com vitamina D (SARKAR et al., 2000). Outro estudo destacou que concentrações séricas adequadas de vitamina D podem estar relacionadas a uma menor frequência de micronúcleos em linfócitos, quando comparado com as concentrações séricas deficientes em vitamina D (NAIR-SHALLIKER et al., 2012). Desta forma, a manutenção de concentrações intracelulares ideais de vitamina D é importante na prevenção de alterações oxidativas e danos ao DNA de humanos (NAIR-SHALLIKER; ARMSTRONG; FENECH, 2012).

A suplementação com a 1,25-dihidroxitamina D3, ao longo de 15 dias, também foi relacionada com a redução dos danos ao DNA induzidos pelo diabetes *mellitus* tipo 2 (MEERZA; NASEEM; AHMED, 2012), e com a proteção de células hepáticas aos danos ao DNA induzidos pela dietilnitrosamina, um potente agente carcinógeno do fígado (BANAKAR et al., 2004).

Ao contrário da suplementação, a deficiência em vitamina D está associada à maior frequência de aberrações cromossômicas e trocas de cromátides-irmãs (CHATTERJEE, 2001; PENG et al., 2010), e à elevação das concentrações de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, um biomarcador dos danos oxidativos ao DNA (SMITH et al., 2005). Um estudo mostrou que a deficiência em vitamina D3 tem sido utilizada como um marcador do aumento dos danos ao DNA no lúpus eritematoso sistêmico (MOK et al., 2012). Em nosso estudo, a deficiência em vitamina D3 levou a um aumento da frequência de micronúcleos na medula óssea e no sangue periférico apenas no modelo de hipertensão arterial SHR, mas nas células sanguíneas induziu aumento de quebras de fitas simples e duplas do DNA nos dois modelos experimentais, como demonstrado pelo ensaio do cometa. Esses resultados sugerem que a deficiência em vitamina D3 pode induzir danos ao DNA tanto em indivíduos hipertensos quanto em indivíduos normotensos.

No teste do micronúcleo na medula óssea foi possível observar uma maior frequência de micronúcleos nos animais SHR alimentados com a dieta controle em vitamina D3, quando comparado aos animais WKY alimentados com a mesma dieta. Esses resultados sugerem que a condição de hipertensão arterial pode estar associada ao aumento da instabilidade cromossômica. Resultado semelhante foi observado quando fêmeas adultas SHR foram comparadas com fêmeas adultas WKY, quanto ao número de aberrações cromossômicas e de metáfases anormais, sendo encontrada uma frequência significativamente maior nas fêmeas SHR (ALMEIDA et al., 2008).

Estudos têm confirmado a função patofisiológica das ERO nos ratos SHR (COLLETT et al., 2013; WILCOX, 2002), e demonstrado que a disfunção endotelial dos SHR está relacionada à geração do ânion superóxido, que é produzido espontaneamente nos ratos hipertensos, mas não no seu controle normotenso WKY (ZALBA et al., 2001). O excesso da geração de ERO, o decréscimo das concentrações de óxido nítrico e a reduzida capacidade antioxidante dos sistemas cardiovascular, renal e nervoso são condições associadas à progressão da hipertensão arterial (MONTEZANO; TOUYZ, 2012; PARAVICINI; TOUYZ, 2008).

O *burst* oxidativo dos neutrófilos (ou *burst* respiratório) consiste na produção de ERO em resposta à atividade da NADPH oxidase, produzindo o ânion superóxido que, ao se recombinar com outras moléculas, pode gerar outras ERO (BABIOR, 1988; EL-BENNA et al., 2005). Já foi demonstrado que o ânion superóxido é

produzido espontaneamente nos ratos SHR (mas não nos WKY) (ZALBA et al., 2001), e Chatterjee et al. (2009) mostraram que os neutrófilos dos ratos SHR têm um aumento espontâneo na atividade de *burst* oxidativo, quando comparado aos ratos normotensivos WKY, devido à condição de elevação da pressão arterial (CHATTERJEE et al., 2009).

Os resultados do presente estudo mostraram que a dieta deficiente em vitamina D3 aumentou a produção de ERO nos ratos SHR, e esse aumento pode ter resultado em danos ao DNA e aos cromossomos das células, evidenciado pelo aumento das quebras de fita simples e duplas do DNA, e pela maior frequência de micronúcleos nos ratos SHR que receberam a dieta deficiente em vitamina D3. Uma vez que estudos recentes têm demonstrado o papel da deficiência em vitamina D na geração de ERO e sua implicação na hipertensão arterial (MANUCHA; RITCHIE; FERDER, 2015; MIN, 2013), os resultados do *burst* oxidativo dos neutrófilos confirmam a relação entre a deficiência em vitamina D3 e o aumento da produção de ERO nos ratos SHR.

Além do *burst* oxidativo, outros marcadores do estresse oxidativo também podem ser modulados pela vitamina D3. Nos animais SHR e WKY, as dietas suplementada e deficiente em vitamina D3 não alteraram as concentrações renais de GSH, um tripeptídeo que atua na defesa das células sobre as ERO (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008), quando comparado aos respectivos grupos controle em vitamina D3. Entretanto, a concentração basal de GSH no rim dos animais SHR mostrou-se significativamente maior em comparação aos animais WKY, demonstrando uma possível associação entre a condição de hipertensão arterial e o aumento das concentrações renais de GSH. Esse aumento pode estar relacionado a um mecanismo compensatório dos ratos SHR, de manutenção da estabilidade das células renais, atuando na proteção da geração de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), uma vez que os radicais livres são espontaneamente produzidos na situação fisiológica de hipertensão arterial, como demonstrado em estudos prévios (RODRIGO et al., 2003; RODRIGO et al., 2007).

Nos animais SHR, tanto no rim quanto no coração, a deficiência em vitamina D3 aumentou as concentrações de TBARS, um indicador da peroxidação dos ácidos graxos insaturados nas membranas lipídicas, iniciado pelas ERO (POTTER; NEUN; STERN, 2011). Um estudo demonstrou que concentrações de malondialdeído, quantificadas por meio de TBARS, são elevadas quando associadas a fatores de

risco cardiovascular, hipertensão arterial e diabetes (WALTER et al., 2004). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a deficiência em vitamina D3 está associada à peroxidação lipídica dos ácidos graxos nas membranas das células cardíacas e renais, e que o aumento da produção de TBARS ocorreu como consequência do aumento da produção de ERO induzido pela deficiência em vitamina D3, nos animais hipertensos SHR.

A hipertensão, característica dos ratos SHR, está relacionada com o desenvolvimento de fibrose tubulointersticial no rim. O processo de fibrose renal se desenvolve após o aparecimento de nefrite intersticial, inflamação, proliferação de fibroblastos intersticiais e excessiva deposição de colágeno intersticial na matriz extracelular (DORIS, 2012; GRIFFIN, 2006; MEZZANO; RUIZ-ORTEGA; EGIDO, 2001). A hipertensão induz lesões no interstício renal por meio de três vias principais: a isquemia glomerular induzida por lesão vascular, a hipertensão glomerular pela perda de auto-regulação e a ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona (KINCAID-SMITH, 1999).

Células tubulares renais desempenham um papel central na patogênese da fibrose intersticial. Essas células podem ser estimuladas pelo extravasamento de peptídeos como os fatores de crescimento, citocinas e a angiotensina II (JOHNSON et al., 1992; MEZZANO; RUIZ-ORTEGA; EGIDO, 2001). Um estudo demonstrou que o peptídeo angiotensina II, principal molécula efetora do sistema renina-angiotensina-aldosterona, induz estresse oxidativo no rim por meio do aumento das concentrações de NADPH oxidase e pela redução das concentrações de superóxido dismutase, regulando positivamente a síntese e negativamente a degradação de colágeno, promovendo o desenvolvimento de fibrose no rim de ratos hipertensos (ZHAO et al., 2008).

No presente estudo, o percentual de fibrose no rim dos ratos hipertensos SHR foi maior do que o encontrado nos ratos normotensos WKY, uma vez que a hipertensão induz processos que culminam com a deposição de colágeno e indução de fibrose, como descrito nos parágrafos acima. A dieta deficiente em vitamina D3 induziu um aumento do percentual de fibrose no rim dos ratos SHR e WKY. Em relação aos ratos SHR deficientes em vitamina D3, o aumento do percentual de fibrose renal foi acompanhado por uma maior produção de ERO nos neutrófilos em resposta à maior atividade da NADPH oxidase, e da indução da expressão de genes envolvidos com o aumento da síntese de angiotensina II no rim (que serão

discutidos adiante). De acordo com os estudos prévios que associam a ativação da angiotensina II ao aumento das concentrações de NADPH oxidase e à indução de lesão tecidual (LEE et al., 2003; TOUYZ; TABET; SCHIFFRIN, 2003; ZHAO et al., 2008), a deficiência em vitamina D3 pode ter induzido fibrose renal nos ratos SHR como consequência do aumento da síntese de angiotensina II e da hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

O efeito da deficiência em vitamina D3 sobre a fibrose no rim dos ratos WKY ainda não foi descrito na literatura. Apesar da grande diferença entre a pressão arterial sistólica dos ratos SHR e dos ratos WKY, a deficiência em vitamina D3 induziu elevado percentual de fibrose no rim dos dois modelos experimentais avaliados. Esse resultado sugere que, embora a hipertensão seja um fator determinante para o desenvolvimento de fibrose renal, a deficiência em vitamina D3 parece desempenhar um importante papel na indução de dano tecidual e acúmulo de fibras colágenas. O resultado obtido no presente estudo poderá trazer implicações clínicas relevantes em relação à origem da fibrose renal em indivíduos não-hipertensos e deficientes em vitamina D3.

5.2. Regulação da expressão gênica pela vitamina D3

A relação vitamina D3 e hipertensão arterial também ocorre via regulação da expressão gênica. Estudos prévios já demonstraram que a forma ativa da vitamina D3 é capaz de inibir a expressão do gene da pré-pró-renina, e assim atuar como um modulador negativo da renina (LI et al., 2002). Além da interação direta com o gene da pré-pró-renina, a vitamina D3 (atuando por meio da ligação da 1,25-dihidroxitamina D3 com o VDR) vem sendo associada à regulação da expressão de inúmeros genes, como os relacionados com a homeostase do cálcio e fósforo (BENN et al., 2008; BOUILLON; BISCHOFF-FERRARI; WILLETT, 2008), com a degradação de xenobióticos (BOUILLON; BISCHOFF-FERRARI; WILLETT, 2008), a diferenciação dos queratinócitos na pele (BIKLE, 2004), a função imune (HOSSEIN-NEZHAD; SPIRA; HOLICK, 2013), com o desenvolvimento e progressão de doenças (ARDESIA; FERLAZZO; FRIES, 2015; ARGACHA et al., 2011; JUDD; TANGPRICHA, 2009), entre outros.

No presente estudo, foi avaliado a expressão de 84 genes pertencentes a diversas vias gênicas relacionadas à hipertensão (como a vasodilatação e

vasoconstrição, tônus vascular, contração e relaxamento da musculatura lisa, regulação da pressão arterial, sistema renina-angiotensina-aldosterona, sinalização e metabolismo do óxido nítrico, resposta à hipóxia e transporte de íons), com a proposta de identificar novas ações biológicas da vitamina D3 sobre as células cardíacas e renais, e aumentar a compreensão da interação entre vitamina D3, hipertensão e regulação da expressão gênica.

No rim, a dieta suplementada com vitamina D3 regulou a expressão dos genes *Ace*, *Agt*, *Edn1* e *Ren* nos ratos SHR e do gene *Ren* nos ratos WKY. A dieta deficiente em vitamina D3 regulou a expressão dos genes *Ace*, *Acta2*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Alox5*, *Cacna1c*, *Ece1*, *Ednra*, *Kcnma1*, *P2rx4*, *Scnn1g* e *Slc7a1* nos ratos SHR e dos genes *Ace*, *Arg2* e *Cps1* nos ratos WKY.

No coração, a dieta suplementada com vitamina D3 regulou a expressão dos genes *Ace*, *Avp*, *Ephx2*, *Mylk3* e *Ren* nos ratos SHR e dos genes *Ace2*, *Bdkrb2*, *Drd3*, *Drd5*, *Itpr1*, *Itpr2*, *Itpr3*, *Kcnma1*, *Scnn1a* e *Scnn1g* nos ratos WKY. A dieta deficiente em vitamina D3 regulou a expressão dos genes *Ace*, *Agtr1b*, *Cacna1c*, *Drd5*, *Mylk2*, *Nostrin*, *Scnn1a*, *Scnn1g* e *Sphk1* nos ratos SHR e dos genes *Ace*, *Cacna1c*, *Ednra*, *Ephx2*, *Itpr1* e *Itpr2* nos ratos WKY.

5.2.1. No rim

5.2.1.1. Dieta suplementada com vitamina D3

A dieta suplementada com vitamina D3 modulou, no rim, a expressão de quatro genes nos ratos SHR e um gene nos ratos WKY. A expressão do gene *Ren*, responsável pela codificação da pré-pró-renina que, posteriormente, é convertida em renina, foi regulada negativamente tanto no modelo hipertenso SHR (-2,22 vezes) quanto no seu controle normotenso WKY (-1,53 vezes). Esses resultados sugerem que, pelo mecanismo descrito por YUAN et al. (2007), no qual a forma ativa da vitamina D3 se liga ao CREB (elemento fixador de proteínas em resposta ao AMP cíclico), impedindo o seu acoplamento ao CRE (elemento regulador de AMP cíclico) e inibindo a expressão do gene da pré-pró-renina, a suplementação com a vitamina D3 modulou o primeiro passo da via de ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e, provavelmente, levou a uma diminuição das concentrações de renina nas células justaglomerulares, sendo um evento responsável pela diminuição da

pressão arterial nos animais hipertensos, como foi observado nos resultados de aferição da pressão arterial sistólica.

No rim dos ratos SHR, a dieta suplementada com vitamina D3 também diminuiu a expressão dos genes *Ace*, *Agt* e *Edn1*, envolvidos com as vias de regulação da pressão arterial, do sistema renina-angiotensina-aldosterona e de vasoconstrição.

O gene *Agt* codifica o angiotensinogênio, uma proteína circulante que atua como substrato da renina para a produção de angiotensina I, e posteriormente angiotensina II. Uma vez que o rim expressa abundantemente o mRNA do angiotensinogênio, a redução de sua expressão é causa potencial da diminuição das concentrações de angiotensina II (MATSUSAKA et al., 2012). Dessa forma, a diminuição da expressão do gene *Agt* pela dieta suplementada com vitamina D3 pode estar envolvida com o controle da pressão arterial nos animais SHR, atuando na redução das concentrações renais de angiotensina I e angiotensina II e, conseqüentemente, diminuindo a reabsorção de sódio e inibindo a liberação de aldosterona, eventos relacionados com a diminuição da pressão arterial.

O gene *Ace* codifica a enzima conversora de angiotensina I (ACE), enzima que participa da conversão da angiotensina I em angiotensina II. Em ratos SHR, a expressão do gene *Ace* está normalmente aumentada em rim e coração, quando comparado aos animais normotensos (LEE et al., 2012). A relação entre o aumento da expressão do mRNA da ACE e a elevação da pressão arterial já foi descrita anteriormente (GALLAGHER et al., 1999; HE et al., 2013; LEE et al., 2012; SHIOTA; MIYAZAKI; OKUNISHI, 1992), e no presente estudo, a suplementação com vitamina D3 mostrou-se envolvida com a regulação negativa do gene *Ace*, o que provavelmente levou à uma redução da síntese de angiotensina II, e resultou na redução da pressão arterial nos animais SHR.

Mecanismos anti-hipertensivos eficazes e muito utilizados nos dias atuais são realizado por inibidores da ACE, como o captopril, cujo principal mecanismo de ação é a repressão da síntese de angiotensina II e a redução da liberação de aldosterona, a fim de que ocorra o controle da hipertensão arterial (CASAS et al., 2005; MATCHAR et al., 2008). Os resultados do presente estudo sugerem que a vitamina D3, por meio da suplementação, atuou de forma semelhante aos inibidores da ACE, uma vez que o aumento das concentrações intracelulares de vitamina D3 pode ter

levado à redução da síntese de angiotensina II e resultado na diminuição da pressão arterial sistólica.

Outro gene reprimido pela dieta suplementada em vitamina D3 no rim dos ratos SHR foi o *Edn1*, que codifica o polipeptídeo endotelina 1, um potente vasoconstritor produzido pelo endotélio dos vasos sanguíneos. Em condições normais, as concentrações de endotelina 1 são baixas, mas no caso da ocorrência de hipertensão arterial pulmonar, as suas concentrações elevam-se de forma significativa (KIM; RUBIN, 2002). Ao reprimir a expressão do gene *Edn1*, a dieta suplementada com vitamina D3 pode ter atuado, mais uma vez, no controle e manutenção da pressão arterial dos ratos SHR.

Em resumo, no rim dos animais SHR, a dieta suplementada com vitamina D3 atuou na redução da pressão arterial, a nível molecular e fisiológico. Os resultados obtidos nesse estudo, com o auxílio da técnica transcriptômica de RT² Profiler™ PCR Arrays, mostraram que os quatro genes com expressão reduzida estavam diretamente envolvidos com processos relacionados à redução da pressão arterial. De maneira interessante, os resultados moleculares corroboraram com os fisiológicos obtidos na aferição da pressão arterial sistólica dos ratos SHR.

5.2.1.2. Dieta deficiente em vitamina D3

A dieta deficiente em vitamina D3, no rim, modulou a expressão de 13 genes nos animais SHR (*Ace*, *Acta2*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Alox5*, *Cacna1c*, *Ece1*, *Ednra*, *Kcnma1*, *P2rx4*, *Scnn1g* e *Slc7a1*) e três genes nos animais WKY (*Ace*, *Arg2* e *Cps1*), e o gene *Ace* teve a sua expressão induzida nos dois modelos experimentais. De forma contrária à observada em relação à suplementação com vitamina D3, a dieta deficiente aumentou a expressão do mRNA da ACE, condição relacionada com a elevação da pressão arterial por meio do aumento da síntese de angiotensina II e indução de vasoconstrição (GALLAGHER et al., 1999; HE et al., 2013; LEE et al., 2012; SHIOTA; MIYAZAKI; OKUNISHI, 1992), caracterizando a relação entre deficiência em vitamina D3 e aumento da pressão arterial.

Nos ratos normotensos WKY, a dieta deficiente em vitamina D3 modulou a expressão dos genes *Cps1* e *Arg2*. O gene *Arg2* codifica a enzima arginase tipo II, responsável pela hidrólise da arginina em ornitina e ureia (LI et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento da enzima arginase tipo II na regulação da

síntese do NO, uma vez que essa enzima e o NO utilizam a arginina como substrato comum (VOCKLEY et al., 1996). Um estudo demonstrou que camundongos nocaute para a arginase tipo II exibiram um fenótipo hipertensivo (HUYNH et al., 2009), sugerindo que o silenciamento do gene *Arg2* está associado ao aumento da pressão arterial. No presente trabalho, a dieta deficiente em vitamina D3 diminuiu a expressão do gene *Arg2*, indicando uma possível relação entre a deficiência em vitamina D3 e o desenvolvimento progressivo da hipertensão arterial em indivíduos normotensos.

Nos animais WKY, outro gene que aumentou a sua expressão após tratamento com a dieta deficiente em vitamina D3 foi o *Cps1*, gene que codifica a enzima carbamoil fosfato sintetase 1, envolvida com o ciclo da uréia e detoxificação do excesso de amônia (NAKAGAWA et al., 2009). Mutações no gene *Cps1* vêm sendo associadas à hipertensão pulmonar (CANTER et al., 2007), e polimorfismos nesse gene estão envolvidas com alterações na resistência vascular (SUMMAR et al., 2004). A *CPS1*, em humanos, pode contribuir para a maior disponibilidade de precursores do NO, levando ao aumento de suas concentrações (PEARSON et al., 2001). Em ratos, o gene *Cps1* participa do metabolismo do NO e da vasodilatação, e o aumento da sua expressão pela dieta deficiente em vitamina D3 pode estar envolvido com um mecanismo compensatório de manutenção dos níveis normotensivos dos WKY, uma vez que os resultados de aferição da pressão arterial sistólica não se mostraram diferentes em relação ao grupo controle em vitamina D3.

No rim dos ratos hipertensos SHR, a dieta deficiente em vitamina D3 modulou a expressão de 13 genes envolvidos com as vias de vasoconstrição, tônus vascular, de contração da musculatura lisa, regulação da pressão arterial, do metabolismo do NO, transporte de íons, e grande parte dos genes envolvidos com a via do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

A dieta deficiente em vitamina D3, no rim, aumentou a expressão de cinco genes envolvidos com a via do sistema renina-angiotensina-aldosterona nos ratos SHR: *Ace*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b* e *Ece1*. O gene que codifica o angiotensinogênio (*Agt*), substrato da renina, assim como o gene que codifica a enzima conversora de angiotensina tipo 1 (*Ace*), os genes do receptor específico de angiotensina tipo 1 (*Agtr1a* e *Agtr1b*) e o gene que codifica a enzima conversora de endotelina (*Ece1*), sendo a endotelina um potente vasoconstritor, foram modulados positivamente pela deficiência em vitamina D3.

Os rins são a principal fonte de produção e liberação da renina circulante. Quando estimulada, a renina é liberada para o plasma convertendo o angiotensinogênio (a partir da clivagem da sua porção N-terminal) em angiotensina I (ICHIHARA et al., 2004). Quando formada a angiotensina I, esta é convertida em angiotensina II (um octapeptídeo com ação vasopressora) pela ação da ACE. Embora existam outras vias de formação da angiotensina II em órgãos como o coração, as suas concentrações plasmáticas dependem da atividade enzimática da renina e da ACE. Já os efeitos teciduais da angiotensina II circulante são mediados por meio dos receptores transmembrana acoplados à proteína G, principalmente os subtipos AT1 (Agtr1a e Agtr1b) e AT2. A aldosterona, importante efector do sistema renina-angiotensina envolvido no balanço eletrolítico e regulação da pressão arterial, é sintetizada e secretada pelas glândulas supra-renais em resposta ao receptor Agtr1a, modulados pela angiotensina II (ICHIHARA et al., 2004; KIM; IWAO, 2000).

O controle da pressão arterial envolve diversos mecanismos fisiológicos, entre eles a divisão simpática do sistema nervoso autônomo, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e mediadores derivados do endotélio, como o NO (CORTI et al., 2001). Uma vez que esses mecanismos estão intimamente relacionados, a indução da expressão dos genes *Ace*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b* e *Ece1* no rim dos ratos SHR pode ter atuado sobre o aumento da pressão arterial sistólica dos animais SHR após tratamento com a dieta deficiente em vitamina D3, como foi observado nesse estudo.

Os genes *Ece1*, *Ednra* e *Alox5*, que codificam a enzima conversora de endotelina, o receptor tipo A da endotelina e o aracdonato 5-lipoxigenase, e estão envolvidos com a resposta à hipóxia e com a vasoconstrição, assim como os genes *Acta2*, *Cacna1c* e *P2rx4*, que codificam a alfa-actina da musculatura lisa, a subunidade alfa 1c do canal de cálcio voltagem-dependente tipo L e o receptor purinérgico P2x, e estão envolvidos com a regulação da pressão arterial e a contração da musculatura lisa, e os genes *Scnn1g*, *Slc7a1* e *Kcnma1*, que codificam canal de sódio não voltagem-dependente subunidade 1 gama, o carreador de soluto da família 7, membro 1, e o canal de potássio de grande condutância ativado por cálcio, subfamília M, membro alfa 1, envolvidos com o transporte de íons e respostas moduladas por íons, também tiveram sua expressão renal aumentada nos animais SHR após o consumo de dieta deficiente em vitamina D3.

O aumento da expressão do gene que codifica a enzima conversora de endotelina (*Ece1*), uma protease transmembranar que cataliza a fase final do processamento pós-traducional da endotelina (OKADA et al., 1990), e do gene do receptor tipo A da endotelina (*Ednra*), receptor que faz parte da família dos receptores acoplados à proteína G e desempenha um potente papel na vasoconstrição (YASUNO et al., 2011), demonstraram que a deficiência em vitamina D3, no rim dos ratos SHR, participou da modulação de eventos diretamente envolvidos com o aumento da pressão arterial. Isso porque o sistema endotelina, do qual fazem parte as endotelinas 1, 2, 3 e 4, a enzima conversora de endotelina e os receptores tipo A e tipo B, é um importante regulador da função cardiovascular, e quando em desequilíbrio devido à sua hiperativação, pode acarretar em processos fisiopatológicos como a hipertensão pulmonar e a hipertensão arterial.

No rim dos animais SHR, o aumento da expressão do gene *Alox5* pode ter resultado no aumento da expressão da proteína ALOX5, que exerce um papel na síntese de leucotrienos a partir do ácido aracdônico. Os leucotrienos são importantes mediadores de condições inflamatórias e alérgicas, e a inflamação é um evento relacionado com as doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial (RAKONJAC RYGE et al., 2014). A inflamação é reconhecida como um fator significativo na hipertensão arterial, e o sistema renina-angiotensina-aldosterona tem um importante papel nesse processo. Esse sistema é implicado em eventos como a disfunção endotelial, o remodelamento vascular, o estresse oxidativo e a produção de citocinas pró-inflamatórias, e a angiotensina II e a aldosterona estão diretamente associadas a esses eventos (MARCHESI; PARADIS; SCHIFFRIN, 2008). A ativação do gene *Alox5* pela dieta deficiente em vitamina D3 pode ter ocorrido em resposta à modulação positiva dos genes diretamente envolvidos com a via do sistema renina-angiotensina-aldosterona (*Ace*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b* e *Ece1*).

Mutações nos genes *SCNN1G* e *ACTA2*, em humanos, estão envolvidas com a síndrome de Liddle (doença que envolve o desenvolvimento de hipertensão arterial) (BOGDANOVIC et al., 2012), e com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar (MILEWICZ et al., 2010), respectivamente. Esses dois genes (*Scnn1g* e *Acta2*) foram induzidos pela deficiência em vitamina D3 no rim dos ratos SHR, e as possíveis explicações para o aumento das suas expressões estão relacionadas com as respectivas funções intracelulares. O canal de sódio SCNNG1 exerce uma importante função na homeostase da pressão arterial, controlando a reabsorção de

sódio no rim (LIU et al., 2015), e o aumento da reabsorção de sódio é um evento relacionado com a elevação da pressão arterial. A ACTA2 exerce um importante papel na motilidade, estrutura e integridade celular, sendo uma das maiores constituintes do aparato contrátil (HOFFJAN et al., 2011), com participação na contração da musculatura lisa e consequentemente, na regulação da pressão arterial.

Os canais de cálcio voltagem-dependente, como o CACNA1C, controlam o influxo de cálcio no interior das células e exercem um papel importante na contração da musculatura lisa e ativação de canais de íons dependentes de cálcio (WANG et al., 2006). Indivíduos com hipertensão arterial apresentam um aumento na expressão do gene *CACNA1C* (WENZEL et al., 2008). No presente estudo, a deficiência em vitamina D3 foi capaz de aumentar a expressão do gene *Cacna1c* em relação aos animais controle SHR, já hipertensos. O gene *Kcnma*, que codifica o canal de potássio de grande condutância ativado por cálcio (KCNMA1), é de fundamental importância no controle do tônus da musculatura lisa, e atua na regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SAUSBIER et al., 2005; TOMAS et al., 2008). Esses resultados sugerem que a vitamina D3, em deficiência, atua sobre o canal de cálcio CACNA1C não apenas pela via não genômica, que envolve a rápida abertura desses canais por meio da sinalização do VDR na membrana plasmática, mas também pela via genômica, por meio da modulação da expressão do gene *Cacna1c*. O aumento da expressão do gene *Kcnma1* pode ter ocorrido em resposta ao aumento das concentrações de CACNA1C, uma vez que esse canal de cálcio ativa outros canais iônicos dependentes de cálcio, como o KCNMA1.

Outros estudos já demonstraram que o aumento da expressão do gene *P2rx4* está relacionado à progressão da isquemia cerebral (CAVALIERE et al., 2003) e envolvido com o influxo de cálcio induzido por ATP, atuando no aumento da pressão arterial em células endoteliais vasculares humanas (KIM et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2006). O aumento da expressão do gene *P2rx4*, induzido pela deficiência em vitamina D3, provavelmente contribuiu para o desequilíbrio da pressão arterial nos ratos SHR, como observado no presente estudo.

O gene *Slc7a1* codifica um carreador de aminoácidos catiônicos para a entrada de arginina e lisina nas células de mamíferos (MAATTA; KUNNAS; NIKKARI, 2013; YANG et al., 2007). O aumento da expressão do gene *Slc7a1* nos

animais SHR, após consumo de dieta deficiente em vitamina D3, pode estar relacionado ao aumento das concentrações renais de arginina, substância vasodilatadora da musculatura da parede vascular, e que atua como precursora de NO. Como a formação de NO é reduzida em indivíduos com hipertensão arterial (YANG; KAYE, 2006), o aumento da expressão do gene *Slc7a1* pode ter ocorrido com a função de manutenção da homeostase renal nos SHR, como resposta de retroalimentação negativa em relação à expressão de genes envolvidos com a elevação da pressão arterial.

Como resumo da regulação da expressão gênica no rim dos animais SHR alimentados com a dieta deficiente em vitamina D3, foi observada a indução da expressão de treze genes, sendo cinco genes diretamente envolvidos com a via renina-angiotensina-aldosterona, e os demais genes componentes das vias de vasoconstrição, tônus vascular, contração da musculatura lisa, regulação da pressão arterial, resposta à hipóxia e transporte de íons. Em doze genes induzidos pela deficiência em vitamina D3 (*Ace*, *Acta2*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Alox5*, *Ece1*, *Ednra*, *Kcnma1*, *P2rx4* e *Scnn1g*), foi possível estabelecer uma relação entre o aumento de suas expressões e o desequilíbrio da pressão arterial, favorecendo um agravamento da condição de hipertensão arterial. Já o aumento da expressão do gene *Slc7a1* mostrou-se envolvido com um processo que poderia culminar com a redução da pressão arterial e manutenção da homeostase renal.

5.2.2. No coração

5.2.2.1. Dieta suplementada com vitamina D3

No coração, a dieta suplementada com vitamina D3 modulou a expressão de 5 genes nos ratos SHR e 10 genes nos ratos WKY. O gene *Ace*, que codifica a enzima conversora de angiotensina I (ACE), foi regulado negativamente nos ratos SHR, e o gene *Ace2*, que codifica a enzima conversora de angiotensina II (ACE2), foi regulado positivamente nos ratos WKY. Assim como a ACE, ACE2 é uma proteína de membrana do tipo 1 com o domínio catalítico na superfície extracelular (DONOGHUE et al., 2000), e sua principal função é degradar a angiotensina II em angiotensina 1-7 (VICKERS et al., 2002). Dessa forma, a ACE2 atua reduzindo a ação vasoconstritora da angiotensina II por meio da sua inativação, assim como

neutralizando a ação da angiotensina II, atuando sobre a formação de angiotensina 1-7, que é conhecida por ter ação vasodilatadora e atividade anti-fibrótica (BURRELL et al., 2013; TALLANT; CLARK, 2003). A diminuição da expressão do gene *Ace* nos ratos SHR, assim como o aumento da expressão do gene *Ace2* nos ratos WKY, caracterizam eventos transcricionais envolvidos com a redução ou manutenção da pressão arterial, uma vez que as duas enzimas possuem ações antagônicas.

No coração dos ratos normotensos WKY, a suplementação com vitamina D3 modulou, além do gene *Ace2*, os genes *Bdkrb2*, *Drd3*, *Drd5*, *Itpr1*, *Itpr2*, *Itpr3*, *Kcnma1*, *Scnn1a* e *Scnn1g*. O gene *Bdkrb2*, que codifica o receptor B2 da bradicinina, foi regulado negativamente pela dieta suplementada com vitamina D3. O receptor B2 da bradicinina está envolvido com muitos processos como contração da musculatura lisa, inflamação, edema, proliferação celular e regulação da pressão arterial (SUCHKOVA et al., 2014). A inibição da expressão do gene *Bdkrb2* pela suplementação com vitamina D3, em modelo normotenso, sugere que concentrações plasmáticas elevadas de vitamina D3 atuam de forma antagônica à processos inflamatórios, estando envolvida com a manutenção da pressão arterial.

Outros genes regulados negativamente pela dieta suplementada com vitamina D3, no coração dos ratos WKY, foram o *Drd3* (-1,62) e o *Drd5* (-4,03), que codificam os receptores de dopamina tipo 3 (DRD3) e tipo 5 (DRD5). Os receptores de dopamina são conhecidos por influenciarem a vasodilatação e alterarem a contratilidade cardíaca no sistema cardiovascular (CONTRERAS et al., 2002; HORN; MURPHY, 1991). No presente estudo, a diminuição da expressão de dois genes com atividade vasodilatadora, em ratos normotensos, pode ter atuado como um mecanismo de controle da homeostase cardíaca, evitando uma condição de hipotensão. Os genes *Itpr1*, *Itpr2*, *Itpr3*, *Scnn1a* e *Scnn1g*, todos envolvidos com a via gênica de transporte de íons, também foram negativamente regulados pela suplementação com vitamina D3 no coração dos ratos WKY.

Os genes *Itpr1*, *Itpr2* e *Itpr3*, que codificam os receptores intracelulares para o inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1, tipo 2 e tipo 3, respectivamente, são canais de cálcio modulados pelo inositol 1,4,5-trifosfato em resposta ao fator neuro-humoral mediado pela ativação dos receptores α e β -adrenérgicos. A expressão dos três subtipos de receptores (ITPR1, ITPR2 e ITPR3) é modulada por estímulos fisiológicos e patológicos durante o desenvolvimento e diferenciação celular (FOSKETT et al.,

2007). No coração, o subtipo ITPR2 é a isoforma mais expressa, e o aumento da expressão do seu gene, o *Itpr2*, está relacionado à indução de arritmias em cardiomiócitos de roedores (LIPP et al., 2000; RINNE; BLATTER, 2010). Considerando que a dieta suplementada com vitamina D3 reprimiu a expressão gênica dos três tipos de receptores do inositol 1,4,5-trifosfato no modelo normotenso WKY, esse efeito pode estar relacionado à diminuição do influxo de íons cálcio, e existir a presença de uma relação entre elevadas concentrações de vitamina D3 e o fechamento dos canais de cálcio ITPR1, ITPR2 e ITPR3 nas células cardíacas.

Os genes *Scnn1a* e *Scnn1g*, que codificam o canal de sódio não voltagem-dependente subunidade 1 alfa e o canal de sódio não voltagem-dependente subunidade 1 gama, foram reprimidos pela dieta suplementada com vitamina D3 nos ratos WKY. Os canais de sódio epiteliais, codificado em parte pelo gene *Scnn1a* (a subunidade 1 alfa) e em parte pelo gene *Scnn1g* (subunidade 1 gama), têm a função de transportar sódio entre as células como resposta da sinalização celular indicando suas baixas concentrações, e desempenham relevante papel na homeostase da pressão arterial (SU; MENON, 2001). Um estudo populacional demonstrou que a presença de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) nos genes que codificam os canais SCNN1A e SCNN1G contribuem para alterações na pressão arterial (YANG et al., 2014).

Em resumo, no coração dos ratos WKY, a suplementação com vitamina D3 atuou modulando um grande número de genes envolvidos com o transporte de íons e regulação da pressão arterial. Esses resultados descrevem, pela primeira vez, o papel da suplementação com vitamina D3 no controle da expressão gênica no coração dos ratos WKY, auxiliando na maior compreensão da relação entre vitamina D3 e vias relacionadas com a hipertensão em modelos de normotensão.

No coração dos ratos SHR, a suplementação com vitamina D3, além de atuar inibindo a expressão do gene *Ace*, também diminuiu a expressão dos genes *Avp*, *Ephx2* e *Ren*, e induziu a expressão do gene *Mylk3*. O gene *Avp* codifica a arginina vasopressina (ou vasopressina) e duas outras proteínas associadas, a neurofisina 2 e a copeptina. A arginina vasopressina é responsável por induzir vasoconstrição nos vasos periféricos, atuando sobre o aumento da pressão sanguínea (HUPF et al., 1999). Concentrações plasmáticas elevadas de arginina vasopressina ocorrem em condição de estresse circulatório, como no caso da falência cardíaca (KIM et al., 1990). No presente estudo, a dieta suplementada com vitamina D3 reprimiu a

expressão do gene *Avp* (-5,87 vezes) no modelo de hipertensão SHR, atuando de forma antagônica à vasoconstrição e elevação da pressão sanguínea, evento relacionado à redução da pressão arterial.

O gene *Ephx2*, que codifica a enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH - *soluble epoxide hydrolase*) no coração e em outros órgãos, cataliza a degradação do epóxi lipídio ácido epoxieicosatrienoicos (EETs - *epoxyeicosatrienoic acids*) ao seu derivado dihidroxi-eicosatrienoicos (DHETs - *dihydroxyeicosatrienoic acids*), e tem um papel crucial no controle das concentrações de EETs (ENAYETALLAH et al., 2004; FANG et al., 2004). Como os epóxi lipídios são potentes vasodilatadores que controlam a pressão sanguínea (IMIG et al., 2002; LURIA et al., 2007), e a sEH é responsável pela degradação de EETs e DHETs, a regulação negativa do gene *Ephx2* pela dieta suplementada em vitamina D3 provavelmente contribuiu para a manutenção das concentrações de EETs e DHETs, evento relacionado com a redução da pressão arterial. Outro gene reprimido pela suplementação com vitamina D3 foi o *Ren*, que codifica a pré-pró-renina (que posteriormente é convertida em renina), e participa do eixo renina-angiotensina-aldosterona mediando a vasoconstrição arterial (DOSTAL, 2000). Assim como observado no rim, a dieta suplementada com vitamina D3 reprimiu a expressão do gene *Ren* (-2,72 vezes) no coração dos ratos SHR, atuando sobre a redução da pressão arterial segundo mecanismo proposto por YUAN et al. (2007), e anteriormente detalhado para o rim, onde a 1,25-dihidroxivitamina D3 atua como um modulador negativo do gene da pré-pró-renina.

O gene *Mylk3*, que codifica a quinase de cadeia leve de miosina 3, foi regulado positivamente pela suplementação com vitamina D3 no coração dos ratos SHR. Na literatura, um estudo demonstrou uma associação entre a regulação positiva de *Mylk3*, a remontagem sarcomérica e o aumento da contratilidade em coração com insuficiência cardíaca (SEGUCHI et al., 2007). Nesse estudo, o aumento na expressão do gene *Mylk3* (+1,73) pode estar associado à manutenção da contração muscular no coração não-sadio dos ratos hipertensos.

Em resumo, no coração dos ratos SHR, a dieta suplementada com vitamina D3 atuou sobre a inibição da expressão do gene envolvido com a vasoconstrição (*Avp*), e manutenção da atividade vasodilatadora com a regulação negativa do gene *Ephx2*, além de reprimir a expressão de genes pertencentes à via do sistema renina-angiotensina-aldosterona (*Ace* e *Ren*). De forma semelhante ao tecido renal, no

coração dos SHR, a suplementação com vitamina D3 atuou sobre a regulação da expressão de genes envolvidos com a redução da pressão arterial.

5.2.2.2. Dieta deficiente em vitamina D3

No coração, a dieta deficiente em vitamina D3 regulou positivamente a expressão de nove genes nos ratos SHR e seis genes nos ratos WKY. Como no rim, a deficiência em vitamina D3 aumentou a expressão do gene *Ace* no coração tanto dos ratos SHR quanto dos ratos WKY. O papel da ACE na regulação da função cardiovascular e homeostase eletrolítica é bem estabelecida, e como descrito anteriormente, moléculas inibidoras da ACE são comumente usadas em terapias anti-hipertensivas (CUSHMAN; ONDETTI, 1980; DANILCZYK; PENNINGER, 2006). O excesso de angiotensina II, principal peptídeo ativo da ACE, exerce um papel relevante sobre a isquemia cardíaca (JUNGERT; ROTH; NEUHAUSER-BERTHOLD, 2012; SULISTYONINGRUM et al., 2012), e os resultados do presente estudo mostraram que a deficiência em vitamina D3 induz a expressão do gene que codifica a ACE, no rim e coração dos ratos hipertensos e normotensos. Esses resultados sugerem uma relação entre a deficiência em vitamina D3 e o aumento das concentrações de angiotensina II nos tecidos renal e cardíaco dos ratos SHR e WKY. O aumento da síntese de angiotensina II está relacionado com a elevação da pressão arterial, produção de ERO e indução de lesão tecidual.

O gene *Cacna1c*, que codifica a subunidade alfa 1c do canal de cálcio voltagem-dependente tipo L, um subtipo de canal de cálcio voltagem-dependente (CACNA1C), também foi positivamente regulado tanto nos ratos WKY (+1,81) quanto nos ratos SHR (+2,39). Nos cardiomiócitos, os íons cálcio exercem um importante papel ao se ligarem diretamente com as proteínas sarcoméricas, iniciando o processo de contração muscular (BERS, 2002; CORTES et al., 2012; MOLINA-NAVARRO et al., 2013), e os canais de cálcio são os responsáveis por mediar o influxo de íons cálcio para as células, sugerindo que a deficiência em vitamina D3 atuou sobre a indução da contração da musculatura cardíaca nos animais hipertensos SHR e normotensos WKY.

No coração dos animais WKY, a dieta deficiente induziu a expressão dos genes *Ednra*, *Ephx2*, *Itpr1* e *Itpr2*. O gene *Ednra*, que codifica o receptor tipo A da endotelina, e o gene *Ephx2*, que codifica a enzima sEH, foram positivamente

induzidos pela deficiência em vitamina D3. A indução da expressão do gene *Ednra*, no coração, induz vasoconstrição, e a ativação do receptor EDNRA está associada com a hipertrofia cardíaca e contração da musculatura lisa via mecanismos dependentes de cálcio (BARTON; YANAGISAWA, 2008; ZHANG et al., 2013). O gene *Ephx2* atua na degradação de epóxi lipídeos com ação vasodilatadora (IMIG et al., 2002; LURIA et al., 2007), de forma que a indução do gene *Ephx2*, no coração dos WKY, se relaciona com uma ação antagônica à vasodilatação nos WKY.

De forma contrária à observada para a suplementação com vitamina D3, no rim dos WKY, a dieta deficiente em vitamina D3 aumentou a expressão dos genes *Itpr1* e *Itpr2* que codificam os receptores intracelulares para o inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1 e tipo 2, respectivamente. Como descrito de forma mais detalhada anteriormente e demonstrado por Lipp et al. (2000) e Rinne e Blatter (2010), o aumento da expressão do gene *Itpr2* está envolvido com indução de arritmias em cardiomiócitos de roedores.

Em resumo, no coração dos ratos WKY, a deficiência em vitamina D3 regulou positivamente genes que poderiam culminar com eventos relacionados à elevação da pressão arterial, apesar desse efeito não ter sido observado fisiologicamente nesse estudo, uma vez que a aferição da pressão arterial sistólica não se alterou significativamente ao longo do período experimental. O coração se mostrou mais sensível do que o rim em relação à modulação da expressão gênica no modelo de normotensão WKY.

No coração dos ratos SHR, além da indução dos genes *Ace* e *Cacna1c*, a deficiência em vitamina D3 regulou positivamente a expressão dos genes *Agtr1b*, *Drd5*, *Mylk2*, *Nostrin*, *Scnn1a*, *Scnn1g* e *Sphk1*. O *Agtr1b*, gene que codifica o receptor tipo B da angiotensina II (AT1b), e faz parte do eixo renina-angiotensina-aldosterona, aumentou sua expressão em 7,16 vezes. Estudos demonstraram que o receptor AT1b media a contração induzida pela angiotensina II (CHEN et al., 1997; ZHOU et al., 2003) e atua sobre os vasos de resistência mesentéricos (ZHOU et al., 2005), exercendo importante função na regulação da função vascular. O gene *Agtr1b* foi induzido pela dieta deficiente em vitamina D3 no rim e coração, evidenciando o papel da deficiência em vitamina D3 sobre eventos que poderiam culminar com a elevação da pressão arterial.

Os genes *Scnn1a* (canal de sódio não voltagem-dependente subunidade 1 alfa) e *Scnn1g* (canal de sódio não voltagem-dependente subunidade 1 gama), que

codificam subunidades de canais de sódio epiteliais e transportam sódio entre as células, foram positivamente regulados pela dieta deficiente em vitamina D3 no coração dos ratos SHR. No rim dos SHR, a deficiência em vitamina D3 também induziu a expressão do gene *Scnn1g*, e um estudo mostrou uma forte relação entre o aumento dos níveis de RNAm de *Scnn1a* e *Scnn1g* e o aumento da pressão sistólica e diastólica em ratos (HALOUI et al., 2013), evidenciando a ação de baixas concentrações plasmáticas de vitamina D3 sobre a elevação da pressão arterial.

O gene *Sphk1* codifica a esfingosina cinase tipo 1, uma cinase que fosforila a esfingosina em 1-fosfato esfingosina. Na hipertensão, está envolvido com o tônus vascular e com efeitos vasoconstritores (HEMMINGS, 2006), e a dieta deficiente em vitamina D3 atuou sobre a sua indução, sugerindo um efeito vasoconstritor da deficiência em vitamina D3 sobre o coração dos SHR.

O gene *Drd5*, que codifica o receptor de dopamina tipo 5 (DRD5), foi positivamente regulado pela dieta deficiente no coração dos SHR. Estudos têm demonstrado o envolvimento dos receptores de dopamina com a vasodilatação das artérias coronarianas (CONTRERAS et al., 2002; HORN; MURPHY, 1991), sendo esse efeito atribuído à ativação dos canais de potássio (NATARAJAN et al., 2010), de forma que o aumento da expressão do gene *Drd5* (+9,30) foi de encontro com os outros resultados da expressão gênica, e pode estar envolvido com uma atividade compensatória no coração dos ratos hipertensos SHR e com a manutenção da homeostase.

O gene *Mylk2*, que codifica a quinase de cadeia leve de miosina 2, foi regulado positivamente pela deficiência em vitamina D3. Esse gene é expresso predominantemente em fibras musculares esqueléticas (ZHI et al., 2005), atua sobre a sinalização do citoesqueleto (MUTRYN et al., 2015), e mutações no gene *MYLK2* têm sido associadas a cardiomiopatia hipertrófica médio-ventricular (DAVIS et al., 2001). O gene *Nostrin* (*Nitric Oxide Synthase Trafficking*) codifica a proteína NOSTRIN, que tem a função de se ligar à proteína responsável pela produção de NO, a endotelial óxido nítrico sintetase (eNOS - endothelial NO synthase), e atenuar a produção de NO dependente da eNOS (ZIMMERMANN et al., 2002). Nostrin está presente em células endoteliais primárias e no endotélio de vasos do coração (THURINGER; MAULON; FRELIN, 2002), e o aumento de sua expressão (como observado no coração dos ratos SHR) está relacionado com a redução da produção

de NO (que possui ação vasodilatadora), atuando sobre o aumento da pressão arterial.

Em resumo, no coração dos ratos SHR, a dieta deficiente em vitamina D3 modulou a expressão de oito genes relacionados com o aumento da pressão arterial, com excessão do gene *Drd5*, associado a uma ação vasodilatadora. Provavelmente, a regulação positiva do *Drd5* ocorreu como um mecanismo de *feedback* negativo, associado à manutenção da homeostase cardíaca. No presente estudo, a pressão arterial sistólica dos ratos SHR aumentou de forma significativa apenas na última semana após tratamento com a dieta deficiente em vitamina D3. Entretanto, os animais permaneceram hipertensos ao longo de todo o período experimental, atingindo pressões arteriais sistólicas próximas ao limiar máximo de detecção obtido pelos ratos SHR em outros estudos de intervenção dietética (JAHANDIDEH et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). Os resultados de expressão gênica no coração dos ratos SHR, associado ao aumento da pressão arterial sistólica na décima segunda semana de tratamento, sugerem que períodos mais longos de deficiência em vitamina D3 podem resultar em outras alterações fisiológicas, genéticas e metabólicas em modelos hipertensos.

5.3. Considerações finais

Os resultados obtidos nesse estudo, no modelo hipertenso de ratos SHR, sugerem uma relação entre a suplementação com a vitamina D3 e a redução da pressão arterial, por meio da regulação da expressão de genes envolvidos com a via gênica do sistema renina-angiotensina-aldosterona e, a nível fisiológico, com a redução da pressão arterial sistólica. A suplementação com vitamina D3 mostrou estar envolvida com a manutenção da estabilidade cromossômica, dos danos ao DNA e produção de ERO, além de não demonstrar efeito sobre a peroxidação lipídica nas membranas celulares e fibrose renal. A deficiência em vitamina D3 está associada à elevação da pressão arterial sistólica, aumento da produção de ERO e da peroxidação lipídica nas membranas celulares; à indução de danos ao DNA, instabilidade cromossômica e fibrose renal, e à regulação da expressão de genes envolvidos com as vias do sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasoconstrição, tônus vascular, contração da musculatura lisa, resposta à hipóxia e transporte de íons no rim e coração.

No modelo normotenso WKY, o efeito da suplementação com vitamina D3 foi observado na repressão do gene que codifica a renina no rim, e na regulação da expressão de genes envolvidos com as vias de transporte de íons e do sistema renina-angiotensina-aldosterona no coração. A deficiência em vitamina D3 foi capaz de induzir danos ao DNA nas células sanguíneas e aumento do percentual de fibrose renal, além de regular a expressão de genes pertencentes às vias do sistema renina-angiotensina-aldosterona, transporte de íons e regulação da pressão arterial no rim e coração.

No presente estudo, a vitamina D3 exerceu um papel relevante na biologia molecular e fisiologia da hipertensão, atuando de forma semelhante a um anti-hipertensivo em suplementação, e agravando os efeitos da hipertensão na deficiência. O aumento dos danos ao DNA e da fibrose no rim dos ratos WKY, assim como a modulação da expressão de genes pertencentes à via do sistema renina-angiotensina-aldosterona no rim e coração, mostraram que a deficiência em vitamina D3 induziu um efeito negativo nos animais normotensos WKY, sugerindo que longos períodos de deficiência poderiam culminar com o desenvolvimento da hipertensão e com o aumento da frequência de danos aos cromossomos dos animais normotensos.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, nas condições empregadas nesse estudo, podemos concluir que:

- A suplementação ou a deficiência em vitamina D3 não alteraram o ganho de massa corpórea, o consumo de dieta e a massa relativa do rim e coração dos ratos SHR e WKY;
- Nos ratos SHR e WKY, a suplementação com vitamina D3 resultou em altas concentrações plasmáticas de 25-hidroxivitamina D3, e a deficiência em vitamina D3 em baixas concentrações plasmáticas de 25-hidroxivitamina D3;
- Nos ratos SHR, a suplementação com vitamina D3 reduziu a pressão arterial sistólica a partir da terceira semana de tratamento, e a deficiência em vitamina D3 aumentou a pressão arterial sistólica na décima segunda semana de tratamento;
- A deficiência em vitamina D3 induziu danos ao DNA no sangue periférico dos ratos SHR e WKY;
- Nos ratos SHR, a deficiência em vitamina D3 levou a um aumento da frequência de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea e do sangue periférico;
- Nos ratos SHR, a deficiência em vitamina D3 aumentou a produção de ERO nos neutrófilos do sangue periférico;
- Nos ratos SHR, a deficiência em vitamina D3 aumentou a peroxidação lipídica no rim e coração;
- Nos ratos SHR e WKY, a deficiência em vitamina D3 aumentou o percentual de fibrose no rim;

- A suplementação com vitamina D3 regulou a expressão de quatro genes relacionados com a hipertensão arterial no rim dos ratos SHR (*Ace*, *Edn1*, *Ren* e *Agt*) e 1 gene no rim dos ratos WKY (*Ren*);
- A deficiência em vitamina D3 regulou a expressão de treze genes relacionados com a hipertensão arterial no rim dos animais SHR (*Ace*, *Acta2*, *Agt*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Alox5*, *Cacna1c*, *Ece1*, *Ednra*, *Kcnma1*, *P2rx4*, *Scnn1g* e *Slc7a1*) e três genes no rim dos animais WKY (*Ace*, *Cps1*, *Arg2*);
- A suplementação com vitamina D3 regulou a expressão de cinco genes relacionados com a hipertensão arterial no coração dos ratos SHR (*Ace*, *Avp*, *Ephx2*, *Mylk3* e *Ren*) e dez genes no coração dos ratos WKY (*Ace2*, *Bdkrb2*, *Drd3*, *Drd5*, *Itpr1*, *Itpr2*, *Itpr3*, *Ptgs1*, *Scnn1a* e *Scnn1g*);
- A deficiência em vitamina D3 regulou a expressão de nove genes relacionados com a hipertensão arterial no coração dos animais SHR (*Ace*, *Agtr1b*, *Cacna1c*, *Drd5*, *Mylk2*, *Nostrin*, *Scnn1a*, *Scnn1g* e *Sphk1*) e seis genes no coração dos animais WKY (*Ace*, *Cacna1c*, *Ednra*, *Ephx2*, *Itpr1* e *Itpr2*).

Referências

7. REFERÊNCIAS

AFMAN, L.; MULLER, M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. **Journal of the American Dietetic Association**, New York, v. 106, n. 4, p. 569-576, 2006.

AL MHEID, I., et al. Vitamin D and cardiovascular disease: is the evidence solid? **European Heart Journal**, Oxford, v. 34, n. 48, p. 3691-3698, 2013.

ALMEIDA, M. R., et al. Genotoxic studies in hypertensive and normotensive rats treated with amiodarone. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 657, n. 2, p. 155-159, 2008.

ALVES, C. M., et al. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**, Amsterdam, v. 60, n. 2-3, p. 601-608, 2003.

ARDESIA, M.; FERLAZZO, G.; FRIES, W. Vitamin d and inflammatory bowel disease. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 470805, 2015.

ARGACHA, J. F., et al. Vitamin D deficiency-induced hypertension is associated with vascular oxidative stress and altered heart gene expression. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, v. 58, n. 1, p. 65-71, 2011.

ARMAS, L. A.; HOLLIS, B. W.; HEANEY, R. P. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 89, n. 11, p. 5387-5391, 2004.

AYPAK, C.; TUREDI, O.; YUCE, A. The association of vitamin D status with cardiometabolic risk factors, obesity and puberty in children. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, 2013.

BABIOR, B. M. The respiratory burst oxidase. **Basic Life Sciences**, New York, v. 49, p. 815-821, 1988.

BAILEY, R. L., et al. Estimation of total usual calcium and vitamin D intakes in the United States. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 140, n. 4, p. 817-822, 2010.

BAKRIS, G., et al. Review of blood pressure control rates and outcomes. **Journal of the American Society of Hypertension : JASH**, New York, 2013.

BALUCHAMY, S., et al. Differential oxidative stress gene expression profile in mouse brain after proton exposure. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, Berlin, v. 46, n. 8, p. 718-725, 2010.

BANAKAR, M. C., et al. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 prevents DNA damage and restores antioxidant enzymes in rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 10, n. 9, p. 1268-1275, 2004.

BANDEIRA, F., et al. Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 2, p. 227-232, 2010.

BARTON, M.; YANAGISAWA, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 86, n. 8, p. 485-498, 2008.

BELL, D., et al. Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. **Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, New York, v. 13, n. 2, p. 71-78, 2004.

BENN, B. S., et al. Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 149, n. 6, p. 3196-3205, 2008.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, London, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002.

BIKLE, D. D. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 92, n. 3, p. 436-444, 2004.

BOGDANOVIC, R., et al. Liddle syndrome in a Serbian family and literature review of underlying mutations. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 171, n. 3, p. 471-478, 2012.

BORGES, A. C., et al. Effect of cholecalciferol treatment on the relaxant responses of spontaneously hypertensive rat arteries to acetylcholine. **Hypertension**, Hagerstown, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 897-901, 1999.

BORGES, A. C., et al. Cholecalciferol treatment restores the relaxant responses of spontaneously hypertensive rat arteries to bradykinin. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology/ISP**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 263-268, 2002.

BOUILLON, R.; BISCHOFF-FERRARI, H.; WILLETT, W. Vitamin D and health: perspectives from mice and man. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 23, n. 7, p. 974-979, 2008.

BREYSSE, C.; GUILLOT, P.; BERRUT, G. [Study of vitamin D supplementation in people over 65 years in primary care]. **Gériatrie et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil**, Montrouge, v. 13, n. 2, p. 123-132, 2015.

BROWN, A. J.; DUSSO, A.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 277, n. 2 Pt 2, p. F157-175, 1999.

BULL, C.; FENECH, M. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or 'nutriomes' for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. **The Proceedings of the Nutrition Society**, Wallingford, v. 67, n. 2, p. 146-156, 2008.

BURRELL, L. M., et al. The ACE2 gene: its potential as a functional candidate for cardiovascular disease. **Clinical Science**, London, v. 124, n. 2, p. 65-76, 2013.

BUSTIN, S. A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUTLER, M. G. Genetics of hypertension. Current status. **The Lebanese Medical Journal**, Hazmieh, v. 58, n. 3, p. 175-178, 2010.

CADE, C.; NORMAN, A. W. Vitamin D3 improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin D-deficient rat in vivo. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 119, n. 1, p. 84-90, 1986.

CANTER, J. A., et al. Genetic variation in the mitochondrial enzyme carbamyl-phosphate synthetase I predisposes children to increased pulmonary artery pressure following surgical repair of congenital heart defects: a validated genetic association study. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 204-210, 2007.

CASAS, J. P., et al. Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, London, v. 366, n. 9502, p. 2026-2033, 2005.

CASTRO, L. C. [The vitamin D endocrine system]. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 8, p. 566-575, 2011.

CAVALIERE, F., et al. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. **Neuroscience**, New York, v. 120, n. 1, p. 85-98, 2003.

CHATTERJEE, M. Vitamin D and genomic stability. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 475, n. 1-2, p. 69-88, 2001.

CHATTERJEE, M., et al. Augmented nitric oxide generation in neutrophils: oxidative and pro-inflammatory implications in hypertension. **Free Radical Research**, London, v. 43, n. 12, p. 1195-1204, 2009.

CHEN, X., et al. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 272, n. 3 Pt 2, p. F299-304, 1997.

CHOPRA, S.; CHERIAN, D.; JACOB, J. J. The thyroid hormone, parathyroid hormone and vitamin D associated hypertension. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, Mumbai, v. 15 Suppl 4, p. S354-360, 2011.

COLLETT, J. A., et al. Renal angiotensin II type 1 receptor expression and associated hypertension in rats with minimal SHR nuclear genome. **Physiological Reports**, Malden, v. 1, n. 5, p. e00104, 2013.

CONTRERAS, F., et al. Dopamine, hypertension and obesity. **Journal of Human Hypertension**, London, v. 16 Suppl 1, p. S13-17, 2002.

CORTES, R., et al. Differences in MEF2 and NFAT transcriptional pathways according to human heart failure aetiology. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e30915, 2012.

CORTI, R., et al. Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease? **Circulation**, Dallas, v. 104, n. 15, p. 1856-1862, 2001.

COWLEY, A. W., JR. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Review Genetics**, London, v. 7, n. 11, p. 829-840, 2006.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. **Biochemistry & Pharmacology**, Los Angeles, v. 29, n. 13, p. 1871-1877, 1980.

DANILCZYK, U.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. **Circulation Research**, Baltimore, v. 98, n. 4, p. 463-471, 2006.

DANSER, A. H. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 35, n. 6, p. 759-768, 2003.

DARNTON-HILL, I.; NISHIDA, C.; JAMES, W. P. A life course approach to diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **Public Health Nutrition**, Oxford, v. 7, n. 1A, p. 101-121, 2004.

DAVIS, C. D.; MILNER, J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 551, n. 1-2, p. 51-64, 2004.

DAVIS, J. S., et al. The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. **Cell**, Cambridge, v. 107, n. 5, p. 631-641, 2001.

DELLES, C.; MILLER, W. H.; DOMINICZAK, A. F. Targeting reactive oxygen species in hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 10, n. 6, p. 1061-1077, 2008.

DOMINGUES-FARIA, C., et al. Vitamin D deficiency down-regulates Notch pathway contributing to skeletal muscle atrophy in old wistar rats. **Nutrition & Metabolism**, London, v. 11, n. 1, p. 47, 2014.

DONOGHUE, M., et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, Baltimore, v. 87, n. 5, p. E1-9, 2000.

DORIS, P. A. Genetic susceptibility to hypertensive renal disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 69, n. 22, p. 3751-3763, 2012.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of Biosciences**, New Delhi, v. 36, n. 4, p. 731-737, 2011.

DOSTAL, D. E. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 91, n. 1-3, p. 1-11, 2000.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 421-431, 1990.

DRECHSLER, C., et al. Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. **European Heart Journal**, London, v. 31, n. 18, p. 2253-2261, 2010.

EL-BENNA, J., et al. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Basel, v. 53, n. 3, p. 199-206, 2005.

ENAYETALLAH, A. E., et al. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 52, n. 4, p. 447-454, 2004.

EYLES, D. W., et al. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 21-30, 2005.

FANG, X., et al. Effect of soluble epoxide hydrolase inhibition on epoxyeicosatrienoic acid metabolism in human blood vessels. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 287, n. 6, p. H2412-2420, 2004.

FENECH, M. Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 109-122, 2003.

FENECH, M., et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, Basel, v. 4, n. 2, p. 69-89, 2011.

FERON, F., et al. Developmental Vitamin D3 deficiency alters the adult rat brain. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 65, n. 2, p. 141-148, 2005.

FORD, J. A., et al. Cardiovascular disease and vitamin D supplementation: trial analysis, systematic review, and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 100, n. 3, p. 746-755, 2014.

FORMAN, J. P., et al. Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks. **Hypertension**, Hagerstown, v. 61, n. 4, p. 779-785, 2013.

FORTUNO, A., et al. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. **Journal of Hypertension**, London, v. 22, n. 11, p. 2169-2175, 2004.

FOSKETT, J. K., et al. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, n. 2, p. 593-658, 2007.

FUKASAWA, T., et al. Short-chain fructooligosaccharide regulates hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha and farnesoid X receptor target gene expression in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 11, p. 7007-7012, 2010.

GALLAGHER, P. E., et al. Estrogen Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme mRNA. **Hypertension**, Hagerstown, v. 33, n. 1, p. 323-328, 1999.

GOHLKE, J. M., et al. Genetic and environmental pathways to complex diseases. **BMC Systems Biology**, London, v. 3, p. 46, 2009.

GONCALVES, J. G., et al. Vitamin D deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e107228, 2014.

GONZALEZ-REIMERS, E., et al. Alcoholic myopathy: vitamin D deficiency is related to muscle fibre atrophy in a murine model. **Alcohol and Alcoholism: International Journal of the Medical Council on Alcoholis**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 223-230, 2010.

GOOSSENS, G. H., et al. Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation. **Hypertension**, Hagerstown, v. 49, n. 3, p. 542-547, 2007.

GOULDSBOROUGH, I.; LINDOP, G. B.; ASHTON, N. Renal renin-angiotensin system activity in naturally reared and cross-fostered spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 864-869, 2003.

GUIMARÃES, R.M., et al. Diferenças regionais na transição da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil, 1980 a 2012. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v.2, p. 83-89, 2015. No prelo.

GRIFFIN, K. A. Hypertension and kidney damage. **The Journal of Clinical Hypertension**, Greenwich, v. 8, n. 3, p. 209-214, 2006.

GROBER, U., et al. Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. **Dermato-Endocrinology**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 331-347, 2013.

HALLER, H., et al. Spotlight on renin: intrarenal renin-angiotensin system--important player of the local milieu. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, London, v. 7, n. 2, p. 122-125, 2006.

HALOUI, M., et al. Increased renal epithelial na channel expression and activity correlate with elevation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, Greenwich, v. 62, n. 4, p. 731-737, 2013.

HANNAH, S. S.; NORMAN, A. W. 1 alpha,25(OH)₂ vitamin D₃-regulated expression of the eukaryotic genome. **Nutrition Reviews**, Oxford, v. 52, n. 11, p. 376-382, 1994.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HARVEY, L. J.; MCARDLE, H. J. Biomarkers of copper status: a brief update. **The British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 99 Suppl 3, p. S10-13, 2008.

HAULICA, I., et al. New bioactive angiotensins formation pathways and functional involvements. **Romanian Journal of Internal Medicine**, Bucuresti, v. 42, n. 1, p. 27-40, 2004.

HAYASHI, M., et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HE, Q., et al. Associations of ACE gene insertion/deletion polymorphism, ACE activity, and ACE mRNA expression with hypertension in a Chinese population. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e75870, 2013.

HEANEY, R. P., et al. Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 96, n. 3, p. E447-452, 2011.

HEMMINGS, D. G. Signal transduction underlying the vascular effects of sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 373, n. 1, p. 18-29, 2006.

HOFFJAN, S., et al. Three novel mutations in the ACTA2 gene in German patients with thoracic aortic aneurysms and dissections. **European Journal of Human Genetics**, London, v. 19, n. 5, p. 520-524, 2011.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, n. 6 Suppl, p. 1678S-1688S, 2004.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 79, n. 3, p. 362-371, 2004.

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

HORN, P. T.; MURPHY, M. B. Dopamine receptor agonists in cardiovascular medicine. **Trends in Cardiovascular Medicine**, New York, v. 1, n. 3, p. 103-107, 1991.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M. F. Optimize dietary intake of vitamin D: an epigenetic perspective. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, London, v. 15, n. 6, p. 567-579, 2012.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Clinic Proceedings**, Oxford, v. 88, n. 7, p. 720-755, 2013.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; SPIRA, A.; HOLICK, M. F. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e58725, 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUPF, H., et al. Evidence for a vasopressin system in the rat heart. **Circulation Research**, Baltimore, v. 84, n. 3, p. 365-370, 1999.

HUYNH, N. N., et al. Arginase II knockout mouse displays a hypertensive phenotype despite a decreased vasoconstrictory profile. **Hypertension**, Hagerstown, v. 54, n. 2, p. 294-301, 2009.

ICHIHARA, A., et al. Renal renin-angiotensin system. **Contributions to Nephrology**, Basel, v. 143, p. 117-130, 2004.

ILIESCU, M. L.; ZANOSCHI, G. [Population aging and public health. The active aging concept]. **Medical-Surgical Journal of the Society of Physicians and Naturalists**, Iasi, v. 109, n. 1, p. 120-123, 2005.

IMIG, J. D., et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. **Hypertension**, Hagerstown, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 690-694, 2002.

JAHANDIDEH, F., et al. Beneficial effects of simulated gastro-intestinal digests of fried egg and its fractions on blood pressure, plasma lipids and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. e115006, 2014.

JOHNSON, R. J., et al. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. **Hypertension**, Hagerstown, v. 19, n. 5, p. 464-474, 1992.

JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 88, n. 2, p. 582S-586S, 2008.

JUDD, S. E.; TANGPRICHA, V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 338, n. 1, p. 40-44, 2009.

JUNGERT, A.; ROTH, H. J.; NEUHAUSER-BERTHOLD, M. Serum 25-hydroxyvitamin D3 and body composition in an elderly cohort from Germany: a cross-sectional study. **Nutrition & Metabolism**, London, v. 9, n. 1, p. 42, 2012.

KANG, J. X. The coming of age of nutrigenetics and nutrigenomics. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, Basel, v. 5, n. 1, p. I-II, 2012.

KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R. L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 16, n. 2, p. 166-177, 2004.

KEENEY, J. T., et al. Dietary vitamin D deficiency in rats from middle to old age leads to elevated tyrosine nitration and proteomics changes in levels of key proteins in brain: implications for low vitamin D-dependent age-related cognitive decline. **Free Radical Biology & Medicine**, Tarrytown, v. 65, p. 324-334, 2013.

KENNEL, K. A.; DRAKE, M. T.; HURLEY, D. L. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. **Mayo Foundation for Medical Education and Research**, Oxford, v. 85, n. 8, p. 752-757; quiz 757-758, 2010.

KERR, S., et al. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. **Hypertension**, Hagerstown, v. 33, n. 6, p. 1353-1358, 1999.

KIM, C. S.; KIM, S. W. Vitamin D and chronic kidney disease. **The Korean Journal of Internal Medicine**, Seoul, v. 29, n. 4, p. 416-427, 2014.

KIM, H. S.; CHUNG, W.; KIM, S. Vitamin d, and kidney disease. **Electrolyte & Blood Pressure**, Seoul, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2011.

KIM, J. K., et al. Arginine vasopressin gene expression in chronic cardiac failure in rats. **Kidney International Supplements**, New York, v. 38, n. 5, p. 818-822, 1990.

KIM, M. J., et al. Exaggerated renal fibrosis in P2X4 receptor-deficient mice following unilateral ureteric obstruction. **Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, Oxford, 2014.

KIM, N. H.; RUBIN, L. J. Endothelin in health and disease: endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary artery hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, Thousand Oaks, v. 7, n. 1, p. 9-19, 2002.

KIM, S.; IWAO, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 52, n. 1, p. 11-34, 2000.

KINCAID-SMITH, P. Clinical diagnosis of hypertensive nephrosclerosis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 2255-2256, 1999.

KLIEWER, S. A., et al. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. **Nature**, London, v. 355, n. 6359, p. 446-449, 1992.

LATADO, A. L., et al. [Predictors of in-hospital lethality in patients with advanced heart failure]. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 87, n. 2, p. 185-192, 2006.

LAVIE, C. J.; LEE, J. H.; MILANI, R. V. Vitamin D and cardiovascular disease will it live up to its hype? **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 58, n. 15, p. 1547-1556, 2011.

LAZZINI, A.; LAZZINI, S. Cardiovascular Disease: An Economical Perspective. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 15, n. 10, p. 1142-1156, 2009.

LEE, H. A., et al. Tissue-specific upregulation of angiotensin-converting enzyme 1 in spontaneously hypertensive rats through histone code modifications. **Hypertension**, Hagerstown, v. 59, n. 3, p. 621-626, 2012.

LEE, H. B., et al. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, Washington, v. 14, n. 8 Suppl 3, p. S241-245, 2003.

LEE, J. H., et al. Vitamin D Deficiency An Important, Common, and Easily Treatable Cardiovascular Risk Factor? **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 52, n. 24, p. 1949-1956, 2008.

LEE, V. M., et al. Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia. **Journal of Hypertension**, London, v. 21, n. 2, p. 395-402, 2003.

LEKGABE, E. D., et al. Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, Hagerstown, v. 46, n. 2, p. 412-418, 2005.

LERMAN, L. O., et al. Animal models of hypertension: An overview. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 146, n. 3, p. 160-173, 2005.

LEVINE, M. A. Normal mineral homeostasis. Interplay of parathyroid hormone and vitamin D. **Endocrine Development**, Basel, v. 6, p. 14-33, 2003.

LI, H., et al. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 280, n. 1, p. E75-82, 2001.

LI, Y. C., et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 110, n. 2, p. 229-238, 2002.

LIPP, P., et al. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. **Current Biology**, Cambridge, v. 10, n. 15, p. 939-942, 2000.

LISS, Y.; FRISHMAN, W. H. Vitamin D: a cardioprotective agent? **Cardiology in Review**, Hagerstown, v. 20, n. 1, p. 38-44, 2012.

LIU, F., et al. Associations of epithelial sodium channel genes with blood pressure: the GenSalt study. **Journal of Human Hypertension**, London, v. 29, n. 4, p. 224-228, 2015.

LURIA, A., et al. Compensatory mechanism for homeostatic blood pressure regulation in Ephx2 gene-disrupted mice. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 5, p. 2891-2898, 2007.

MAATTA, K.; KUNNAS, T.; NIKKARI, S. T. Contribution of SLC7A1 genetic variant to hypertension, the TAMRISK study. **BMC Medical Genetics**, London, v. 14, n. 1, p. 69, 2013.

MACHADO, B. H.; MAUAD, H.; GLASS, M. L. Transient changes in blood pressure during spontaneous deep breaths in rats with sinoaortic deafferentation. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 72, n. 3, p. 920-924, 1992.

MANCIA, G., et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**, Oxford, v. 34, n. 28, p. 2159-2219, 2013.

MANSEGO, M. L., et al. Techniques of DNA methylation analysis with nutritional applications. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, Basel, v. 6, n. 2, p. 83-96, 2013.

MANUCHA, W.; RITCHIE, B.; FERDER, L. Hypertension and insulin resistance: implications of mitochondrial dysfunction. **Current Hypertension Reports**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 504, 2015.

MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 367-374, 2008.

MATCHAR, D. B., et al. Systematic review: comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers for treating essential hypertension. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 148, n. 1, p. 16-29, 2008.

MATHERS, J. C. Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. **The British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 88 Suppl 3, p. S273-279, 2002.

MATSUSAKA, T., et al. Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, Washington, v. 23, n. 7, p. 1181-1189, 2012.

MATYJASZEK-MATUSZEK, B.; LENART-LIPINSKA, M.; WOZNIAKOWSKA, E. Clinical implications of vitamin D deficiency. **Menopause Review**, Poznań, v. 14, n. 2, p. 75-81, 2015.

MAWER, E. B., et al. The metabolism of isotopically labelled vitamin D3 in man: the influence of the state of vitamin D nutrition. **Clinical Science**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 39-53, 1971.

MCGRANE, M. M. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 18, n. 8, p. 497-508, 2007.

MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. **Cell**, Cambridge, v. 108, n. 4, p. 465-474, 2002.

MEERZA, D.; NASEEM, I.; AHMED, J. Effect of 1, 25(OH)(2) vitamin D(3) on glucose homeostasis and DNA damage in type 2 diabetic mice. **Journal of Diabetes and its Complications**, New York, v. 26, n. 5, p. 363-368, 2012.

MEZZANO, S. A.; RUIZ-ORTEGA, M.; EGIDO, J. Angiotensin II and renal fibrosis. **Hypertension**, Hagerstown, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 635-638, 2001.

MILEWICZ, D. M., et al. De novo ACTA2 mutation causes a novel syndrome of multisystemic smooth muscle dysfunction. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 152A, n. 10, p. 2437-2443, 2010.

MIN, B. Effects of vitamin d on blood pressure and endothelial function. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, Seoul, v. 17, n. 5, p. 385-392, 2013.

MITRI, J.; PITTAS, A. G. Vitamin D and Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p. 205-232, 2014.

MOK, C. C., et al. Vitamin D deficiency as marker for disease activity and damage in systemic lupus erythematosus: a comparison with anti-dsDNA and anti-C1q. **Lupus**, London, v. 21, n. 1, p. 36-42, 2012.

MOLINA-NAVARRO, M. M., et al. Differential gene expression of cardiac ion channels in human dilated cardiomyopathy. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e79792, 2013.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. **The Canadian Journal of Cardiology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 288-295, 2012.

MOTIWALA, S. R.; WANG, T. J. Vitamin D and cardiovascular disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, London, v. 20, n. 4, p. 345-353, 2011.

MULLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 4, p. 315-322, 2003.

MUSCOGIURI, G., et al. Focus on Vitamin D and the Adrenal Gland. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, 2015.

MUTRYN, M. F., et al. Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. **BMC Genomics**, London, v. 16, p. 399, 2015.

NAGPAL, S.; CHANDRARATNA, R. A. Vitamin A and regulation of gene expression. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, London, v. 1, n. 4, p. 341-346, 1998.

NAIR-SHALLIKER, V.; ARMSTRONG, B. K.; FENECH, M. Does vitamin D protect against DNA damage? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 733, n. 1-2, p. 50-57, 2012.

NAIR-SHALLIKER, V.; ARMSTRONG, B. K.; FENECH, M. Does vitamin D protect against DNA damage? **Mutation Research**, Amsterdam, 2012.

NAIR-SHALLIKER, V., et al. Sunlight and vitamin D affect DNA damage, cell division and cell death in human lymphocytes: a cross-sectional study in South Australia. **Mutagenesis**, Swansea, v. 27, n. 5, p. 609-614, 2012.

NAIR, R.; MASEEH, A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, Mumbai, v. 3, n. 2, p. 118-126, 2012.

NAKAGAWA, T., et al. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 3, p. 560-570, 2009.

NATARAJAN, A., et al. The d5 dopamine receptor mediates large-conductance, calcium- and voltage-activated potassium channel activation in human coronary artery smooth muscle cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 332, n. 2, p. 640-649, 2010.

NEEHA, V. S.; KINTH, P. Nutrigenomics research: a review. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 50, n. 3, p. 415-428, 2013.

NORHEIM, F., et al. Molecular nutrition research: the modern way of performing nutritional science. **Nutrients**, Basel, v. 4, n. 12, p. 1898-1944, 2012.

NORMAN, A. W. On becoming a molecular endocrinologist. **Steroids**, New York, v. 66, n. 3-5, p. 129-136, 2001.

NORTON, G. R.; BROOKSBANK, R.; WOODIWISS, A. J. Gene variants of the renin-angiotensin system and hypertension: from a trough of disillusionment to a welcome phase of enlightenment? **Clinical Science**, London, v. 118, n. 8, p. 487-506, 2010.

OKADA, K., et al. Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 171, n. 3, p. 1192-1198, 1990.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, Kyoto, v. 27, p. 282-293, 1963.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 31 Suppl 2, p. S170-180, 2008.

PEARSON, D. L., et al. Neonatal pulmonary hypertension--urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 344, n. 24, p. 1832-1838, 2001.

PENG, X., et al. Protection against cellular stress by 25-hydroxyvitamin D3 in breast epithelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 110, n. 6, p. 1324-1333, 2010.

PETERS, B. S., et al. The influence of breakfast and dairy products on dietary calcium and vitamin D intake in postpubertal adolescents and young adults. **Journal of Human Nutrition and Dietetics: the Official Journal of the British Dietetic Association**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PILZ, S., et al. Vitamin D in Preventive Medicine. **Anticancer Research**, Attiki, v. 35, n. 2, p. 1161-1170, 2015.

PILZ, S., et al. The role of vitamin D deficiency in cardiovascular disease: where do we stand in 2013? **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 87, n. 12, p. 2083-2103, 2013.

PILZ, S., et al. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. **Nature Reviews Cardiology**, London, v. 6, n. 10, p. 621-630, 2009.

POTTER, T. M.; NEUN, B. W.; STERN, S. T. Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 697, p. 181-189, 2011.

PRAVENEC, M., et al. Gene expression profiling in hypertension research: a critical perspective. **Hypertension**, Hagerstown, v. 41, n. 1, p. 3-8, 2003.

PREMAOR, M. O., et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. **Journal of Endocrinological Investigation**, Milano, v. 31, n. 11, p. 991-995, 2008.

RAKONJAC RYGE, M., et al. A mutation interfering with 5-lipoxygenase domain interaction leads to increased enzyme activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 545, p. 179-185, 2014.

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

RAMASAMY, R., et al. Elevated neutrophil respiratory burst activity in essential hypertensive patients. **Cellular Immunology**, Orlando, v. 263, n. 2, p. 230-234, 2010.

REDDY VANGA, S., et al. Role of vitamin D in cardiovascular health. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 106, n. 6, p. 798-805, 2010.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, 1997.

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

REVELLI, A.; MASSOBRIO, M.; TESARIK, J. Nongenomic effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). **Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM**, New York, v. 9, n. 10, p. 419-427, 1998.

RIBEIRO, R. M., et al. Antihypertensive Effect of Syzygium cumini in Spontaneously Hypertensive Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, New York, v. 2014, p. 605452, 2014.

RINNE, A.; BLATTER, L. A. Activation of NFATc1 is directly mediated by IP3 in adult cardiac myocytes. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 299, n. 5, p. H1701-1707, 2010.

RODRIGO, R., et al. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, v. 42, n. 4, p. 453-461, 2003.

RODRIGO, R., et al. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, Toyonaka, v. 30, n. 12, p. 1159-1167, 2007.

ROSEN, C. J., et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 97, n. 4, p. 1146-1152, 2012.

ROSS, A. C. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D. **Public Health Nutrition**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 938-939, 2011.

ROSSKOPF, D., et al. Genetics of arterial hypertension and hypotension. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 374, n. 5-6, p. 429-469, 2007.

ROSTAND, S. G. Vitamin D, blood pressure, and African Americans: toward a unifying hypothesis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, Washington, v. 5, n. 9, p. 1697-1703, 2010.

SACCONE, D.; ASANI, F.; BORNMAN, L. Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. **Gene**, Amsterdam, 2015. In press.

SAGAR, S., et al. Oxygen free radicals in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 111, n. 1-2, p. 103-108, 1992.

SAKAI, K.; SIGMUND, C. D. Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: a focus on the brain. **Current Hypertension Reports**, Philadelphia, v. 7, n. 2, p. 135-140, 2005.

SARKAR, A., et al. Anticlastogenic potential of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in murine lymphoma. **Cancer Letters**, Limerick, v. 150, n. 1, p. 1-13, 2000.

SAUSBIER, M., et al. Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. **Circulation**, Hagerstown, v. 112, n. 1, p. 60-68, 2005.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SCRAGG, R. Seasonality of cardiovascular disease mortality and the possible protective effect of ultra-violet radiation. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 10, n. 4, p. 337-341, 1981.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SEGUCHI, O., et al. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 117, n. 10, p. 2812-2824, 2007.

SHEPHARD, R. M.; DELUCA, H. F. Plasma concentrations of vitamin D3 and its metabolites in the rat as influenced by vitamin D3 or 25-hydroxyvitamin D3 intakes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 202, n. 1, p. 43-53, 1980.

SHIOTA, N.; MIYAZAKI, M.; OKUNISHI, H. Increase of angiotensin converting enzyme gene expression in the hypertensive aorta. **Hypertension**, Hagerstown, v. 20, n. 2, p. 168-174, 1992.

SINGH, N. P., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988. SMITH, S. M., et al. The nutritional status of astronauts is altered after long-term space flight aboard the International Space Station. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 135, n. 3, p. 437-443, 2005.

STORHOFF, J. J., et al. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, n. 7, p. 883-887, 2004.

SU, Y. R.; MENON, A. G. Epithelial sodium channels and hypertension. **Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals**, Bethesda, v. 29, n. 4 Pt 2, p. 553-556, 2001.

SUCHKOVA, I. O., et al. [Length polymorphism of minisatellite repeat B2-VNTR of the bradykinin B2 receptor gene in healthy Russians and in patients with coronary heart disease]. **Molecular Biology**, Moskva, v. 48, n. 5, p. 752-762, 2014.

SUGDEN, J. A., et al. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. **Diabetic Medicine : a Journal of the British Diabetic Association**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 320-325, 2008.

SULISTYONINGRUM, D. C., et al. Ethnic-specific differences in vitamin D status is associated with adiposity. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e43159, 2012.

SUMMAR, M. L., et al. Relationship between carbamoyl-phosphate synthetase genotype and systemic vascular function. **Hypertension**, Hagerstown, v. 43, n. 2, p. 186-191, 2004.

SUN, Y., et al. Elevated serum 1,25(OH)₂-vitamin D₃ level attenuates renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in kl/kl mice. **Scientific Reports**, London, v. 4, p. 6563, 2014.

TALLANT, E. A.; CLARK, M. A. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). **Hypertension**, Hagerstown, v. 42, n. 4, p. 574-579, 2003.

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

THURINGER, D.; MAULON, L.; FRELIN, C. Rapid transactivation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 by the bradykinin B2 receptor contributes to endothelial nitric-oxide synthase activation in cardiac capillary endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 3, p. 2028-2032, 2002.

TIAN, Y., et al. Effects of vitamin D on renal fibrosis in diabetic nephropathy model rats. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madison, v. 7, n. 6, p. 3028-3037, 2014.

TICE, R. R., et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TITENKO-HOLLAND, N., et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, New York, v. 388, n. 1, p. 85-95, 1997.

TOMAS, M., et al. Genetic variation in the KCNMA1 potassium channel alpha subunit as risk factor for severe essential hypertension and myocardial infarction. **Journal of Hypertension**, London, v. 26, n. 11, p. 2147-2153, 2008.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, London, v. 1, n. 1, p. 91-106, 2003.

TOUYZ, R. M.; TABET, F.; SCHIFFRIN, E. L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 860-866, 2003.

VAN BREDA, S. G., et al. The exposome concept in a human nutrigenomics study: evaluating the impact of exposure to a complex mixture of phytochemicals using transcriptomics signatures. **Mutagenesis**, Swansea, 2015.

VAN OMMEN, B.; STIERUM, R. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 5, p. 517-521, 2002.

VANGA, S. R., et al. Role of Vitamin D in Cardiovascular Health. **American Journal of Cardiology**, New York, v. 106, n. 6, p. 798-805, 2010.

VENKATESH, P., et al. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2007.

VIANNA, L.M.; PAIVA A.C.M.; PAIVA T.B. Treatment with vitamin D3 reduces blood pressure of SHR. **Genes and Hypertension**, London, v.218, p.589-91, 1992.

VICKERS, C., et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 17, p. 14838-14843, 2002.

VIETH, R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 842-856, 1999.

VOCKLEY, J. G., et al. Cloning and characterization of the human type II arginase gene. **Genomics**, San Diego, v. 38, n. 2, p. 118-123, 1996.

WALLACE, I. R., et al. Vitamin D and Insulin Resistance. **Clinical Endocrinology**, Oxford, 2015.

WALTER, M. F., et al. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: a longitudinal analysis of the PREVENT study. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 44, n. 10, p. 1996-2002, 2004.

WANG, D., et al. Highly variable mRNA expression and splicing of L-type voltage-dependent calcium channel alpha subunit 1C in human heart tissues. **Pharmacogenetics and Genomics**, Hagerstown, v. 16, n. 10, p. 735-745, 2006.

WANG, T. T., et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. **Molecular Endocrinology**, Chevy Chase, v. 19, n. 11, p. 2685-2695, 2005.

WENZEL, K., et al. Potential relevance of alpha(1)-adrenergic receptor autoantibodies in refractory hypertension. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 11, p. e3742, 2008.

WILCOX, C. S. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. **Current Hypertension Reports**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 160-166, 2002.

WITHAM, M. D.; NADIR, M. A.; STRUTHERS, A. D. Effect of vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hypertension**, Los Angeles, v. 27, n. 10, p. 1948-1954, 2009.

WONG, M. S., et al. Chronic treatment with vitamin D lowers arterial blood pressure and reduces endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Bethesda, v. 299, n. 4, p. H1226-1234, 2010.

YAMAMOTO, K., et al. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. **Nature Medicine**, New York, v. 12, n. 1, p. 133-137, 2006.

YAMORI, Y., et al. Cellular Mechanisms of Cardiovascular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats (Shr) and Their Modification. **Japanese Heart Journal**, Tokyo, v. 25, n. 5, p. 823-826, 1984.

YANG, X., et al. Associations of epithelial sodium channel genes with blood pressure changes and hypertension incidence: the GenSalt study. **American Journal of Hypertension**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 1370-1376, 2014.

YANG, Z.; KAYE, D. M. Endothelial dysfunction and impaired L-arginine transport in hypertension and genetically predisposed normotensive subjects. **Trends in Cardiovascular Medicine**, New York, v. 16, n. 4, p. 118-124, 2006.

YANG, Z., et al. Identification of a novel polymorphism in the 3'UTR of the L-arginine transporter gene SLC7A1: contribution to hypertension and endothelial dysfunction. **Circulation**, Hagerstown, v. 115, n. 10, p. 1269-1274, 2007.

YASUNO, K., et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 49, p. 19707-19712, 2011.

YIN, K.; AGRAWAL, D. K. Vitamin D and inflammatory diseases. **Journal of Inflammation Research**, v. 7, p. 69-87, 2014.

YUAN, W., et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 41, p. 29821-29830, 2007.

ZALBA, G., et al. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, Hagerstown, v. 35, n. 5, p. 1055-1061, 2000.

ZALBA, G., et al. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. **Hypertension**, Hagerstown, v. 38, n. 6, p. 1395-1399, 2001.

ZHANG, Y., et al. Control of endothelin-a receptor expression by progesterone is enhanced by synergy with Gata2. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 27, n. 6, p. 892-908, 2013.

ZHAO, W., et al. Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 28, n. 4, p. 548-554, 2008.

ZHI, G., et al. Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 48, p. 17519-17524, 2005.

ZHOU, Y., et al. AT1b receptor predominantly mediates contractions in major mouse blood vessels. **Circulation Research**, Baltimore, v. 93, n. 11, p. 1089-1094, 2003.

ZHOU, Y., et al. A major role for AT1b receptor in mouse mesenteric resistance vessels and its distribution in heart and neuroendocrine tissues. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 38, n. 4, p. 693-696, 2005.

ZIMMERMANN, K., et al. NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 26, p. 17167-17172, 2002.

ZITTERMANN, A., et al. Vitamin D supplementation, body weight and human serum 25-hydroxyvitamin D response: a systematic review. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, 2013.

ZITTERMANN, A., et al. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 95, n. 1, p. 91-100, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Viabilidade celular (em porcentagem - %) no coração, rim e sangue periférico de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) alimentados com as dietas controle (1.000 UI/kg), suplementada (10.000 UI/kg) ou deficiente (0 UI/kg) em vitamina D3, avaliada pelo método de exclusão por azul de tripan

Grupos		Viabilidade celular (%)	
SHR	Coração	rim	sangue periférico
controle vit D3	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
suplementado vit D3	95,50 ± 1,41	86,50 ± 3,02	99,25 ± 0,46
deficiente vit D3	96,00 ± 1,77	86,25 ± 3,19	99,50 ± 0,53
Grupos		Viabilidade celular (%)	
WKY	Coração	rim	sangue periférico
controle vit D3	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
suplementado vit D3	97,87 ± 0,99	87,25 ± 2,25	99,00 ± 0,53
deficiente vit D3	96,62 ± 1,18	86,75 ± 2,49	99,12 ± 0,35

A viabilidade celular (em %) dos grupos tratados foi calculada em relação aos respectivos grupos controles. Os valores de viabilidade celular no coração, rim e sangue periférico representam a média ± desvio padrão de cada grupo de tratamento (n=6). Vit D3: vitamina D3. *Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle em vitamina D3. ($p>0,05$). ANOVA uma via e pós-teste de Dunnett.

APÊNDICE B

Quantidade de RNA total em amostras do rim de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (Wistar Kyoto-WKY) e razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}

Grupo (SHR)	Qtde RNA (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Controle vit D3			
animal 1	1515,4	2,10	2,14
animal 2	1248,6	2,09	2,12
animal 3	2277,9	2,08	2,15
Suplementado vit D3			
animal1	1472,0	2,10	2,18
animal 2	1523,3	2,09	2,22
animal 3	1858,3	2,10	2,19
Deficiente vit D3			
animal 1	1738,6	2,09	2,18
animal 2	1724,2	2,09	2,06
animal 3	1986,7	2,11	2,18
Grupo (WKY)	Qtde RNA (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Controle vit D3			
animal 1	1982,6	2,13	1,88
animal 2	2195,0	2,12	2,12
animal 3	2282,7	2,09	2,13
Suplementado vit D3			
animal1	1850,8	2,12	2,10
animal 2	2016,0	2,11	2,19
animal 3	1989,5	2,09	2,20
Deficiente vit D3			
animal 1	2866,3	2,12	2,19
animal 2	2436,6	2,11	2,17
animal 3	1616,7	2,09	2,20

Vit D3: vitamina D3. Qtde RNA: quantidade de RNA (ng/ μ L). A_{260}/A_{280} : Razão A_{260}/A_{280} , que mostra possíveis contaminações por DNA e proteína. A_{260}/A_{230} : Razão A_{260}/A_{230} , que mostra possíveis contaminações por sais e compostos orgânicos, como a guanidina ou o fenol. Valores referentes a cada animal.

APÊNDICE C

Quantidade de RNA total em amostras do coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (Wistar Kyoto-WKY) e razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}

Grupo (SHR)	Qtde RNA (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Controle vit D3			
animal 1	527,0	2,11	2,16
animal 2	611,7	2,10	1,87
animal 3	541,0	2,09	1,89
Suplementado vit D3			
animal1	633,2	2,21	1,97
animal 2	662,2	2,12	1,97
animal 3	551,2	2,13	2,11
Deficiente vit D3			
animal 1	504,2	2,10	2,18
animal 2	578,6	2,13	2,13
animal 3	530,3	2,08	2,20
Grupo (WKY)	Qtde RNA (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Controle vit D3			
animal 1	598,7	2,11	1,97
animal 2	695,4	2,12	1,89
animal 3	593,6	2,12	1,88
Suplementado vit D3			
animal1	631,7	2,11	2,06
animal 2	536,1	2,09	2,12
animal 3	620,4	2,12	2,09
Deficiente vit D3			
animal 1	624,3	2,11	2,07
animal 2	521,7	2,08	2,14
animal 3	684,8	2,07	1,98

Vit D3: vitamina D3. Qtde RNA: quantidade de RNA (ng/ μ L). A_{260}/A_{280} : Razão A_{260}/A_{280} , que mostra possíveis contaminações por DNA e proteína. A_{260}/A_{230} : Razão A_{260}/A_{230} , que mostra possíveis contaminações por sais e compostos orgânicos, como a guanidina ou o fenol. Valores referentes a cada animal.

APÊNDICE D

Migração eletroforética do RNA total no rim de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (Wistar Kyoto – WKY) em gel de agarose a 1%. Avaliação da integridade do RNA total pela observação das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S (RNAr 28S) e ao RNA ribossômico 18S (RNAr 18S). C1, C2, C3: animais 1, 2 e 3 alimentados com dieta controle em vitamina D3 (1.000 UI/kg). S1, S2, S3: animais 1, 2 e 3 alimentados com dieta suplementada com vitamina D3 (10.000 UI/kg). D1, D2, D3: animais 1, 2 e 3 alimentados com dieta deficiente em vitamina D3 (0 UI/kg).

APÊNDICE E

Migração eletroforética do RNA total no coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos (Wistar Kyoto – WKY) em gel de agarose a 1%. Avaliação da integridade do RNA total pela observação das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S (RNAr 28S) e ao RNA ribossômico 18S (RNAr 18S). C1, C2, C3: animais 1, 2 e 3 alimentados com dieta controle em vitamina D3 (1.000 UI/kg). S1, S2, S3: animais 1, 2 e 3 alimentados com dieta suplementada com vitamina D3 (10.000 UI/kg). D1, D2, D3: animais 1, 2 e 3 alimentados com dieta deficiente em vitamina D3 (0 UI/kg).

ANEXOS

ANEXO A

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.344.53.6), intitulado "Avaliação da Instabilidade Genômica, Estresse Oxidativo e Modulação da Expressão Gênica pela Vitamina D em Modelo de Ratos Espontaneamente Hipertensos", de autoria de **Carla da Silva Machado** e de **Lusânia Maria Gregg Antunes**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06.06.2012.

Colaboradores: Maria de Lourde Pires Bianchi;
Regislaine Valéria Burin;
Joana D'Arc Castania Darin;
Vinícius de Paula Venâncio;
Livia Cristina Hernandez

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.344.53.6), entitled: "Avaliação da Instabilidade Genômica, Estresse Oxidativo e Modulação da Expressão Gênica pela Vitamina D em Modelo de Ratos Espontaneamente Hipertensos", by **Carla da Silva Machado** and **Lusânia Maria Gregg Antunes**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June, 6 2012.

Ribeirão Preto, 15 de junho de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretaria da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO B

Artigo publicado na revista **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**:

Vitamin D3 deficiency increases DNA damage and the oxidative burst of neutrophils in a hypertensive rat model

Carla da Silva Machado^a, Vinicius Paula Venancio^b, Alexandre Ferro Aissa^{a,b},
Livia Cristina Hernandez^b, Michela Bianchi de Mello^b, José Eduardo Cavalcanti Del Lama^b,
Cleni Mara Marzocchi-Machado^b, Maria Lourdes Pires Bianchi^b,
Lusânia Maria Gregg Antunes^{b,*}

^a School of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2015

Received in revised form 20 January 2016

Accepted 25 January 2016

Available online 29 January 2016

Keywords:

Cholecalciferol

Comet assay

Oxidative stress

Hypertension

Micronucleus

SHR

ABSTRACT

Deficiency of vitamin D3, a lipophilic micronutrient, plays a role in the development of some chronic diseases. Vitamin D3 deficiency affects 25–50% of the human population and has been associated with increased risk for development of hypertension. DNA damage induced by reactive oxygen species (ROS) occurs more often in hypertensive than in normotensive individuals, and vitamin D3 status can influence this relationship. The aim of this study was to evaluate whether a diet supplemented with (10,000 IU/kg) or deficient in (0 IU/kg) vitamin D3, compared to a vitamin D3 control diet (1000 IU/kg), would modulate DNA damage and ROS production in spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive control Wistar-Kyoto (WKY) rats after 12 weeks of treatment. ROS production was assessed by measuring the oxidative burst of neutrophils. DNA damage was evaluated using the comet assay in peripheral blood and the micronucleus test in bone marrow and peripheral blood. Vitamin D3 supplementation did not induce DNA damage and did not change neutrophil ROS production in SHR and WKY rats. Vitamin D3 deficiency induced neutrophil ROS production and a high frequency of micronucleus formation in the bone marrow and peripheral blood of SHR rats only, and induced DNA damage (comet) in peripheral blood of both SHR and WKY rats. In conclusion, vitamin D3 deficiency showed a more pronounced effect on hypertensive animals. Population studies are needed to test whether this relationship also exists in humans.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Vitamin D is a general term describing two related lipophilic micronutrients, vitamin D2 (ergocalciferol) and vitamin D3 (cholecalciferol), and its micronutrients have the ability to regulate classic processes, such as calcium and phosphorus metabolism. Vitamin D3 is considered more clinically relevant than vitamin D2 because it is more potent in the conversion of vitamin D into the

active form (1,25 hydroxyvitamin D) in humans [1,2]. Vitamin D3 deficiency has been associated with the development of chronic diseases [3–5]. Vitamin D3 is obtained either by conversion of 7-dehydrocholesterol into previtamin D3 in the Malpighian layer of the epidermis after exposure to UVB radiation or from dietary sources, including fatty fish and fortified foods [6].

Epidemiologic evidence indicates that vitamin D3 deficiency (considering a level of 25-hydroxyvitamin D3 < 20 ng/mL) occurs in 25–50% of the human population [7–9], and it has been associated with development of hypertension [10,11]. Vitamin D3 deficiency has been shown to increase blood pressure [12–14], while having adequate levels of vitamin D3 (level of 25-hydroxyvitamin D3 between 20–30 ng/mL) has been associated with the reduction of high blood pressure or the maintenance of normal blood pressure [15,16]. In humans, 25-hydroxyvitamin D3 levels that exceed the normal range (levels above 50 ng/mL) are associated with adverse effects such as hypercalcemia [17].

Hypertension is a major risk factor for the development of diseases that affect the cardiac, nervous, renal and peripheral vascular

Abbreviations: AUC, area under the time-course curve of chemiluminescence; EDTA, disodium ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; IU, international unit; MNPC, micronucleated PCE; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NCE, normochromatic erythrocyte; OD, optical density; PBS, phosphate buffer solution; ROS, reactive oxygen species; SHR, spontaneously hypertensive rats; WKY, Wistar Kyoto.

* Corresponding author at: Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida do Café, s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 36024725.

E-mail address: lusania@fcfp.usp.br (L.M.G. Antunes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.01.005>

1383-5718/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.