



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Fernanda Amorim de Moraes Nascimento

**Efeitos transgeracionais da restrição materna de vitamina D em
camundongos: rim e metabolismo da glicose**

Rio de Janeiro

2012

Fernanda Amorim de Moraes Nascimento

Efeitos transgeracionais da materna restrição de vitamina D em camundongos: rim e metabolismo da glicose

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Coorientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N244 Nascimento, Fernanda Amorim de Moraes
Efeitos transgeracionais da restrição materna de vitamina D e camundongos: rim e metabolismo da glicose / Fernanda Amorim de Moraes Nascimento. – 2012.
82 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda Coorientadora:
Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Fígado gorduroso – Aspectos nutricionais – Teses. 2. Vitamina D. 3. Sistema renina-angiotensina. 4. Pâncreas – Teses. 5. Glicose – Metabolismo – Teses 6. Gravidez – Teses. I. Mandarin-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Mandarin-de-Lacerda, Márcia Barbosa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.39

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fernanda Amorim de Moraes Nascimento

Efeitos transgeracionais da restrição materna de vitamina D em camundongos: rim e metabolismo da glicose

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de junho de 2012.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Maurício Younes-Ibrahim
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Denise Mafra
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Jorge de Rezende Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Aldemir e Sheila, meu irmão Fernando e meu namorado Rafael. Sem vocês, eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo apoio e compreensão ao longo dessa jornada. Em especial aos meus pais Aldemir e Sheila pelo amor incondicional e suporte. Agradeço também ao meu irmão Fernando pelo companheirismo, alegria e presença em minha vida. Por último, mas não menos importante, à minha cunhada Isabella, tios, tias e primos. Amo muito todos vocês!

Ao meu namorado Rafael pelo suporte, companheirismo, carinho e participação intensa nesses seis anos que estamos juntos. Você fez e faz parte dessa trajetória e, sem dúvida, tornou-a mais doce. É um orgulho imenso tê-lo como companheiro e, se assim eu pudesse dizer, saiba que você também é a “bainha da minha espada”. Eu te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, pelos ensinamentos diários e desafios propostos ao longo desses anos de convívio e orientação. Obrigada pela oportunidade em desenvolver esse trabalho.

A Profa. Dra. Márcia Águila pelos dez anos de acolhimento e confiança. Os meus anseios profissionais hoje só podem ser trabalhados e sonhados, porque há dez anos me foi dada uma oportunidade. Aqui, nesse laboratório, aprendi o que é pesquisa e me encontrei. Muito obrigada!

Aos amigos “cientistas” que o laboratório me deu e que a vida me permitiu acolher:

- A amiga Caroline Fernandes (Carol) por toda amizade, risadas, incentivo, caminhadas de final de semana e ajuda científica. Você é muito especial garotinha!

- A amiga Bianca Gregório (Bibs) pela amizade, participação efetiva na etapa inicial desse projeto, carinho, risadas e sinceridade. Você foi fundamental nesse projeto e sem você, os domingos e feriados de eutanásia não teriam sido os mesmos! Adoro muito você!

- A amiga Sandra Barbosa (Sandrinha) pelo convívio diário desde o projeto do mestrado, almoços, companheirismo e carinho. Sua amizade é muito importante!

- A amiga Mariana Catta-Preta (Catta), minha vizinha e minha ex-chefe, obrigada pelo carinho de sempre, acolhimento nos momentos difíceis, risadas, oportunidades profissionais e espumantes de domingo. Você faz parte da minha trajetória!

- Ao amigo Leonardo Mendonça (Leo) pela amizade, conversas, apoio e ajuda científica. Adoro você garotinho!

Aos meus “filhos” e queridos alunos de iniciação científica pela participação responsável, troca de aprendizado e convivência durante o projeto: Vanessa Drexler, Fabio

Nascimento, Sandro Miranda, Bruno Verly, Rafaela Capelli e Thais Ceciliano. Este trabalho também é de vocês!

As minhas antigas e amadas amigas Mari Dantas, Fê Costa, Lú Vittori e um especial a Babi, que recentemente nos presenteou com uma princesa linda e que tanto amo: Nina! Obrigada por dividirem os melhores e piores momentos da minha vida, por me aceitarem como sou, por me conhecerem como ninguém, por torcerem comigo e por acreditarem nos meus sonhos. Eu amo muito todas vocês e sinto saudades do convívio diário, sempre!

As novas amigadas, que se fazem hoje tão importantes na minha vida: Adri (Guria) e Vivian (Vivs). Vocês são o máximo, meninas! Adoro muito vocês!

A todos os companheiros do LMMC pelos longos anos de convivência e aprendizado. Em especial, a essas pessoinhas tão queridas e que tornaram os meus dias aqui mais alegres: Thiago Torres, Rodrigo Neto, Alini Schultz e Julio Fraulob. Vocês são o máximo! Adoro vocês e continuarei torcendo pelo sucesso de cada um.

Não poderia deixar de agradecer também a Thatiany Marinho (Thaty) pela assistência técnica; a Profa. Dra. Vanessa Mello pela colaboração no projeto, principalmente durante as eutanásias e noites de testes; às técnicas Angélica Figueiredo e Aline Penna pela colaboração; a doutoranda Eliete Frantz pela divisão do biotério e fotos com os filhotes; a Profa. Dra. Alessandra Müller pela ajuda nas análises bioquímicas; e a Profa. Dra. Tatiane Faria pelos ensinamentos com imunohistoquímica e fluorescência. Muito obrigada por tudo!

A Belina, minha psicanalista, que me ajudou não só a entender um pouco o mundo louco que vivemos, assim como a encontrar um pouco de equilíbrio diário. O crescimento é um processo contínuo, com certeza! Adoro você!

*Toute la méthode consiste dans l'ordre et la disposition des
choses vers lesquelles il faut tourner le regard de l'esprit,
pour découvrir quelque vérité*

René Descartes (Règles pour la direction de l'esprit)

RESUMO

NASCIMENTO, Fernanda Amorim de Moraes. *Efeitos transgeracionais da restrição materna de vitamina D em camundongos: rim e metabolismo da glicose*. 2012. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A vitamina D, atualmente, é relacionada também ao metabolismo da glicose e o desenvolvimento de órgãos. Fêmeas de camundongos suíços (F0) foram alimentadas por uma das dietas experimentais: SC (dieta padrão) ou VitD- (dieta sem vitamina D). A prole de machos foi estudada nas idades: nascimento, 10 dias, desmame e seis meses, nas gerações F1 e F2. Avaliou-se a biometria [Massa Corporal (MC), Comprimento nasoanal (CNA) e Pressão Arterial (PA)], urina de 24 horas, glicemia e Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG). Durante a eutanásia, o sangue foi coletado para análise bioquímica e os tecidos foram removidos para análise estereológica, morfométrica e Western blotting (WB). Não houve diferença de MC ao nascimento. Ao desmame, o grupo F2-VitD- teve maior MC que F2-SC ($P=0,03$) e aos seis meses, os grupos F1 e F2-VitD- tiveram MC mais elevada ($P<0,05$ vs SC). A PA foi crescente na prole VitD-, sendo maior em F1-VitD- ($P=0,001$). A glicemia e TOTG foram alterados somente na F1-VitD-, seguida de esteatose hepática (+99%), hipertrofia da ilhota pancreática (+40%) e elevação do triglicérideo sanguíneo ($P<0,01$). O WB de fígado mostrou elevação de FAS (+18%, $P<0,01$), no grupo com esteatose. Curiosamente, embora a F2-VitD- tenha apresentado elevação de MC, somente o colesterol total fora alterado ($P<0,05$). Quanto à nefrogênese, houve 50% mais glomérulos imaturos em F1-VitD- que F1-SC ($P<0,0001$). Porém, na F2 houve aumento somente de 20% ($P<0,001$). Aos 10 dias, F1-VitD- teve 150% mais glomérulos imaturos e 25% mais glomérulos maduros que SC-F1 ($P<0,0001$). O WB de rim mostrou que a prole F1-VitD- apresentou maior expressão de renina, ao desmame e aos seis meses, enquanto que a expressão de podocina foi reduzida ($P=0,0004$). Não houve diferença na análise de WT1. A restrição materna em vitamina D altera a morfologia do pâncreas e fígado, com resistência à insulina, altera a expressão renal de importantes fatores, assim como retarda a maturação glomerular estendendo o período da nefrogênese, principalmente na geração F1.

Palavras-chave: Vitamina D. Glomerulogênese. Sistema renina-angiotensina. Esteatose hepática. Efeito intergeracional. Camundongo.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Fernanda Amorim de Moraes. *Transgenerational effects of maternal vitamin D restriction and mice: kidney and glucose metabolism*. 2012. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Vitamin D is also related to glucose metabolism and development. Female swiss mice (F0) were fed two diets: SC (standard diet) or VitD- (diet without vitamin D). The male offspring were studied at ages: birth, 10 days, weaning and six months in F1 and F2 generations. We evaluated the biometrics [body mass (BM), naso anal-length (NAL) and Blood Pressure (BP)], 24-hour urine and Oral Glucose Tolerance Test (OGTT). During euthanasia, blood was collected for biochemical analysis and the tissues were removed for stereological, morphometric and Western blotting (WB) analysis. No difference in BM was seen at birth and at weaning. Although, F2-VitD- offspring was greater than F2-SC ($P=0.03$) at weaning. At six months, both groups VitD- had higher BM than their controls ($P<0.05$). In addition, BP was increased in offspring VitD-, being more prominent in F1-VitD and this change was followed by hepatic steatosis (+99%), pancreatic islet hypertrophy (+40%) and elevated triglyceride ($P<0.01$). Further, the WB showed, in liver, high expression of FAS (+18%, $P<0.01$) in group with steatosis. Interestingly, although the BM in F2-VitD- has increased, only total cholesterol was altered ($P<0.05$). In nephrogenesis, there was 50% more immature glomeruli in F1-VitD- than F1-SC ($P<0.0001$). However, in F2 there was an increase by 20% ($P<0.001$). Already at 10 days, the group F1-VitD- had 150% more immature glomeruli and 25% more mature glomeruli than F1-SC ($P<0.0001$). WB analysis showed that F1-VitD- offspring had higher expression of renin, at weaning and six months, while podocin expression was reduced ($P=0.0004$). Although, no difference was seen on WT1 expression. The maternal vitamin D restriction alters the morphology of pancreas and liver, alters insulin resistance and the renal expression of important factor, as well as delayed glomerular maturation and extends the nephrogenesis period, principally in the F1 generation.

Keywords: Vitamin D; Glomerulogenesis. Renin-angiotensin system. Hepatic steatosis. Intergenerational effect. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Consequencias da programação fetal devido à alteração na nutrição materna.....	21
Figura 2 –	Modelo simplificado da cascata do sistema renina angiotensina.....	23
Figura 3 –	Alterações na metilação durante o desenvolvimento.....	25
Figura 4 –	Transmissão epigenética regulada.....	26
Figura 5 –	Metabolismo da vitamina D e a função durante a gestação.....	27
Figura 6 –	Síntese e metabolismo da vitamina D.....	30
Figura 7 –	Metabolismo da vitamina D e as principais ações celulares, mediadas pela formação do heterodímero VDR-RXR e a ligação com os VDREs em células-alvo.....	32
Figura 8 –	Modulação da produção da insulina pela célula beta pancreática e a transcrição da proteína desacopladora 2 (UCP2) pelo adipócito.....	33
Figura 9 –	Fotomicrografias de metanéfrons em diferentes estágios de maturação, em mesmo aumento e corados com hematoxilina-eosina.....	41
Figura 10 –	Evolução da massa corporal ao nascimento (0 dia), final da organogênese (10 dias) e desmame (21 dias) em ambas as gerações F1 e F2.....	46
Figura 11 –	Evolução da massa corporal aos três e seis meses de idade em ambas as gerações F1 e F2.....	47
Figura 12 –	Evolução da pressão arterial sistólica, dos três aos seis meses de idade, em ambas as gerações F1 e F2.....	48
Figura 13 –	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos grupos aos seis meses de idade em ambas as gerações F1 e F2 e Área sob a curva (ASC).....	49
Figura 14 –	Número de glomérulos maduros (M) e imaturos (I) ao nascimento em ambas as gerações F1 e F2.....	53
Figura 15 –	Fotomicrografias do rim ao nascimento, corados com hematoxilina-eosina e em mesmo aumento.....	54
Figura 16 –	Número de glomérulos maduros (M) e imaturos (I) aos 10 dias de vida em ambas as gerações F1 e F2.....	55

Figura 17 – Fotomicrografias do rim aos 10 dias de vida, corados com hematoxilina-eosina e em mesmo aumento.....	56
Figura 18 – Número de glomérulos aos seis meses de vida em ambas as gerações F1 e F2.....	57
Figura 19 – Esteatose hepática [Densidade de volume (Vv)] aos seis meses de vida em ambas as gerações F1 e F2.	58
Figura 20 – Diâmetro da ilhota pancreática aos seis meses de vida em ambas as gerações F1 e F2.....	59
Figura 21 – Análise da expressão de renina pelo Western blotting no tecido renal ao desmame e aos seis meses de vida.....	60
Figura 22 – Análise da expressão do receptor AT1 pelo Western blotting no tecido renal ao desmame e aos seis meses de vida.....	61
Figura 23 – Análise da expressão de podocina pelo Western blotting no tecido renal ao desmame e aos seis meses de vida.....	62
Figura 24 – Análise da expressão de WT1 pelo Western blotting no tecido renal ao nascimento.....	62
Figura 25 – Análise da expressão da FAS pelo Western blotting no tecido hepático aos seis meses de vida.....	63
Figura 26 – Análise da expressão da SREBP-1c pelo Western blotting no tecido hepático aos seis meses de vida.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores séricos de vitamina D e classificação quanto à normalidade, insuficiência e deficiência.....	34
Tabela 2 –	Composição das dietas experimentais.....	36
Tabela 3 –	Dados de ganho de peso, crescimento, glicemia das progenitoras F0 e F1 e nascimento da ninhada F1 e F2.....	45
Tabela 4 –	Dados biométricos da prole nas gerações F1 e F2 aos seis meses de idade.	47
Tabela 5 –	Dados bioquímicos da prole nas gerações F1 e F2 aos seis meses de idade.....	50
Tabela 6 –	Dados da análise da urina de 24 horas da prole nas gerações F1 e F2 aos seis meses de idade.....	51
Tabela 7 –	Dados da análise do rim ao nascimento e aos 10 dias nas gerações F1 e F2.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
AIN93G	Dieta segundo o Instituto Americano de Nutrição
AngII	Receptor de Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área Sob a Curva
AT1b	Receptor da Angiotensina tipo 1b
BPN	Baixo Peso ao Nascer
cm	Centímetro
CNA	Comprimento Naso-anal
CpG	Regiões CpG do DNA
CT	Colesterol Total
DBP	Proteína Transportadora de Vitamina D
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
F0	Geração de origem
F0-SC	Grupo Geração de origem com dieta padrão
F0-VitD-	Grupo Geração de origem com dieta sem vitamina D
F1	Primeira geração
F1-SC	Grupo primeira geração com dieta padrão
F1-VitD-	Grupo primeira geração com dieta sem vitamina D
F2	Segunda geração
F2-SC	Grupo segunda geração com dieta padrão
F2-VitD-	Grupo segunda geração com dieta sem vitamina D
FAS	Ácido graxo sintase

g	Gramma
G_i	Glomérulos imaturos
G_m	Glomérulos maduros
HE	Hematoxilina e Eosina
HOMA- β	Modelo de avaliação da homeostase para função da célula beta pancreática
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina
IL-12	Interleucina-12
IL-6	Interleucina-6
Kg	Kilograma
L	Litro
M	Mol
MC	Massa Corporal
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NOD	Camundongo diabético não obeso
PA	Pressão Arterial
pH	Potencial hidrogeniônico
P_p	Pontos Parciais
PPAR	Receptores ativados por proliferadores peroxissomais
P_T	Pontos Totais
PTH	Paratormônio
RD	Rim Direito
RE	Rim Esquerdo
RNA	Ácido Ribonucléico
RXR	Receptor retinóico X
S	Glomérulo imaturo na forma de S
SC	Dieta padrão
SRA	Sistema Renina-angiotensina
SREBP-1c	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TG	Triglicerídeo
TGP	Alanina transaminase
Th-1	Linfócito T-helper 1

Th-2	Linfócito T-helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
UCP-2	Proteína Desacopladora 2
μm	Micrômetro
UV-B	Radiação Ultravioleta do tipo B
VDR	Receptor nuclear da vitamina D
VDREs	Elementos seletivos da vitamina D
VitD-	Dieta sem vitamina D
<i>vs</i>	Versus
V_v	Densidade de volume
WB	Western blotting
WT-1	Proteína do tumor de Wilms

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	19
1.1	Geral	19
1.2	Específicos	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Programação fetal	20
2.1.1	Efeitos transgeracionais da programação fetal	23
2.2	Restrição materna de vitamina D e programação fetal	26
2.3.	Fisiologia e metabolismo normal da vitamina D	29
3	Material e Métodos	35
3.1	Animais e dieta	35
3.2	Biometria	37
3.3	Glicemia e Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	37
3.4	Análise da urina	38
3.5	Eutanásia	38
3.5.1	<u>Rim</u>	38
3.5.2	<u>Fígado</u>	39
3.5.3	<u>Pâncreas</u>	39
3.5.4	<u>Tecido adiposo</u>	40
3.6	Análise sérica	40
3.7	Estereologia	40
3.7.1	<u>Rim</u>	41
3.7.2	<u>Fígado</u>	42
3.8	Morfometria do pâncreas	42
3.9	Western blotting	43
3.10	Análise dos dados	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Dados maternos e ao nascimento da prole	45
4.2	Dados biométricos	45
4.3	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	48
4.4	Dados bioquímicos	49

4.5	Análise da urina de 24 horas	50
4.6	Estereologia do rim	51
4.6.1	<u>Nascimento</u>	52
4.6.2	<u>Final da organogênese (10 dias)</u>	54
4.6.3	<u>Seis meses</u>	56
4.7	Fígado	57
4.8	Morfometria do pâncreas	58
4.9	Western blotting	59
4.9.1	<u>Rim</u>	59
4.9.2	<u>Fígado</u>	63
5	DISCUSSÃO	65
	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

INTRODUÇÃO

A deficiência de micronutrientes é comum em todo o mundo e pode comprometer, não só a saúde de adultos, mas também a saúde de crianças. Nos Estados Unidos da América (EUA) há alta prevalência na deficiência ou insuficiência da vitamina D (Bodnar et al., 2007b; Davis et al., 2010). Além disso, estima-se que aproximadamente 36% dos adultos jovens saudáveis e 57% dos pacientes nos EUA e Europa apresentam deficiência ou insuficiência de vitamina D. Todavia, mesmo em países tropicais, como o Brasil, os índices dessa inadequação nutricional ocorrem (Cannell et al., 2006; Holick, 2006). Os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008 a 2009 alertaram para a inadequação de vitamina D em homens e mulheres, em adultos, sendo esses valores superiores a 99% (IBGE, 2010).

A vitamina D ou colecalciferol é um hormônio sintetizado na pele através de uma reação de isomeração catalisada pela radiação ultravioleta. A forma ativa desta vitamina relaciona-se com o metabolismo de cálcio e fósforo (Rapuri et al., 2002). As ações biológicas ocorrem pela ligação da forma ativa da vitamina D ao seu receptor nuclear (VDR), que forma um complexo heterodímero, capaz de regular a transcrição gênica (Bouillon et al., 1995).

Recentemente, a literatura tem apontado a vitamina D como importante fator para o desenvolvimento do sistema nervoso (Grecksch et al., 2009; Kesby et al., 2009) e sua deficiência pode estar relacionada com a gênese da obesidade, via inúmeros mecanismos ainda não totalmente elucidados (Gilbert-Diamond et al., 2010; Pacifico et al., 2011). Além disso, alguns teorizam que a vitamina D estaria envolvida na indução da produção de insulina (Mathieu et al., 2005).

Normalmente, o principal fator de risco para a deficiência é a inadequação dietética (Scholl e Chen, 2009). Durante o desenvolvimento, a restrição de vitamina D pode não só alterar a formação esquelética da prole, assim como pode também causar “imprinting” metabólico, que está associado com alterações metabólicas após o nascimento e durante a vida adulta (Lapillonne, 2010). Ademais, a deficiência de vitamina D está associada com prematuridade (Mulligan et al., 2010).

A organogênese normal depende de inúmeros fatores. O rim, por exemplo, necessita de um complexo processo regulado por diversas moléculas, tais como podocina e sistema renina-angiotensina (SRA), que irão controlar ou suprimir a proliferação, diferenciação e apoptose celular (Burrow, 2000). Estudos experimentais com restrição materna de vitamina D

mostram alteração no desenvolvimento cardiovascular (Gezmish et al., 2010), sistema nervoso (Eyles et al., 2009) e renal (Maka et al., 2008). Desta forma, investigar os efeitos da restrição materna de vitamina D sobre parâmetros moleculares, morfológicos e metabólicos na prole pode ajudar a elucidar sobre os possíveis mecanismos e respostas envolvidas na gênese de doenças crônicas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da restrição materna em vitamina D, durante a organogênese, sobre o desenvolvimento renal e metabólico nas gerações F1 e F2 em camundongos suíços.

1.2 Objetivos específicos

Induzir a restrição de vitamina D em fêmeas da geração F0.

Avaliar o desenvolvimento renal da prole nas gerações F1 e F2, sobre: a maturidade glomerular, número de glomérulos, expressão renal de proteínas do Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona e podocina, e expressão renal de proteínas reguladoras da nefrogênese (WT1).

Avaliar a função renal da prole nas gerações F1 e F2 na vida adulta.

Avaliar o perfil metabólico da prole nas gerações F1 e F2 na vida adulta.

Avaliar a morfologia do fígado e pâncreas da prole nas gerações F1 e F2 na vida adulta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Programação fetal

Estudos epidemiológicos, com humanos, mostram fortes evidências que o ambiente perinatal influencia o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como câncer, doença cardiovascular, diabetes e obesidade (de Boo e Harding, 2006; Godfrey et al., 2010). Sabe-se que durante o desenvolvimento gestacional, o organismo materno passa por modificações fisiológicas que visam o melhor suprimento de nutrientes e oxigênio para o feto em desenvolvimento. Dentre as principais mudanças, ocorre a expansão do volume plasmático e do débito cardíaco (Limesand et al., 2009). Logo, o ambiente materno, tal qual a alteração no suprimento nutricional, pode alterar o fluxo de nutrientes para a prole e assim, gerar um panorama conhecido como programação metabólica (Barker, 2001).

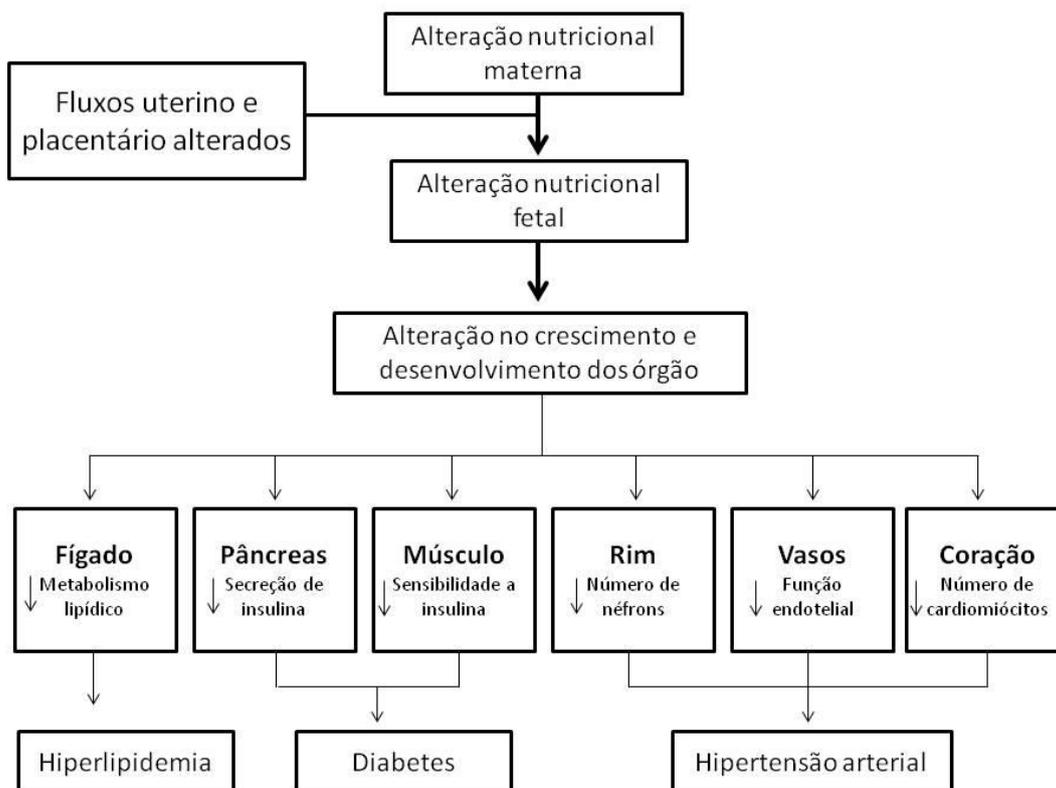
As alterações nutricionais, sendo a principal e mais documentada na literatura a restrição de proteína, podem alterar diversos sistemas nos quais o cardiovascular e endócrino são os mais acometidos (de Boo e Harding, 2006). A Figura 1 ilustra os principais sistemas afetados. Inúmeras são as possíveis explicações, mas a teoria do fenótipo econômico é imperativa (Geary e Crowley, 1999). Esta teoria afirma que em momentos de privação nutricional o organismo fetal sofre uma adaptação, a fim de maximizar a captação e a conservação dos nutrientes (Barker et al., 2006).

Os primeiros registros históricos, sobre a relação entre o baixo peso ao nascer e doenças cardiovasculares na vida adulta, datam das décadas de 1930 e 1940, por estudos coortes (Barker, 2004a, b). Porém, o referencial histórico do fenótipo econômico de Barker é datado de 1992, baseada em estudos observacionais (Hales e Barker, 1992). Desde então, nos últimos 20 anos, diversos autores abordam e tentam elucidar os efeitos da teoria da origem fetal ou do fenótipo econômico sobre a prole, na vida adulta (McMillen e Robinson, 2005; Attig et al., 2010; Almond et al., 2012).

Dentre os inúmeros prejuízos, a doença cardiovascular e o diabetes parecem exercer maior prevalência. Alguns estudos consideram que, para cada aumento de um quilo (1 Kg) no peso ao nascer, há a probabilidade de decréscimo de 5mmHg na pressão arterial sistólica na vida adulta, ou seja, há uma correlação inversa entre o peso ao nascer e a pressão arterial (Falkner et al., 2004). Corroborando com esses achados, estudos experimentais com animais mostram que a restrição protéica moderada ou intensa leva ao baixo peso ao nascer (BPN) e

que tal efeito promove elevação da pressão arterial na vida adulta da prole (Catta-Preta et al., 2006; Gregorio et al., 2008). Contudo, as alterações mostram-se mais proeminentes em machos quando comparados às fêmeas (Watkins et al., 2010).

Figura 1 - Consequências da programação fetal devido à alteração na nutrição materna



Fonte: Adaptada de de Boo e Harding, 2006.

No que concerne aos efeitos morfológicos relacionados às doenças cardiovasculares, as alterações renais podem promover uma ligação com a elevação da pressão arterial na prole. A literatura descreve que o desenvolvimento do rim sofre alterações em sua formação, quando a dieta materna é alterada (Woods et al., 2004). Por exemplo, a dieta pobre em proteína é capaz de alterar negativamente a nefrogênese, em humanos e animais (Hoy et al., 1999; Langley-Evans, 2001; Pires et al., 2006; Mesquita et al., 2010). Além disso, estudos clínicos retrospectivos reportam que crianças com história de BPN apresentam relação com o desenvolvimento de síndrome nefrótica e maior dependência de esteróides como tratamento (Dotsch et al., 2011).

Modificações renais podem ser importantes na gênese da hipertensão arterial sistêmica. A redução no número de glomérulos ou uma diminuição na filtração glomerular

pode proporcionar uma excreção reduzida de sódio, com consequente aumento da volemia e pressão arterial. Além disso, a conjuntura favorece uma hipertrofia compensatória na membrana glomerular, na tentativa de manutenção da taxa de filtração. Em longo prazo, esse mecanismo compensatório pode gerar a perda de nefros e consequentemente, a perda da função renal (Black et al., 2004; Villar-Martini et al., 2009).

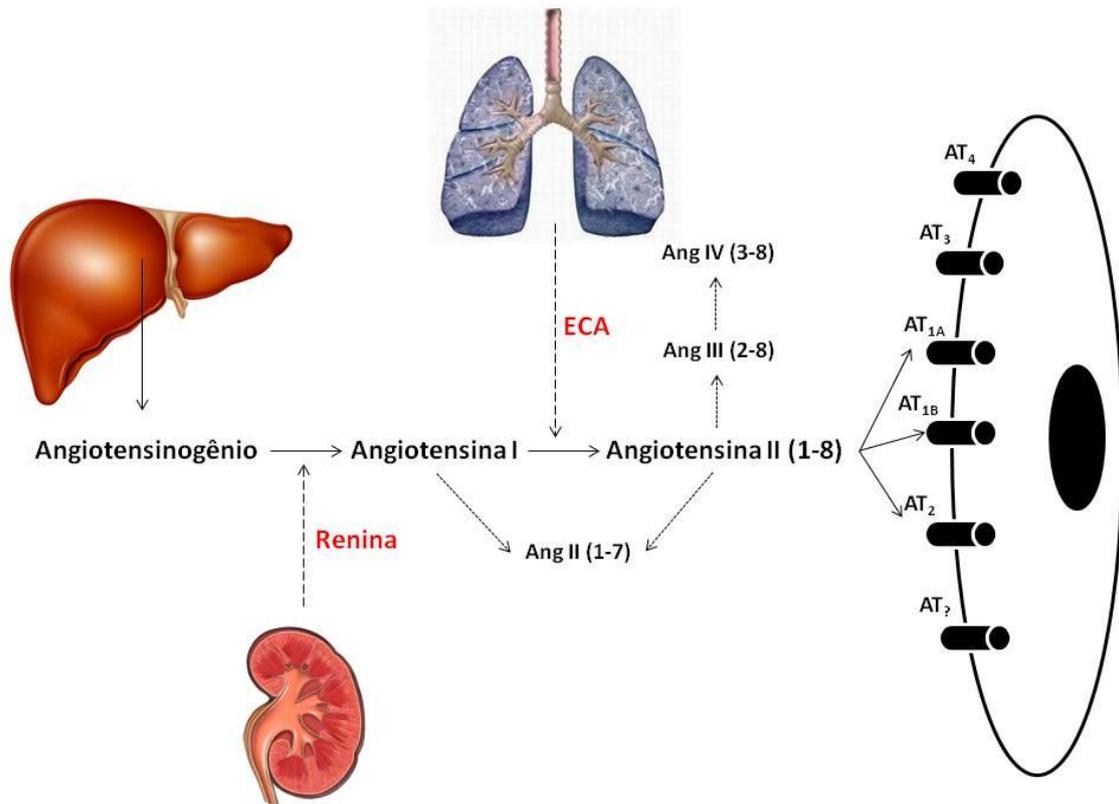
Em contrapartida, o contrário parece acontecer com a prole proveniente de progenitoras restritas em vitamina D. Recentemente, Maka e colaboradores descobriram que a deficiência de vitamina D durante a nefrogênese, em ratos, eleva o número de glomérulos. O estudo não apresentou maiores conclusões, mas abriu a discussão para o tema, principalmente relacionando tais efeitos às possíveis alterações do SRA (Maka et al., 2008).

O SRA, como discutido amplamente na literatura, relaciona-se com o tônus vascular e a composição do fluido extracelular. Porém, novas evidências o colocam como importante efetor durante o desenvolvimento. Tal hipótese é baseada na descoberta dos receptores da Angiotensina II (AngII) em sistemas ainda em desenvolvimento (Alwasel et al., 2010). No rim em desenvolvimento, todos os componentes da cascata do SRA são altamente expressos e parecem estar relacionados. Ademais, a supressão do SRA durante o desenvolvimento promove déficit no número de néfrons e pode ser ligado à programação da hipertensão arterial na vida adulta da prole (Guron e Friberg, 2000; Woods et al., 2001). A Figura 2 ilustra a cascata clássica do SRA.

Todavia, em relação à elevação da glicemia e possível desenvolvimento do diabetes na prole, a programação fetal parece envolver o desenvolvimento do pâncreas endócrino. As adaptações sofridas resultam em quadro de resistência à insulina na vida adulta e podem afetar até mesmo a geração F2 (Zambrano et al., 2005; Pinheiro-Mulder et al., 2010). A restrição materna em proteínas altera a estrutura pancreática de camundongos, com redução da massa de células beta, e tais agressões transpassam para a geração F3 (Frantz et al., 2011).

Quanto aos modelos de programação fetal por restrição de micronutrientes, sabe-se que a restrição de materna de ferro ou zinco é capaz de alterar o crescimento da prole. A deficiência de ferro ou zinco é muito prevalente em países com baixa renda (Viteri e Gonzalez, 2002) e durante a gestação acomete o crescimento ponderal do feto, levando ao BPN (Shahbazi et al., 2009). Não menos relevante, faz-se a restrição materna em vitamina D, o que resulta em déficit de crescimento da prole, prematuridade e alterações renais (Bodnar et al., 2007a; Bener et al., 2009). Os efeitos específicos da programação materna pela restrição da vitamina D serão abordados doravante.

Figura 2 - Modelo simplificado da cascata do sistema renina angiotensina



Legenda: A Figura mostra os componentes clássicos. As siglas são: Ang, angiotensina; AT, tipos de angiotensina II e ECA, enzima conversora de angiotensina.

Fonte: Adaptada de Guron and Friberg, 2000.

À luz do exposto, a nutrição materna é capaz de programar a prole para alterações futuras. Dentre a combinação dos fatores já discutidos anteriormente, tais como impressões no metabolismo e funções corpóreas da prole podem colaborar para o surgimento de doenças crônicas na vida adulta, o que resultaria no aumento das taxas de mortalidade e redução da longevidade. Assim, os estudos epidemiológicos ou experimentais proporcionam uma importante ferramenta no conhecimento desses mecanismos.

2.1.1 Efeitos transgeracionais da programação fetal

O termo “epigenética” significa acima da genética, foi descrito primeiramente em 1940, pelo biólogo Conrad Waddington (Waddington, 2011) e promove uma possível ligação entre as mudanças do ambiente com as alterações na expressão gênica (Alexander, 2010). Atualmente, se refere à mudança na expressão gênica, mas sem alteração na sequência do

DNA. Todavia, desde a década de 1990, coloca-se que a alteração ocorre na modificação da metilação do DNA e no remodelamento da cromatina (Wolffe e Matzke, 1999).

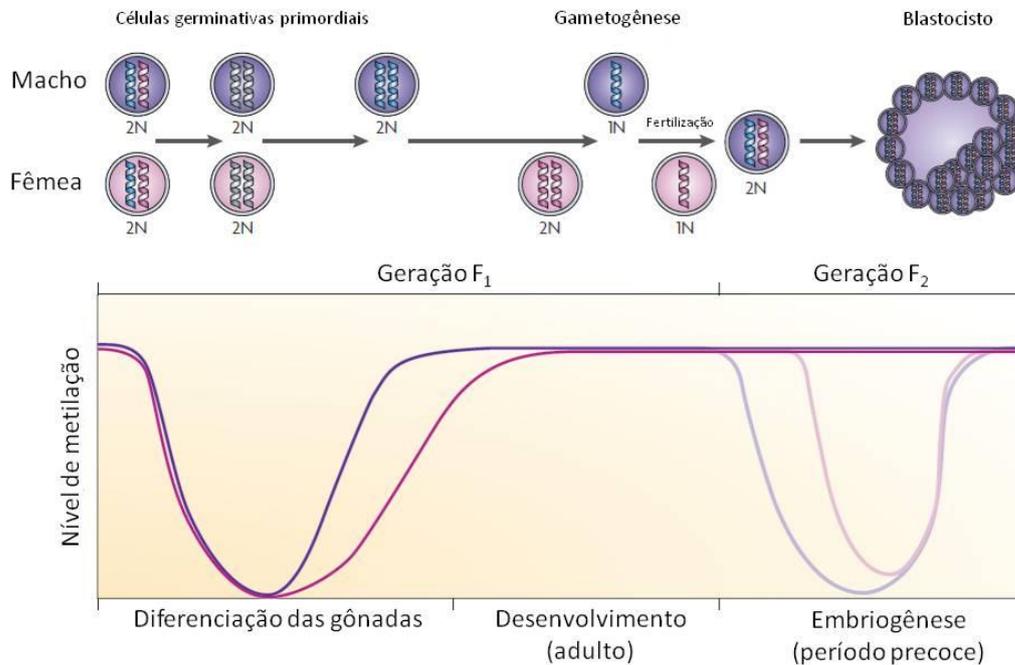
A metilação do DNA ocorre normalmente no carbono-5 da citosina de dinucleotídeos CpG, que são regiões ricas nestes dinucleotídeos, também conhecidas como ilhas CpGs, pois apresentam mais de 50% de conteúdo CpG. Essas regiões são normalmente ametiladas e são relacionadas com regiões promotoras de genes (Morgan et al., 2004). Além disso, podem ocorrer também mudanças na embalagem da cromatina do DNA, por modificações pós-tradução, da histona. Além disso, outros mecanismos epigenéticos podem incluir a regulação de micros RNA (Murphy e Jirtle, 2003).

Outra hipótese discutida é a alteração do DNA mitocondrial do feto de sexo feminino, que seria resultado de alterações durante seu desenvolvimento. Se tais alterações do DNA mitocondrial ocorrem no gameta feminino, estas alterações serão transmitidas aos descendentes (Zambrano et al., 2006). A Figura 3 mostra como as alterações no estado da metilação durante o desenvolvimento embrionário, assim como o período da diferenciação das gônadas, podem resultar no imprinting da expressão gênica. Além disso, nos machos a linha germinativa normalmente tem o imprinting dos genes no desenvolvimento das gônadas, que irão desenvolver as futuras espermatogônias. Em contrapartida, a linha germinativa feminina estabelece marcas de metilação dos genes maternos em uma fase posterior. Após a fertilização, o genoma paterno está ativamente desmetilado, enquanto o que o materno sofre desmetilação passiva (Jirtle e Skinner, 2007).

A herança genética envolve a transmissão dos traços biológicos para as gerações subsequentes. O efeito transgeracional requer modificações epigenéticas na linha germinativa e que devem ser capazes de alterar o fenótipo do indivíduo (Anway e Skinner, 2006). O ambiente é um fator altamente relacionado com alterações fenotípicas, uma vez que essas mudanças podem perdurar até a terceira geração. Quando a geração de origem (F0) é exposta a um ambiente agressor, tal qual alteração dietética, exposição química ou física, ambas as gerações subsequentes F1 e F2 permanecem expostas (Chang et al., 2006).

Estudos com humanos e animais demonstram como a exposição materna a um ambiente nutricional inadequado pode alterar o fenótipo da prole, principalmente, com a predisposição para o desenvolvimento de doenças crônicas (Zambrano et al., 2006; Pinheiro et al., 2008; Peixoto-Silva et al., 2011). A Figura 4 ilustra a transmissão na linha germinativa materna e as alterações fenotípicas na prole, e em alguns casos, tanto os machos, quanto as fêmeas podem desenvolver as doenças relacionadas.

Figura 3 - Alterações na metilação durante o desenvolvimento



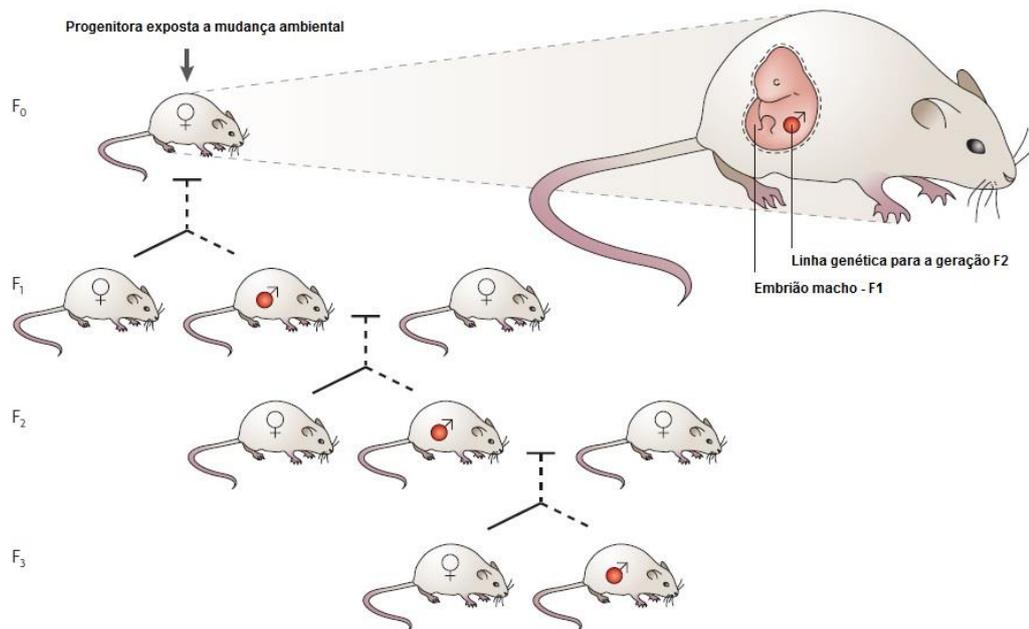
Fonte: Retirada de Jirtle e Skinner, 2007.

Bogdarina e colaboradores avaliaram a prole de mães restritas em proteína e como resultado, os autores concluem que a expressão do gene do receptor da angiotensina AT1b, na glândula adrenal, é regulada na primeira semana de vida. Além disso, os autores mostram ainda que o gene promotor do receptor AT1b na adrenal é significativamente menos metilado, assim tais dados sugerem uma ligação entre o insulto fetal e a modificação epigenética dos genes, o que pode resultar no desenvolvimento da hipertensão arterial na vida adulta. Algumas alterações nos genes do SRA perduraram até a 12^a semana de vida (Bogdarina et al., 2007) e pode explicar como a geração F₂, e até mesmo a geração F₃, podem apresentar elevação da pressão arterial em outros modelos (Harrison e Langley-Evans, 2009). Assim, é provável que influências semelhantes estejam envolvidas no desenvolvimento da hipertensão arterial em humanos.

Contudo, embora a ciência coloque que o ambiente desempenha um importante papel na manifestação de muitas doenças, a mesma não consegue ainda explicar como algumas diferenças fenotípicas entre indivíduos geneticamente idênticos. Desta forma, no futuro a epigenética tentará explicar também as mudanças fenotípicas que ocorrem em função da

idade, dieta e comportamento (Dolinoy et al., 2007). Como conclusão, sabe-se que fatores epigenéticos promovem alterações na metilação e estrutura do DNA, que são capazes de transmitir algumas alterações entre as gerações.

Figura 4 - Transmissão epigenética regulada pelo ambiente



Fonte: Retirada de Jirtle e Skinner, 2007.

2.2 Restrição materna de vitamina D e programação fetal

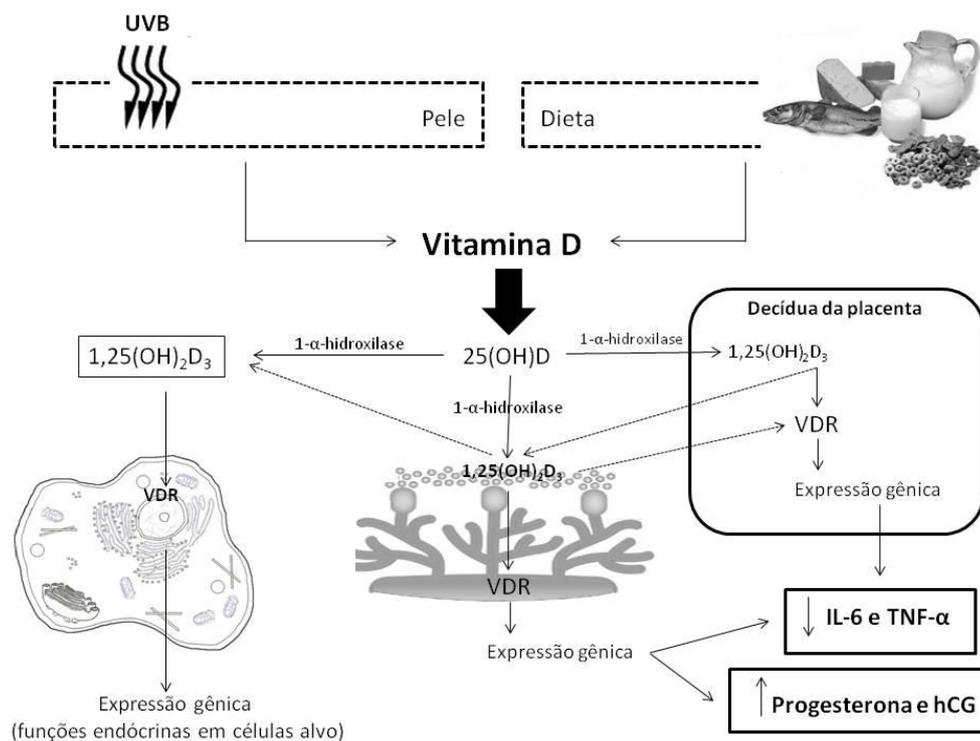
O papel exercido pela vitamina D durante a gestação ainda não é totalmente compreendido. Contudo, sabe-se que a inadequação materna em vitamina D afeta não só a mãe, assim como o feto e a prole na vida adulta (Brannon e Picciano, 2011). Além disso, estudos afirmam que a inadequação para vitamina D durante a gestação é altamente prevalente (Mulligan et al., 2010).

Durante a gestação, o metabolismo da vitamina D sofre alteração. Porém, quando e como esse metabolismo é alterado parece ainda ser uma questão aberta na literatura. Uma das hipóteses, é que a expressão da proteína transportadora de vitamina D (DBP – do inglês: vitamin D-binding protein) está aumentada de forma significativa nas primeiras oito a dez semanas de gestação e isso precede a elevação dos níveis de 1,25(OH)₂D₃ (vitamina D ativa) circulantes (Ritchie et al., 1998). Todavia, evidências mostram que o estrogênio pode desempenhar importante papel na regulação da DBP (Brannon, 2012).

Entretanto, como resultado da hipovitaminose D materna, os fetos humanos apresentam um estoque de vitamina D totalmente dependente dos níveis maternos. Assim, caso a mãe apresente hipovitaminose, a prole também apresentará deficiência durante o desenvolvimento (Hollis e Wagner, 2004).

Recentemente, descobriu-se a presença da 1- α -hidroxilase nos trofoblastos placentários, que pode relacioná-los com a elevação plasmática dos níveis maternos de 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Juntos, esses achados reiteram os estudos recentes que afirmam que a placenta é capaz de produzir vitamina D (Zehnder et al., 2002; Novakovic et al., 2009). É importante ressaltar ainda, que a decídua materna, um componente da placenta, também expressa a 1- α -hidroxilase, principalmente nos dois primeiros trimestres da gestação, o que compõe um importante complexo para a regulação da vitamina D materna (Figura 5).

Figura 5- Metabolismo da vitamina D e a função durante a gestação



Fonte: Adaptada de Brannon, 2012.

Estudos observacionais consideram a hipovitaminose D materna um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes gestacional e da pré-eclâmpsia. A pré-eclâmpsia é considerada uma das maiores causas de mortalidade materna em humanos (Brannon e Picciano, 2011). Normalmente, ocorre após a 20ª semana de gestação pela associação da hipertensão arterial

(pressão arterial sistólica superior >140 mmHg ou pressão arterial diastólica > 90 mmHg) com a proteinúria (>300 mg de proteína na urina de 24 horas) (Gong et al., 2012). Em humanos, a deficiência materna de vitamina D é apenas um dos inúmeros fatores ambientais possíveis envolvidos na gênese da pré-eclâmpsia. Porém, o mecanismo envolvido nesse processo ainda é inconclusivo e discutido. O que se observa, nos estudos prospectivos, é uma relação direta entre a hipovitaminose D e eclâmpsia materna (Frolich et al., 1992; Powe et al., 2010; Shand et al., 2010).

Contudo, a vitamina D parece regular a expressão de citocinas imunomodulatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a Interleucina-6 (IL-6), nos trofoblastos e nas células decíduas maternas (Diaz et al., 2009). Da mesma forma, parece influenciar a produção hormonal dos trofoblastos pela produção de progesterona e gonadotrofina coriônica humana (Brannon, 2012).

Em relação ao diabetes gestacional, a hipovitaminose D parece exercer associação com o desenvolvimento desta patologia (Baker et al., 2011), embora, os estudos sejam ainda insuficientes e conflitantes. Maghbooli e colaboradores encontraram diabetes gestacional em 23% das gestantes com baixos níveis de vitamina D (Maghbooli et al., 2008). Em contrapartida, nenhuma relação foi evidenciada em dois outros estudos coorte (Clifton-Bligh et al., 2008; Farrant et al., 2009).

É importante apresentar que alguns estudos experimentais apresentam ainda, o envolvimento da vitamina D na função e desenvolvimento cardiovascular. Em ratos, há mais de 20 anos, é discutida a associação entre a deficiência de vitamina D e alteração no controle da contração muscular cardíaca (Weishaar e Simpson, 1987). Além disso, ratos provenientes de mães restritas em vitamina D apresentam retardo no desenvolvimento cardíaco, com subsequente proliferação e hipertrofia de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo. Tais efeitos podem colaborar para alterações na função cardíaca da prole (Gezmish et al., 2010).

É sugerido ainda, que a vitamina D desenvolva importante papel na formação e maturação do sistema nervoso. Estudos recentes mostram fortes evidências, as quais a deficiência materna em vitamina D leva a anormalidades no córtex cerebral da prole, assim como aumento na proliferação celular por todo o cérebro (Eyles et al., 2009; Cui et al., 2010). Além disso, baixos níveis de vitamina D também são observados em pacientes com Parkinson. Estudos experimentais apontam que a hipovitaminose D perinatal pode ser um fator de risco também para o desenvolvimento de esquizofrenia (Altschuler, 2001; Kesby et al., 2009). Por exemplo, pessoas nascidas durante o inverno ou a primavera apresentam risco

elevado para esquizofrenia e tais efeitos são mais marcados em latitudes elevadas (McGrath et al., 2002).

2.3 Fisiologia e metabolismo normal da vitamina D

O conhecimento da vitamina D é antigo. A primeira descrição científica desta vitamina ocorreu em 1650, por Francis Glisson, que relacionou a doença raquitismo com a deficiência de vitamina D e desde então, passou-se a tratar o raquitismo com óleo de fígado de bacalhau. Anos depois, em 1928, Adolf Windaus recebeu o prêmio Nobel de química por seus estudos na constituição do esteroide e sua relação com as vitaminas (Wolf, 2004).

A vitamina D é um hormônio esteróide que possui efeitos pleiotrópicos em diversos tecidos, tais como osso, sistema imune, rim e tecido adiposo (Dusso et al., 2005). Entre as décadas de 1920 e 1930 descobriu-se que a vitamina D pode, também, ser sintetizada endogenamente (Tsiaras e Weinstock, 2011).

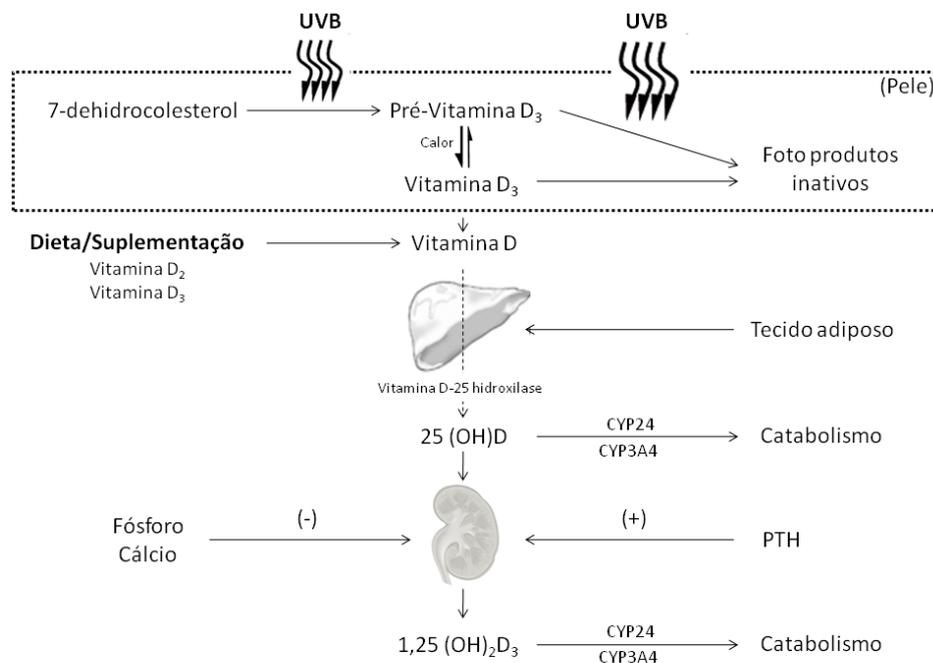
O mecanismo de produção endógena é iniciado com a produção do esteróide 7-deidrocolesterol na pele. Quando ocorre a exposição solar da pele à radiação ultravioleta do tipo B (UV-B), em raios de comprimento de onda de 295 a 300 nm, a molécula do 7-deidrocolesterol sofre uma quebra e um rearranjo em sua estrutura, formando assim a pré-vitamina D₃ (Holick et al., 1980), que rapidamente é transformada em vitamina D₃ (Holick, 1995). Apenas 10 a 15% do esteróide 7-deidrocolesterol são transformados em pré-vitamina D₃, cujo processo parece evitar níveis de toxicidade em casos de exposição solar excessiva (Tsiaras e Weinstock, 2011).

As concentrações séricas de vitamina D são carregadas pela DBP até o tecido adiposo, para armazenamento, o que prolonga sua meia-vida em até dois meses, ou para o fígado, que com a ação da enzima vitamina D-25 hidroxilase forma a 25(OH)D₃, o metabólito mais abundante na circulação, também conhecido como calcidiol (Vieth, 1999; Cui et al., 2011). Contudo, esta forma biológica não constitui a forma mais ativa da vitamina, que precisa ser convertida em 1,25(OH)₂D₃ no rim (Jones, 2008). A produção da 1,25(OH)₂D₃ é regulada por inúmeros fatores, sendo eles: concentração do fósforo e paratormônio (PTH), assim como a atividade das enzimas do Citocromo P-450 (CYP24 que faz o catabolismo no rim e CYP3A4 que faz o catabolismo no fígado e intestino delgado) (Zhou et al., 2006). A Figura 6 ilustra as principais fases do metabolismo da vitamina D.

É importante dizer ainda, que a síntese de vitamina D é proporcional à área de exposição à luz solar na pele e sofre influência de fatores ambientais, como a latitude, estação

do ano, quantidade de nuvens e até mesmo, a espessura da camada de ozônio presente (Webb et al., 1989; Webb et al., 2011). Além disso, quanto mais melanina (pigmentação da pele) estiver presente, menor será a quantidade de vitamina D sintetizada por uma mesma dose de raios UV-B. Desta forma, o tipo de pele e o uso de protetor solar podem contribuir para a redução na síntese da vitamina e também para uma possível hipovitaminose (Holick, 2003a, b). Além disso, estudos mostram que o uso do protetor solar de fator 8 a 15 pode reduzir em até 99% a síntese da vitamina D (Matsuoka et al., 1987). Contudo, é importante dizer que, o uso de protetor solar faz-se imprescindível no combate às doenças da pele, como o câncer de pele.

Figura 6 - Síntese e metabolismo da vitamina D



Fonte: Adaptada de Tsiaras and Weinstock, 2011.

Quanto à produção endógena da vitamina D é importante ressaltar que a redução na produção endógena está relacionada ao uso de roupas que cobrem parte do corpo, assim como a idade do indivíduo. Atualmente, a população de centros urbanos não se expõe de forma suficiente à luz solar para satisfazer as necessidades biológicas (Clipp et al., 2011). A exposição solar regular (sem bloqueador solar) necessária é aquela de 15 minutos por três a quatro vezes na semana. Além disso, sabe-se que as pessoas idosas tem a capacidade de síntese reduzida, assim, o tempo de exposição recomendado é maior, embora a literatura não esclareça totalmente o quanto (Annweiler et al., 2011). Assim, entende-se que a causa mais

comum quanto à deficiência de vitamina D nos dias atuais, principalmente no mundo ocidental, ocorre em indivíduos obesos, imigrantes, a baixa aquisição dietética ou pessoas com baixa exposição solar.

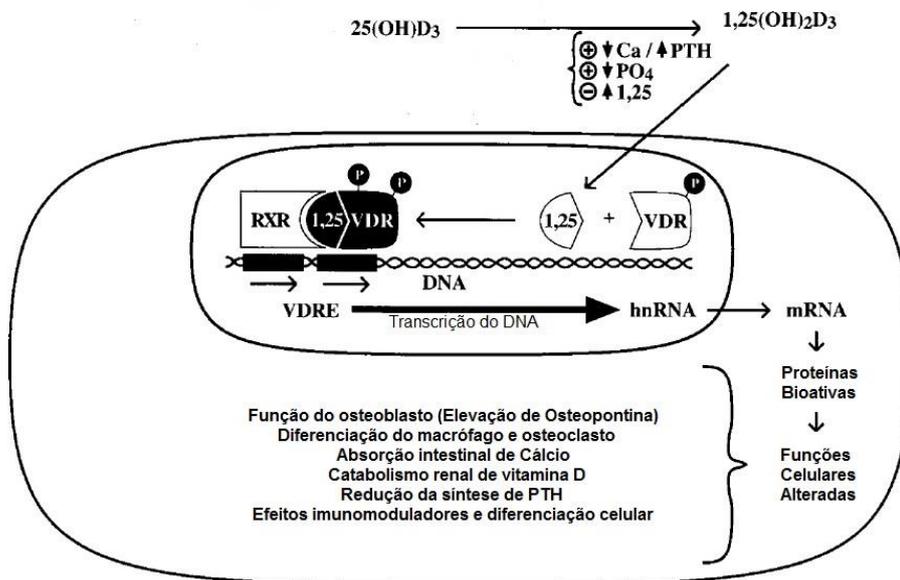
Ainda sobre as ações moleculares da vitamina D, a literatura descreve que é necessário uma afinidade pelo receptor VDR, um membro da superfamília dos receptores nucleares para hormônios esteróides (Brown et al., 1999; Mathieu et al., 2005). O VDR normalmente faz ligação, como heterodímero, com o receptor retinóico X (RXR) para estimular a transcrição gênica. Dentre as muitas funções da vitamina D, as principais são: (1) regular o metabolismo e crescimento ósseo; (2) estimular a reabsorção renal de cálcio; (3) regular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA); (4) regular a pressão arterial e (5) estimular a produção de insulina. A ligação do VDR com RXR forma um complexo heterodímero que se liga fortemente ao DNA. Em consequência, o heterocomplexo 1,25(OH)₂D₃-RXR-VDR reconhece de forma seletiva os elementos seletivos de vitamina D (VDREs) nas regiões promotoras dos genes controlados positivamente, tais como osteopontina, osteocalcinina e β₃-integrina (Haussler et al., 1997).

Os mecanismos pelos quais o VDR realiza positiva ou negativamente o controle da transcrição do DNA, após a ligação com os VDREs, não são ainda totalmente compreendidos na literatura. A Figura 7 ilustra, resumidamente, o processo descrito.

A presença de receptores e proteínas indutoras na produção do 1,25(OH)₂D₃ em células imunológicas, como o macrófago, sugere que a vitamina D pode atuar como importante imunomodulador. Células imunológicas apresentam a enzima 1-α-hidroxilase, a mesma apresentada pelas células renais (Takiishi et al., 2010).

In vitro, a 1,25(OH)₂D₃ estimula a fagocitose, assim como a secreção de citocinas importantes, como a IL-12, no processo de reconhecimento antígeno-anticorpo (Griffin e Kumar, 2003). Desta forma, a 1,25(OH)₂D₃ e seus análogos protegem algumas células importantes, como a célula beta pancreática, contra as citocinas inflamatórias. Para alguns autores, o mecanismo descrito pode ser a possível explicação para o efeito protetor exercido pela vitamina D contra o desenvolvimento do diabetes tipo 1, ilustrado na Figura 8 (Mathieu et al., 2005).

Figura 7 - Metabolismo da vitamina D e as principais ações celulares, mediadas pela formação do heterodímero VDR-RXR e a ligação com os VDREs em células-alvo



Fonte: Adaptada de Haussler et al. 1997.

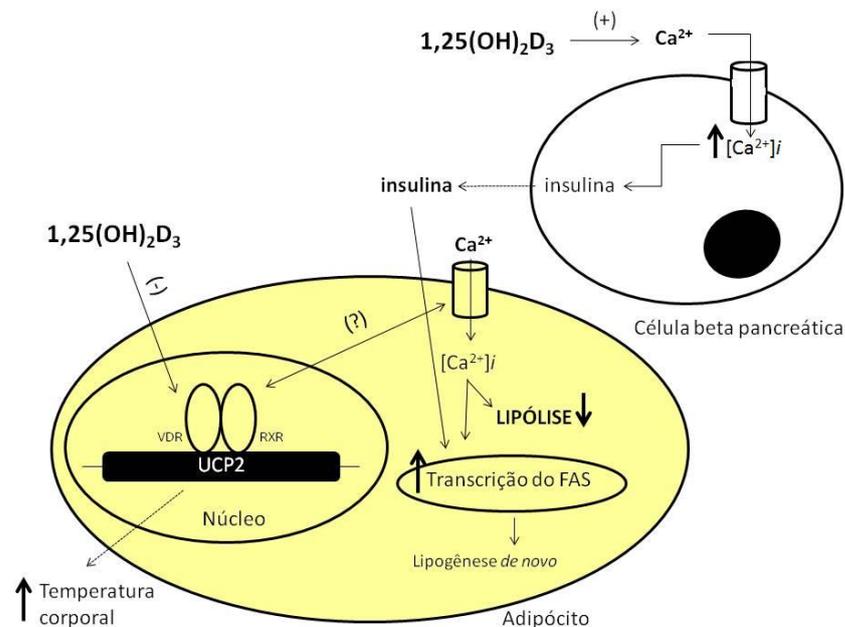
A administração crônica de doses farmacológicas de 1,25(OH)₂D₃ reduziu a incidência do diabetes tipo 1 em animais knockout do tipo NOD (do inglês: non-obese diabetic mouse), de 56% para 8% (Gregori et al., 2002). A base molecular parece envolver uma reformulação do repertório imunológico, com mudança na produção de citocinas pelas células T, tanto o linfócito T-helper 1 (Th1), quanto o linfócito T-helper 2 (Th2) (Mulligan et al., 2011).

Adicionalmente, a deficiência de vitamina D também está relacionada ao desenvolvimento do diabetes tipo 2. Essa afirmação pode ser comprovada por estudos, que demonstraram redução na secreção de insulina quando a deficiência de vitamina D estava presente (Bharati et al., 2011; Karnchanasorn et al., 2012), assim como uma variação sazonal na produção de insulina, em pacientes diabéticos tipo 2 durante o inverno, quando a hipovitaminose D é mais prevalente (Mitri et al., 2011).

In vitro, a 1,25(OH)₂D₃ induz a biosíntese da insulina na ilhota pancreática de ratos (Pittas e Dawson-Hughes, 2010), provavelmente porque afeta a concentração do cálcio intracelular (Pittas et al., 2007). Além disso, estimula a expressão dos receptores de insulina e/ou ativa a transcrição do proliferador de peroxissoma, PPAR-γ (do inglês: peroxisome proliferator activated receptor), que atua na regulação do metabolismo de ácidos graxos no

músculo esquelético e tecido adiposo (Hellemans et al., 2007). Tais efeitos contribuem para a sensibilidade periférica à insulina (Norman, 2006).

Figura 8 - Modulação da produção da insulina pela célula beta pancreática e a transcrição da proteína desacopladora 2 (UCP2) pelo adipócito



Fonte: Adaptado de Zemel, 2003a; Mitri et al., 2011.

Estudos clínicos sugerem que dietas ricas em cálcio podem afetar diretamente o metabolismo da glicose, uma vez que pode apresentar um efeito antiobesidade e preventivo no desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Angeles-Agdeppa et al., 2010; Muscogiuri et al., 2012). Estudos recentes colocam que esses efeitos estão relacionados aos níveis séricos da vitamina D ativa, que estimula o fluxo de cálcio para células como o adipócito, inibindo assim, a lipogênese (Zemel, 2003b). Além disso, a vitamina D também suprime a expressão da proteína desacopladora 2 (UCP2, do inglês: uncoupling protein 2), através da ligação ao receptor VDR (Martini et al., 2010). Porém, a literatura é ainda inconclusiva sobre tais efeitos, pois Shi et al coloca que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induz a lipogênese (Martinez et al., 2002), como mostrados na Figura 8.

O conhecimento dos níveis séricos de vitamina D faz-se importante, pois reflete tanto o consumo dietético, quanto a exposição solar do indivíduo. Desta forma, os níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ correspondem ao melhor marcador para avaliação da vitamina D. Algumas controvérsias existem sobre os valores de referência para os humanos (Bell, 2011; Brannon,

2012), mas pouco se discute sobre os valores de referência para os roedores (Maka et al., 2008). Em humanos, os pontos de corte são apresentados pela Tabela abaixo (Tabela 1).

Por último e não menos importante, a vitamina D parece atuar no SRA. Estudos epidemiológicos e clínicos sugerem uma relação inversa entre calcitriol e pressão arterial ou com a atividade da renina plasmática, tanto em pessoas normotensas, quanto em indivíduos hipertensos (Nolan, 2005). Além disso, o uso de bloqueadores do SRA em pacientes hipertensos mostrou efeito semelhante ao uso de calcitriol, em relação à redução da pressão arterial (Kimura et al., 1999). Assim, o estudo da vitamina D e seus efeitos pleiotrópicos abrem novas perspectivas e avanços em relação às doenças crônicas. Da mesma forma, que promove um vasto campo tanto para o tratamento, quanto para a prevenção dessas doenças.

Tabela 1 - Valores séricos de vitamina D e classificação quanto à normalidade, insuficiência e deficiência

Classificação	Níveis de 25(OH)D (ng/dL)	Níveis de 25(OH)D (ng/dL) – OMS
Normal	>30	
Insuficiência	20 – 29	<30
Deficiência	10 – 19	<20
Deficiência grave	<10	

Fonte: Bell, 2011.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com as normas internacionais de experimentação animal (NIH Publication No. 85 – 23, revisada 1996) e do comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ (CEA/242/2008). A linhagem utilizada foi proveniente do Centro de Criação de Animais de Laboratório, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Manguinhos no Rio de Janeiro. Além disso, todos os animais foram acondicionados em caixas de propietileno e permaneceram com condições controladas em temperatura (21 ± 2 °C), umidade ($60\pm 10\%$) e ciclo claro-escuro (12:12 h).

Fêmeas da linhagem swiss webster ($n=20$; F0) foram adquiridas com quatro semanas de idade. Ao completarem seis semanas, as mesmas foram separadas aleatoriamente de acordo com a dieta experimental em: SC (fêmeas do grupo controle; dieta padrão, AIN-93G, com vitamina D3) e VitD (fêmeas do grupo restrito em vitamina D; dieta AIN-93G e isenta apenas em vitamina D3). As dietas experimentais foram fornecidas pela empresa PragSoluções (Jau, São Paulo, Brasil, www.prag solucoes.com.br) e seguiram as recomendações da AIN-93G, na qual a dieta SC seguiu a recomendação para vitamina D que corresponde a 400.000 UI/kg de dieta ou 0,25g de colecalciferol/kg de dieta (Tabela 2) (Reeves et al., 1993). Após seis semanas de dieta, as fêmeas F0 foram acasaladas com machos da mesma idade, também adquiridos da FIOCRUZ, e que receberam durante toda a vida dieta SC. A restrição foi mantida por seis semanas para garantir a restrição da vitamina, uma vez que a mesma é lipossolúvel e dispõe de reserva hepática, como descrito anteriormente (Maka et al., 2008).

Ao nascimento, o sexo dos filhotes foi identificado pelo método da distância ânus-genital (Cao et al., 2008). Após esse procedimento, cada progenitora recebeu uma ninhada fixada em seis filhotes (três machos e três fêmeas), a fim de aprimorar o processo de lactação (Langley-Evans et al., 1996). Após o 10º dia de lactação, as progenitoras F0-VitD- tiveram as rações trocadas por SC, para que a restrição de vitamina D ocorresse somente no período de desenvolvimento da geração F1.

Ao desmame (21 dias), os filhotes machos da geração F1 compuseram a prole estudada nessa geração, enquanto as fêmeas foram aleatoriamente selecionadas, dentro de cada grupo, e assim colocadas com dieta SC, segundo a AIN93G, para a geração da prole F2. Aos três meses de idade, essas fêmeas selecionadas foram colocadas para acasalar com

machos, também adquiridos na FIOCRUZ e alimentados com dieta padrão por toda a vida, de mesma idade e geraram a geração F2. Os mesmos padrões, utilizados na separação e obtenção da prole F1, foram realizados com a geração F2. É importante ressaltar que todos os animais receberam as dietas experimentais ad libitum e tiveram livre acesso à água.

Tabela.2 - Composição das dietas experimentais

Nutriente (g/kg)	Dietas	
	SC	VitD
Amido de milho	397,50	397,50
Caseína	200,00	200,00
Amido dextrinizado	132,00	132,00
Sacarose	100,00	100,00
Óleo de soja	70,00	70,00
Fibra	50,00	50,00
L-cistina	3,00	3,00
Colina	2,50	2,50
Mix de minerais	35,00	35,00
Carbonato de calico	357,00	357,00
Mix de vitaminas	10,00	10,00
Vitamina D3 (400.000 UI/kg) – (1kg Mix)	0,25	0,00

Legenda: Todos os nutrientes correspondem às recomendações do AIN93G para roedores. Abreviações: SC, dieta padrão (do inglês standard chow); VitD, restrição de vitamina D.

As proles foram acompanhadas até os seis meses de idade, e os grupos experimentais foram formados com no mínimo seis animais, uma vez que a probabilidade necessária para um $P < 0,05$ é de $P = (1/2)^n < 0,05$, sendo este $n = 5$ (Cruz-Orive e Weibel, 1990). Além disso, é importante acrescentar, que somente um filhote de cada progenitora fora utilizado para a formação do grupo experimental e que nunca mais de um filhote da mesma ninhada compôs o mesmo grupo. Desta forma, os grupos experimentais seguiram da seguinte forma (F1-SC e F2-SC ou F1-VitD e F2-VitD), nas idades: nascimento (0 dia), fim da organogênese (10 dias), desmame (21 dias) e seis meses.

3.2 Biometria

Todas as progenitoras foram acompanhadas para avaliação da biometria: massa corporal (MC) e comprimento naso-anal (CNA), para determinação do ganho de peso materno e acompanhamento de possíveis alterações no crescimento.

A prole foi acompanhada semanalmente (as quintas 10h da manhã) e teve a MC e CNA aferidos do nascimento até a eutanásia. A aferição da MC ocorreu em balança de precisão de 0,01g, enquanto que a aferição do CNA ocorreu em superfície plana e com régua de precisão de 0,01 cm. Dos três aos seis meses de idade a pressão arterial sistólica (PA) foi aferida semanalmente (as quartas 14h da tarde). O método utilizado foi não invasivo pela pletismografia da cauda do animal (Letica LE5100, Panlab, Barcelona, Espanha).

3.3 Glicemia e Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Na semana anterior ao acasalamento as fêmeas, que seriam colocadas para acasalar, foram colocadas em jejum de seis horas (1h da manhã às 7h da manhã) para determinação da glicemia de jejum. Uma pequena incisão na cauda do animal foi realizada para aferição da glicose sérica pelo glicosímetro (Accu-chek performa, Roche, Mannheim, Alemanha). Três semanas depois, as fêmeas comprovadamente grávidas foram colocadas novamente em jejum para avaliação da glicemia gestacional. Contudo, desta vez, o jejum foi de quatro horas, para evitar uma possível hipoglicemia (Lindegaard e Nielsen, 2008). O método utilizado foi o mesmo descrito anteriormente.

Na prole, o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado na semana anterior à eutanásia, após jejum de seis horas (1h da manhã às 7h da manhã). O método utilizado foi o mesmo descrito na aferição das progenitoras. Após esse procedimento, os animais foram gavados com uma solução de glicose a 25% na dose de 1,0g/Kg através da introdução de uma cânula orogástrica e todo o volume introduzido na cavidade gástrica, sem que houvesse perda de líquido. Passados 15, 30, 60 e 120 minutos, a cauda dos animais foi ordenhada para obtenção de novas amostras de sangue e medições de glicose.

Os resultados glicêmicos foram analisados pelo GraphPad Prism (versão 5.03 para Windows, GraphPad Software, São Diego, Estados Unidos da América) e gerou uma área sob a curva (ASC) que pode ser utilizada para avaliação da tolerância à glicose (resistência à insulina).

3.4 Análise da urina

Aos seis meses de idade, na semana anterior à eutanásia, seis animais por grupo foram mantidos, individualmente, em gaiolas metabólicas por um período de 48 horas para climatização. Após esse período, cada animal teve a sua urina de 24 horas coletada e o volume total aferido, assim como o consumo alimentar e hídrico. O cálculo da produção da urina foi relacionado com a massa corporal, como descrito anteriormente (Lantelme *et al.*, 2002). Após a coleta da urina em tubos estéreis, a mesma foi centrifugada (120g por 15 minutos) para a separação do conteúdo sólido. Além disso, após o procedimento de centrifugação, a urina foi analisada para mensuração da uréia urinária, creatinina, ácido úrico e proteinúria, através dos métodos de colorimetria (Bioclin System II, Quibasa, belo Horizonte, MG, Brasil).

3.5 Eutanásia

Os animais que compuseram o grupo ao nascimento (0 dia) foram separados de suas progenitoras e tiveram, após a aferição da MC e CNA, a cabeça decapitada. Após esse procedimento, realizou-se uma incisão mediana na região abdominal, para retirada dos rins. Contudo, os demais grupos sofreram a eutanásia pelo método descrito abaixo.

Todos os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 150mg/kg intraperitoneal) e uma incisão mediana na região torácica foi realizada, para exposição cardíaca. A coleta de sangue ocorreu, em temperatura ambiente de 21° C, através de punção cardíaca no átrio direito e o sangue foi armazenado em tubos de ensaio para posterior centrifugação.

É importante ressaltar que, no dia anterior à eutanásia, os animais ficaram em jejum por seis horas, e no momento que antecedeu a anestesia, a glicemia sérica foi determinada pelo glicosímetro (Accu-chek performa, Roche, Mannheim, Alemanha), para futuro cálculo da resistência à insulina, pelos HOMA (*homeostatic model assessment*): HOMA-IR e HOMA- β . Além disso, os seguintes tecidos foram cuidadosamente removidos e analisados:

3.5.1 Rim

Todos os rins dos animais foram removidos de forma cautelosa e separados da gordura perirrenal, para então obtenção do volume, pelo método de Scherle (Scherle, 1970). O rim esquerdo (RE) foi separado para análises estereológicas e por tanto, foi seccionado ao meio e

fixado em solução fixadora (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, o RE foi processado para técnicas histológicas, incluído em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América). O corte histológico seguiu-se de forma seriada e os cortes de cinco micrometros de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

O rim direito (RD) foi separado para análise molecular, pela técnica do Western blotting, que será descrita posteriormente. Desta forma, o RD foi fracionado em pequenos fragmentos e armazenado em criotubos, devidamente identificados, a temperatura de -80° C.

3.5.2 Fígado

O fígado foi cuidadosamente dissecado e seu volume determinado através do método de Scherle (Scherle, 1970). Cinco animais compuseram o grupo para análises morfológicas, dos quais o fígado foi seccionado em pequenos fragmentos (1 mm de espessura cada) e fixado em solução fixadora (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, o tecido hepático foi processado para técnicas histológicas, incluído em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), seccionados em cortes de três micrometros de espessura e corados com HE para futuras análises estereológicas (Nascimento *et al.*, 2010).

Outros cinco animais formaram o grupo das análises moleculares (Western blotting), dos quais, fragmentos hepáticos (100 mg cada) foram retirados e armazenados em criotubos, devidamente identificados, a temperatura de -80° C. As análises realizadas serão elucidadas posteriormente.

3.5.3 Pâncreas

O pâncreas foi cuidadosamente dissecado e pesado, para determinação da sua massa (Fernandes-Santos *et al.*, 2009). O tecido foi totalmente incluído em solução (1,27 mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, todo o pâncreas foi processado para técnicas histológicas, incluído em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), seccionados em cortes de cinco micrometros de espessura e corados com HE para futuras análises morfométricas (Nascimento *et al.*, 2010).

3.5.4 Tecido Adiposo

A gordura localizada na parte inferior do abdome e correlacionada com o epidídimo foi considerada como gordura epididimária. Esta foi dissecada e pesada para obtenção da massa adiposa, assim como a gordura retroperitoneal. Após esse processo, a partir da massa corporal e massa adiposa, calculou-se a relação da massa corporal com a massa adiposa do animal.

3.6 **Análise sérica**

A coleta do plasma foi obtida através da centrifugação (120 g/15 minutos) do sangue coletado, em temperatura ambiente para posterior armazenamento em temperatura de -20° C. As análises realizadas foram: colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e alanina transaminase (TGP) pelo método cinético-colorimétrico do manual de instruções da Bioclin® (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte - MG, Brasil). Além disso, analisou-se também a insulina sérica pelo método do radioimunoensaio (Linco Research, St.Charles, Missouri, Estados Unidos da América, Kit. RI-13K), com coeficiente de variação de 1.4%. Ademais, o cálculo do HOMA-IR e HOMA-B foram realizados pelas seguintes (Matthews *et al.*, 1985):

$$\text{HOMA-IR} = (\text{glicemia de jejum} \times \text{insulina de jejum})/22,5$$

$$\text{HOMA-}\beta = (20 \times \text{insulina de jejum})/(\text{glicemia de jejum} - 3,5)$$

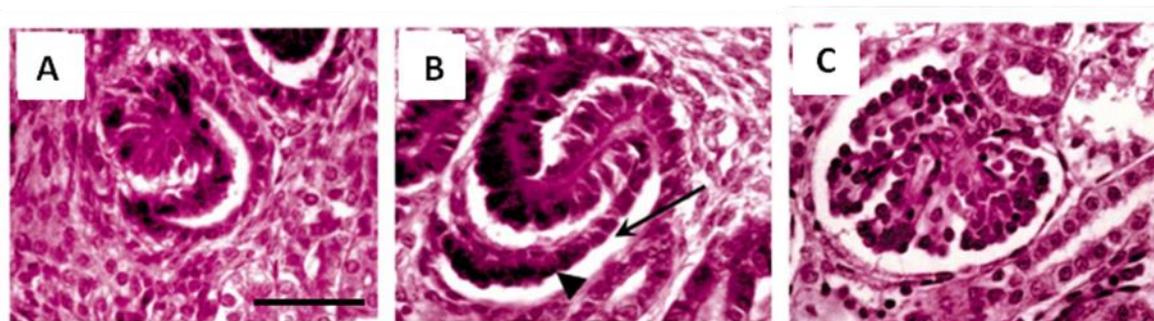
3.7 **Estereologia**

O rim e o fígado foram analisados pelas técnicas estereológicas, que são explicadas a seguir.

3.7.1 Rim

Os cortes seriados do RE, ao nascimento e aos 10 dias de idade, foram utilizados para a estimacão dos glomérulos imaturos (*Gi*) e glomérulos maduros (*Gm*). Os *Gi* são definidos pela forma em vírgula (*comma-shaped*) ou em S (*S-shaped*), enquanto que, os *Gm* são definidos por corpúsculos totalmente vascularizados, ilustrados na Figura 9 (Almeida e Mandarim-de-Lacerda, 2002).

Figura 9 - Fotomicrografias de metanfrons em diferentes estágios de maturaco, em mesmo aumento e corados com hematoxilina-eosina



Legenda: Figura A. Vesícula renal dobra entre si e rapidamente forma um pólo condensado, esta é a forma em vírgula (*Comma-shaped*). Figura B. Os dois pólos condensados da forma em vírgula crescem do centro ao eixo vesicular, formando uma torço, esta é a forma em S (*S-shape*). Figura C. O ápice tem podócitos e invaginaes em direo ao centro da área mesangial. Ocorre um aumento no citoplasma e os núcleos dos podócitos ficam menos condensados, formando uma esfera, este é o glomérulo vascularizado.

Fonte: Almeida e Mandarim-de-Lacerda, 2002.

O método do *fractionator* foi utilizado para estimar o número de glomérulos em determinado corte, iniciado em corte aleatório, para cada 10 cortes. Desta forma, conseguimos obter o número total de glomérulos por rim, corrigidos pelo volume do rgo (Bertram *et al.*, 1992; Pires *et al.*, 2006). A estimativa do diâmetro glomerular é relacionada com o mesmo método utilizado para estimar o número de glomérulos: *fractionator/dissector*. A frao do rim que utilizamos para a contagem dos glomérulos possui glomérulos justamedulares e glomérulos superficiais que foram considerados. Sabe-se que o diâmetro de glomérulos justamedulares  maior que o diâmetro dos glomérulos superficiais. Por tanto, a soluço encontrada é estimar o tamanho do glomérulo de forma aleatória e determinar seu tamanho médio. Assim, a avaliao foi realizada, usando no mínimo 100 glomérulos/grupo, como descrito anteriormente (Mandarim-de-Lacerda *et al.*, 2010). Além disso, as análises foram feitas pelo sistema de imagens com câmera LC Evolution no microscópio Olympus BX51,

com o programa Image-Pro Plus (Image-Pro Plus, versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos da América), em pelo menos 100 glomérulos por grupo (Mandarim-de-Lacerda *et al.*, 2010).

3.7.2 Fígado

A análise estereológica hepática foi realizada por um sistema teste e visualizada no microscópio Leica DMRBE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), com câmera de infinidade 1-5c (Lumenera Co., Ottawa, ON, Canadá). A estereologia realizada foi dada pela determinação da densidade do volume (V_v) de esteatose hepática, estimada pela contagem dos pontos que tocavam a vesícula de gordura (Catta-Preta *et al.*, 2011), colocado abaixo:

$$V_v \text{ esteatose} = P_p \text{ (pontos nas gotículas)} / P_T \text{ (pontos totais)}$$

O sistema teste utilizado foi composto por 49 pontos, em pelo menos dez campos por animal, por exemplo: 49 x 10 x 5 = 2450 pontos-teste por grupo. Considerando o menor V_v de esteatose, que foi de 7,78% (grupo F2-VitD), o modelo permite um padrão aceitável de erro calculado de 0,046, a partir da equação, descrita abaixo e apresentada no seguinte site: <http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/calcsstereology.html>. Ademais, o modelo teste utilizado foi produzido pelo STEPanizer (www.stepanizer.com) (Tschanz *et al.*, 2011).

$$P_T = 0,453 * (1 - V_v \text{ esteatose}) / (V_v \text{ esteatose} * E_2)$$

3.8 Morfometria do pâncreas

As lâminas do pâncreas foram fotografadas e imagens digitais foram obtidas, com a mesma técnica de análise do fígado. O menor e maior diâmetro da ilhota pancreática foi medida, para cálculo do diâmetro médio (no mínimo 100 ilhotas pancreáticas por grupo), pelo programa Image-Pro Plus (Image-Pro Plus, versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos da América) (Souza-Mello *et al.*, 2011).

3.9 Western blotting

Os tecidos armazenados no freezer a -80°C foram utilizados para análise da expressão de proteínas específicas e foi realizado pelo método do Western blotting. O RD foi analisado nos grupos ao nascimento, desmame e seis meses de idade, enquanto o fígado foi analisado somente no grupo seis meses de idades. As proteínas foram extraídas por tampão adicionado de inibidores de protease. O homogenato foi centrifugado a 7380rpm/5000g por 20 minutos e a 4°C , para então coleta do sobrenadante. Quantidades iguais de proteínas foram suspensas em SDS, com tampão de amostra, aquecidas por cinco minutos a 100°C e separadas por SDS/PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas PVDF (Hybond-P; Amersham Biosciences), quando então as membranas foram bloqueadas por leite desnatado a 6% com solução tampão de Tris [20 mM Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mM NaCl], contendo 0,05% de Tween 20 (T-TBS). Somente após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpos primários. No RD, seguiram-se os seguintes anticorpos:

Anticorpo policlonal *anti-rabbit* para receptor AT1 (AT1r 306; 43 kDa; SC-579; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:1000;

Anticorpo monoclonal *anti-mouse* para renina (A-1; 38-46 kDa; SC-137252; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:1000;

Anticorpo policlonal *anti-rabbit* para podocina (H-130; 42 kDa; SC-21009; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:1000;

Anticorpo policlonal *anti-rabbit* para WT1 (C-19; 52 kDa; SC-192; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:500.

Contudo, no fígado, os anticorpos primários utilizados foram:

Anticorpo policlonal *anti-rabbit* para SREBP-1c, do inglês anti-sterol regulatory element binding protein (SREBP-1c; 68 kDa; sc-367; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:1000;

Anticorpo policlonal *anti-rabbit* para FAS, do inglês fatty acid synthase (FAS; 270 kDa; sc-20140; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:1000.

Além disso, todas as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário, sendo eles: *anti-rabbit* (1:10000 para FAS; 1:8000 para podocina, AT1r e SREBP-1c; 1:5000 para WT1) e *anti-mouse* (1:5000). As expressões de proteína foram detectadas de acordo com o manual de instruções com sistema de detecção por quimioluminescência (ECL; Amersham Biosciences). É importante acrescentar que, todos os grupos foram também incubados com

beta-actina (anticorpo monoclonal *anti-mouse*; 43 kDa; SC-81178; Santa Cruz Biotechnology; diluição 1:1000) para futura correção da expressão protéica.

As proteínas foram visualizadas por autoradiografia e obtidas por análise quantitativa de imagens digitais (Image-Pro Plus versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos da América), para determinação da absorvância.

3.10 Análise dos dados

Os dados foram testados para distribuição normal e homogeneidade de variância e são apresentados em média e erro padrão da média (EPM). Após, a diferença entre os grupos foi analisada por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey e *two-way* ANOVA (geração x dieta). As diferenças entre as gerações F1 e F2 foram analisadas pelo teste-*t* de Student, não pareado ou o não paramétrico de Mann-Whitney. Para todas as análises utilizou-se o software GraphPad Prism versão 5,03 (La Jolla, CA, Estados Unidos da América). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Dados maternos e nascimento da prole

Não houve diferença significativa entre os grupos de progenitoras sobre a MC inicial, MC final ou glicemia. Além disso, não houve diferença estatística no número de filhotes nascidos vivos ou mortos, assim como, não houve diferença na distribuição da ninhada em relação a machos e fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados de ganho de peso, crescimento, glicemia das progenitoras F0 e F1 e nascimento da ninhada F1 e F2

Parâmetros	SC-F0	VitD-F0	SC-F1	VitD-F1
MC inicial (g)	33,1 ± 4,0	33,2 ± 4,2	35,1 ± 5,3	38,9 ± 5,5
MC final (g)	47,7 ± 7,5	48,3 ± 3,4	50,3 ± 6,4	56,9 ± 7,2
Glicemia (mmol/L)	4,7 ± 0,8	5,4 ± 0,7	4,4 ± 0,6	4,8 ± 0,5
Número da ninhada (n)	11,0 ± 1,0	12,0 ± 2,0	13,0 ± 2,0	12,0 ± 4,0
Natimortos (n)	1,0	3,0	0,0	0,0
Relação macho:fêmea	1:1	1:1	1:1	1:1

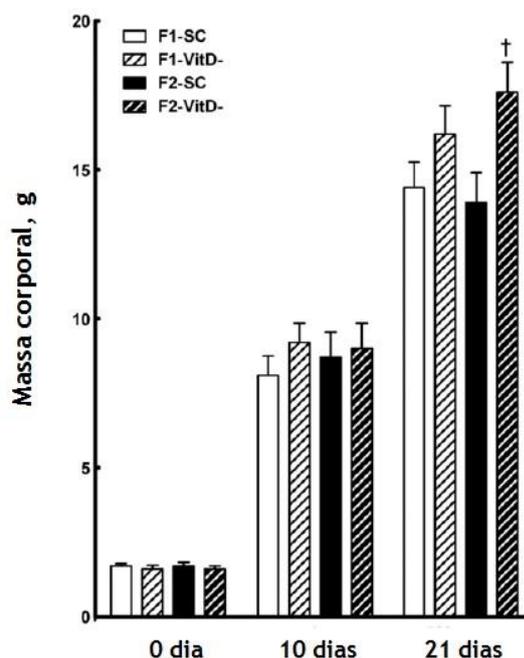
Legenda: CNA, comprimento naso-anal; g, grama; MC, massa corporal; mmol, milimol; n, número.

4.2 Dados biométricos

Ao nascimento e aos 10 dias de vida, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para MC. Porém, aos 21 dias (desmame), o grupo F2-VitD teve um incremento na MC de 26%, comparado ao respectivo grupo controle (*vs* F2-SC; $P=0,03$). Esses dados são ilustrados na Figura 10.

A Figura 11 mostra a evolução da MC após o desenvolvimento, aos três e aos seis meses de idade. Nesse momento, percebe-se uma elevação da MC em ambos os grupos provenientes da restrição de vitamina D: +17% no grupo F1-VitD e +15% no grupo F2-VitD ($P<0,05$).

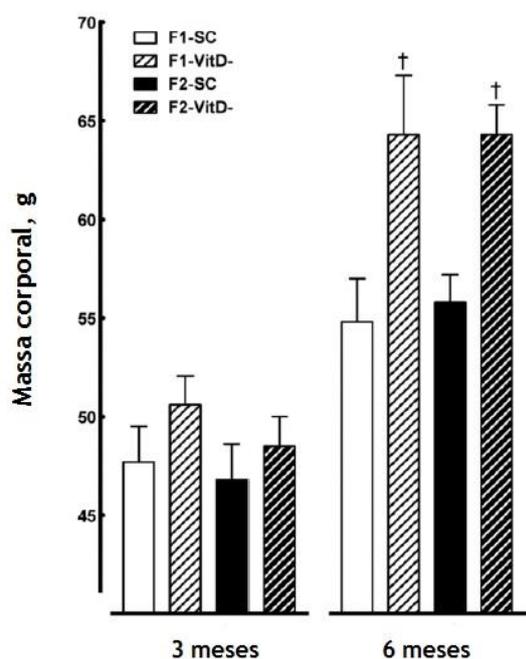
Figura 10 - Evolução da massa corporal ao nascimento (0 dia), final da organogênese (10 dias) e desmame (21 dias) em ambas as gerações F1 e F2



Legenda: Os valores são expressos em média \pm EPM e foram testados com *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle.

Em relação às análises do CNA, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos durante todo o experimento (dado não ilustrado). As análises das massas adiposas epididimária e retroperitoneal corroboraram com a MC. A restrição de vitamina D materna elevou a relação entre MC e massa adiposa nas duas gerações (+106% na F1 e +93% na F2; $P=0,01$). O grupo F1-VitD teve aumento nos dois tecidos de gordura: +154% na gordura epididimária e +96% na gordura retroperitoneal, comparado ao grupo F1-SC ($P=0,02$). Além disso, não houve diferença nas massas do pâncreas e fígado (Tabela 4).

Figura 11 - Evolução da massa corporal aos três e seis meses de idade em ambas as gerações F1 e F2



Legenda: Os valores são expressos em média \pm EPM e foram testados com *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle.

Tabela 4 - Dados biométricos da prole nas gerações F1 e F2 aos seis meses de idade

Parâmetros	F1-SC	F1-VitD	F2-SC	F2-VitD
G. epididimária (g)	0,99 \pm 0,18	2,52 \pm 0,45 ^[a]	1,07 \pm 0,22	2,07 \pm 0,36
G. retroperitoneal (g)	0,33 \pm 0,06	0,65 \pm 0,09 ^[a]	0,34 \pm 0,08	0,90 \pm 0,24
Relação MC/MA (%)	2,58 \pm 0,56	5,33 \pm 0,54 ^[a]	2,45 \pm 0,43	4,74 \pm 0,55 ^[b]
Pâncreas (g)	0,34 \pm 0,03	0,39 \pm 0,04	0,48 \pm 0,08	0,35 \pm 0,03
Fígado (g)	2,08 \pm 0,11	2,43 \pm 0,13	2,58 \pm 0,18	2,97 \pm 0,56

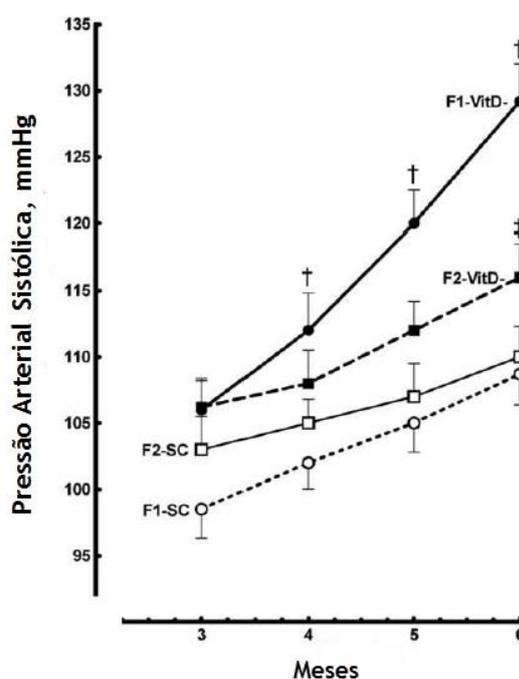
Legenda: G, gordura; g, grama; MC, massa corporal; MA, massa adiposa.

Nota: Valores são média \pm EPM e diferenças foram testadas com *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). Os símbolos [a] significam diferença estatística com F1-SC; [b] significam diferença estatística com F2-SC.

Quanto aos níveis pressóricos, a PAS aferida dos três aos seis meses de idade apresentou-se continuamente em elevação nas duas gerações onde ocorreu a restrição de

vitamina D. A Figura 12 mostra a evolução da PAS entre os grupos estudados, do qual o grupo F1-VitD apresentou um aumento de 10% na PAS aos quatro meses, comparado ao grupo F1-SC ($P=0,04$). Diferença que continuou a ser mantida nos meses seguintes com 15% de elevação no quinto mês e 20% de aumento no sexto mês ($P<0,0001$). Em relação a geração F2, esta mostrou incrementos menores que a F1, pois aos seis meses de vida F2-VitD apresentou uma redução de 10% da PAS comparada ao grupo F1-VitD ($P<0,05$).

Figura 12 - Evolução da pressão arterial sistólica, dos três aos seis meses de idade, em ambas as gerações F1 e F2

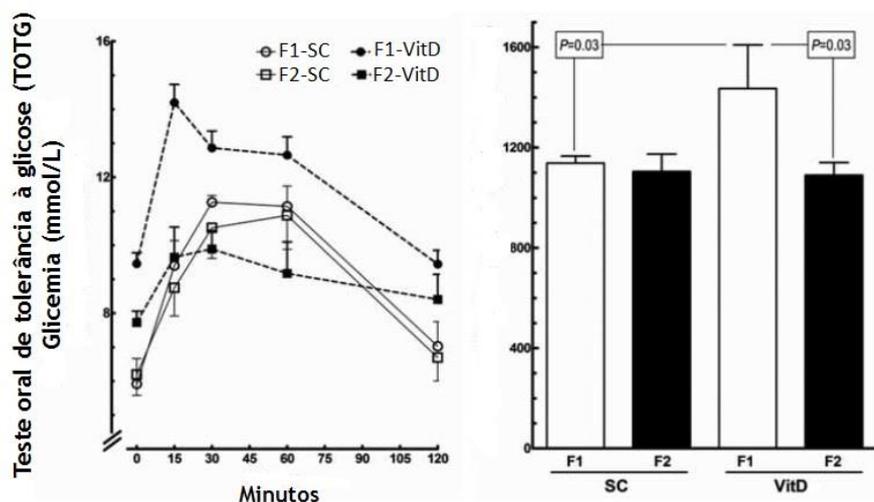


Legenda: Os valores são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e foram testados com *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey ($P<0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle.

4.3 Teste Oral de Tolerância à glicose

O grupo F1-VitD apresentou alteração no TOTG quando comparado aos demais grupos estudados. A Figura 13 mostra que houve um aumento de 26% no TOTG da prole F1-VitD ($P=0,03$). É importante colocar que, apesar das alterações na MC em ambas as gerações, apenas a geração F1 apresentou resistência à insulina, e a prole F2-VitD teve o TOTG reduzido em 25%, quando comparada à prole F1-VitD ($P<0,01$). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre F2-SC e F2-VitD.

Figura 13 - Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos grupos aos seis meses de idade em ambas as gerações F1 e F2, e Área sob a curva (ASC)



Legenda: Os valores são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle.

4.4 Dados bioquímicos

A restrição materna em vitamina D foi capaz de modificar os parâmetros bioquímicos das proles, aos seis meses de vida, principalmente na geração F1. Os dados são apresentados na Tabela 5, a qual mostra que o grupo F1-VitD teve um aumento de 160% na secreção de insulina, sem alterações na glicose sérica, comparado ao grupo F1-SC ($P = 0,01$). Conseqüentemente, o HOMA-IR apresentou-se elevado (+190% vs F1-SC; $P = 0,02$).

Ademais, o perfil lipídico do grupo F1-VitD também foi alterado, com valores elevados de TG (+75% vs F1-SC; $P < 0,01$). Contudo, a geração F2 foi menos afetada, pois não apresentou diferenças semelhantes, tendo uma elevação apenas no CT (+34%; $P < 0,01$) quando comparada ao respectivo controle F2-SC. Em relação aos demais índices estudados, não houve diferenças estatísticas entre os grupos para HOMA- β , glicemia de jejum ou TGP (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados bioquímicos da prole nas gerações F1 e F2 aos seis meses de idade

Parâmetros	F1-SC	F1-VitD	F2-SC	F2-VitD
Glicose (mmol/L)	7,1 ± 0,27	9,3 ± 0,35	7,4 ± 0,39	8,4 ± 0,99
Insulina (pmol/L)	195,4 ± 23,80	510,6 ± 118,1 ^[a]	249,3 ± 57,30	255,3 ± 14,36
HOMA-IR ¹	61,3 ± 7,46	178,0 ± 45,49 ^[a]	86,4 ± 23,10	96,1 ± 14,10
HOMA-β ²	174,3 ± 28,46	231,4 ± 84,94	166,6 ± 26,39	178,7 ± 43,89
CT (mg/dL)	77,4 ± 5,33	103,80 ± 4,48	81,0 ± 4,50	108,6 ± 3,06 ^[b]
TG (mg/dL)	53,2 ± 4,15	93,20 ± 8,99 ^[a]	62,0 ± 9,19	129,6 ± 26,12
TGP ³ (UI/L)	42,8 ± 5,10	56,2 ± 3,76	45,0 ± 5,28	42,8 ± 3,94

Legenda: CT, colesterol total; HOMA, do inglês homeostatic model assessment; TG, triglicérideo; TGP, alanina transaminase. ¹HOMA-IR = fasting glucose concentration (mmol/L) x fasting insulin concentration (pmol/L)/22,5; ²HOMA-β = 20 x fasting plasma insulin (in μ-units/ml)/fasting plasma glucose (in mmol/L) – 3.5.

Nota: Valores são média ± EPM e diferenças foram testadas com *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). Os símbolos [a] significam diferença estatística com F1-SC; [b] significam diferença estatística com F2-SC.

4.5 Análise da urina de 24 horas

A análise dos parâmetros urinários mostrou que não houve diferença entre os grupos para ingestão hídrica, consumo alimentar, volume urinário, ácido úrico ou proteinúria. Contudo, quando calculado a produção de urina, corrigida pela MC, vimos que a prole F1-VitD- teve uma redução de 60% ($P < 0,001$) nessa produção, quando comparada aos demais grupos experimentais. Além disso, a restrição materna em vitamina D na prole F1-VitD causou elevação nos valores de uréia urinária (+430%; $PP < 0,0001$) e creatinina urinária (+175%; $P < 0,0001$) quando comparada ao grupo F1-SC. Porém, a geração F2 mostrou valores reduzidos para uréia urinária (-70%; $P < 0,001$) e creatinina urinária (-60%; $P < 0,001$), quando comparada ao grupo F1-VitD (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados da análise da urina de 24 horas da prole nas gerações F1 e F2 aos seis meses de idade

Parâmetros	F1-SC	F1-VitD	F2-SC	F2-VitD
MC, g	53,1 ± 2,2	64,2 ± 3,1	57,9 ± 2,3	62,5 ± 1,8
CA, g/dia	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,2 ± 0,5	3,4 ± 0,2
IH, g/100g MC/dia	16,3 ± 1,0	14,4 ± 1,6	15,2 ± 1,1	13,3 ± 1,3
Volume total, mL	2,9 ± 0,2	1,5 ± 0,6	2,7 ± 0,3	2,1 ± 0,7
Produção de urina, mL/g MC	0,05 ± 0,002	0,02 ± 0,004 ^[a]	0,04 ± 0,006	0,04 ± 0,004
Uréia, mg/dL	36,5 ± 3,8	194,7 ± 23,2 ^[a]	45,5 ± 8,1	58,2 ± 8,5 ^[b]
Creatinina, mg/dL	1,2 ± 0,1	3,3 ± 0,2 ^[a]	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1 ^[b,c]
Ácido úrico, mg/dL	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,6	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,3
Proteinúria, g/L	0,43 ± 0,1	0,55 ± 0,1	0,40 ± 0,1	0,44 ± 0,1

Legenda: CA, consumo alimentar; IH, ingestão hídrica; MC, massa corporal.

Nota: Valores são média ± EPM e diferenças foram testadas com *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). Os símbolos [a] significam diferença estatística com F1-SC; [b] significam diferença estatística com F2-SC; [c] significam diferença estatística com F1-VitD.

4.6 Estereologia do rim

Os dados biométricos e morfométricos do rim, ao nascimento, 10 dias ou seis meses, são mostrados na tabela 7 e apresentados de acordo com as respectivas idades.

Tabela 7 - Dados da análise do rim ao nascimento, aos 10 dias e aos seis meses de vida nas gerações F1 e F2

Parâmetros	F1-SC	F1-VitD	F2-SC	F2-VitD
0 dia				
MR, mg	8,2 ± 0,2	10,3 ± 0,4 ^[a]	8,7 ± 0,6	9,0 ± 0,9
DG, µm	49,3 ± 0,6	43,3 ± 0,3 ^[a]	50,2 ± 1,2	46,0 ± 0,8 ^[b]
10 dias				
MR, mg	47,4 ± 2,0	60,2 ± 1,0 ^[a]	56,3 ± 3,0	53,0 ± 2,9
DG, µm	87,2 ± 0,6	81,0 ± 0,6 ^[a]	87,3 ± 1,3	82,8 ± 0,7 ^[b]
6 meses				
MR, mg	390.2 ± 27.0	421.3 ± 21.0 ^[a]	403.9 ± 3.8	414.8 ± 2.9 ^[a,b]
DG, µm	102.5 ± 1.9	93.3 ± 1.4 ^[a]	103.0 ± 1.6	98.0 ± 2.2

Legenda: DG, diâmetro glomerular; MR, massa renal.

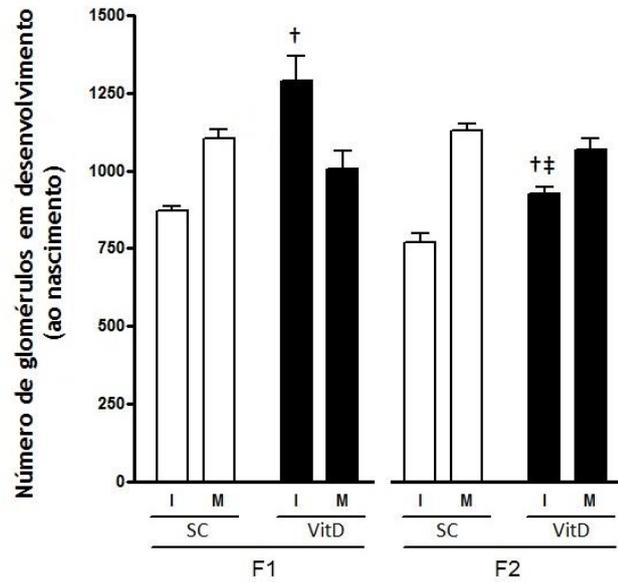
Nota: Valores são média ± EPM e diferenças foram testadas com *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). Os símbolos [a] significam diferença estatística com F1-SC; [b] significam diferença estatística com F2-SC; [c] significam diferença estatística com F1-VitD.

4.6.1 Nascimento

A massa renal (MR) foi 25% maior no grupo F1-VitD que no grupo F1-SC ($P < 0,0001$). Em contrapartida, o diâmetro glomerular (DG) mostrou-se menor tanto na F1 (-12% vs F1-SC; $P < 0,05$), quanto na F2 (-8% vs F2-SC; $P < 0,05$). Este parece ter sido um efeito intergeracional, pois nenhuma diferença foi encontrada para MR ou DG entre os grupos F1-VitD e F2-VitD (Tabela 7).

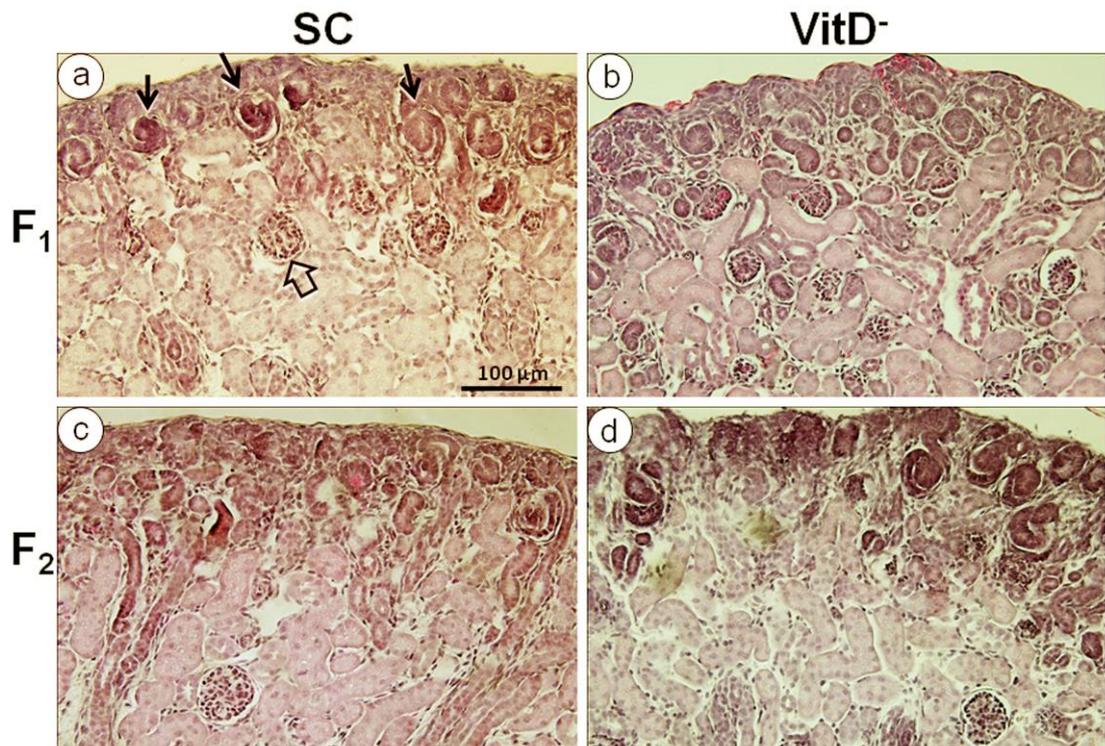
A estereologia do rim mostrou que os animais provenientes da linhagem de restrição de vitamina D apresentavam também maior número de glomérulos imaturos, comparados aos animais provenientes de dieta padrão (Figura 14). Tais efeitos foram mais expressivos na geração F1 (+50%; $P < 0,0001$), comparada a geração F2 (+20%; $P < 0,001$). A Figura 15 ilustra essas diferenças, nas quais as fotomicrografias do rim em desenvolvimento, coradas com HE, apresentam maior número de glomérulos imaturos (em *S-shape* ou *comma-shape*) na região do córtex renal.

Figura 14 - Número de glomérulos maduros (M) e imaturos (I) ao nascimento em ambas as gerações F1 e F2



Legenda: Os valores são expressos em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com F1-VitD.

Figura 15 - Fotomicrografias do rim ao nascimento, corados com hematoxilina-eosina e em mesmo aumento



Legenda: (a) F1-SC, (b) F1-VitD, (c) F2-SC e (d) F2-VitD. Glomérulos em S-shape e comma-shape no cortex (setas) e glomérulos vascularizados ao centro (setas abertas).

4.6.2 Final da organogênese (10 dias)

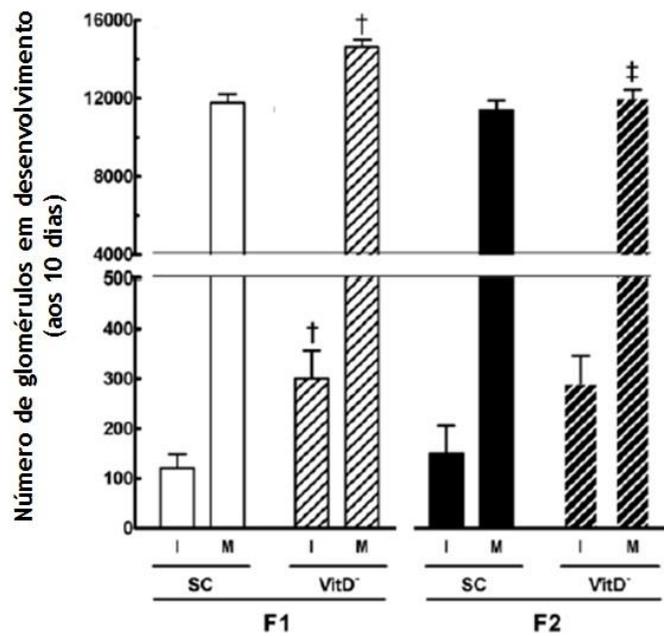
Aos 10 dias de vida, a MR do grupo F1-VitD foi 27% maior que no grupo F1-SC ($P < 0,009$). No entanto, o DG permaneceu reduzido em comparação ao respectivo controle (-7% vs F1-SC; $P < 0,05$), enquanto na geração F2 houve redução de 5% (vs F2-SC; $P < 0,05$) (Tabela 7).

Normalmente, aos 10 dias de vida os glomérulos imaturos quase não estão presentes, uma vez que este período representa o fim da organogênese no camundongo. Porém, a restrição materna em vitamina D foi capaz de elevar em 150% ($P < 0,0001$) o número de glomérulos imaturos nesta fase, na geração F1 (Figura 16). Em relação ao número de glomérulos maduros, estes foram 25% mais numerosos na F1 comparado ao respectivo controle (F1-SC), e 20% menos numerosos quando comparados a geração F2 (vs F2-VitD; $P < 0,001$).

A Figura 17 ilustra as fotomicrografias do rim ao final da organogênese, coradas com HE. Neste momento, os animais F1-VitD apresentam maior número de glomérulos imaturos

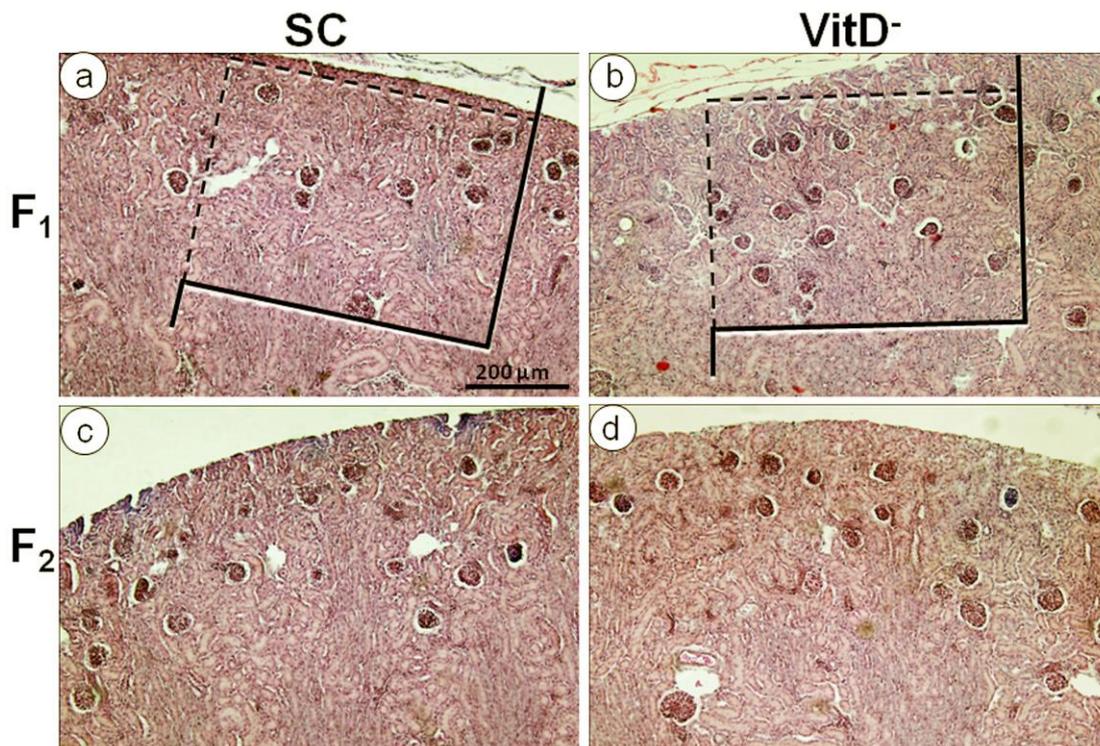
(em *S-shape* ou *comma-shape*) na região do córtex renal comparado ao F1-SC. Além disso, percebe-se, ainda, a presença dessas estruturas na geração F2.

Figura 16 - Número de glomérulos maduros (M) e imaturos (I) aos 10 dias de vida em ambas as gerações F1 e F2



Legenda: Os valores são expressos em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com F1-VitD.

Figura 17 - Fotomicrografias do rim aos 10 dias de vida, corados com hematoxilina-eosina e em mesmo aumento



Legenda: (a) F1-SC, (b) F1-VitD, (c) F2-SC e (d) F2-VitD. A grade teste enfatiza que o grupo F1-VitD apresenta maior número de glomérulos.

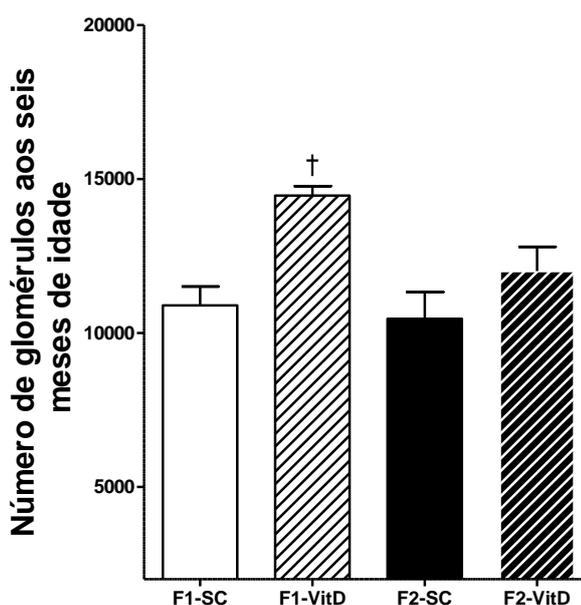
4.6.3 Seis meses

Aos seis meses de vida, a MR variou entre os grupos em ambas as gerações. Na geração F1, a prole F1-VitD- teve um aumento de 7% na MR ($P=0,0008$), enquanto que a geração F2, apresentou somente 3% de aumento comparada ao respectivo grupo controle ($P=0,01$). No entanto, o DG foi diferente apenas na geração F1 que apresentou diâmetros 9% menores que seu respectivo controle ($P=0,003$). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos na geração F2 (Tabela 7). A análise pelo teste do two-way ANOVA mostrou que para o DG a dieta contribuiu 40% ($P=0,0008$) para o total da variação, enquanto que nenhuma interação foi observada na MR.

Em relação ao número de glomérulos, a prole F1-VitD- continuou apresentando maior número de glomérulos que o controle de sua geração (+33%; $P=0,004$). De fato, a prole F2-VitD, nesse momento não apresentou diferenças significativas comparada ao respectivo grupo controle, o que provocou uma redução de 17% no número de glomérulos quando comparada a prole F1-VitD- ($P=0,02$) (Figura 18). Neste parâmetro, a dieta contribuiu com 35% do total de variação ($P=0,001$), enquanto que a geração contribuiu com apenas 11% ($P=0,04$). Todavia,

nenhuma interação entre dieta e geração foi observada. Além disso, o número de glomérulos aos seis meses não foi diferente, comparado ao mesmo grupo com 10 dias de vida (glomérulos imaturos e maduros; Figura 16).

Figura 18 - Número de glomérulos do rim aos seis meses de vida em ambas as gerações F1 e F2

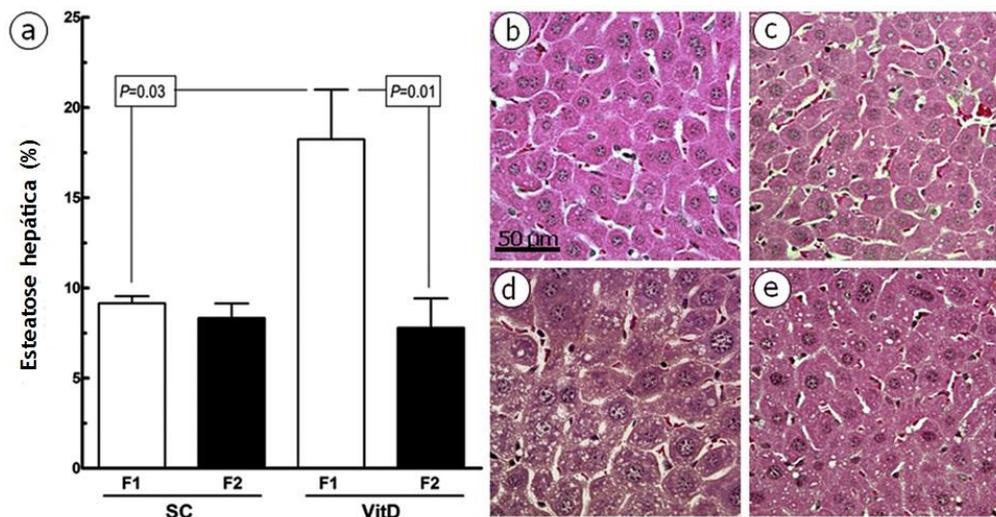


Legenda: Os valores são expressos em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com F1-VitD.

4.7 Estereologia do fígado

A estereologia do fígado mostrou que o grupo F1-SC apresentou uma estrutura morfológica organizada, sem sinais significativos de esteatose. Ao contrário, o grupo F1-VitD teve uma importante esteatose dispersa por todo o tecido, em macro e microvesículas, com aumento de quase 100% ($P < 0,001$), comparado aos demais grupos (Figura 19).

Figura 19 - Esteatose hepática [Densidade de volume (Vv)] aos seis meses de vida em ambas as gerações F1 e F2



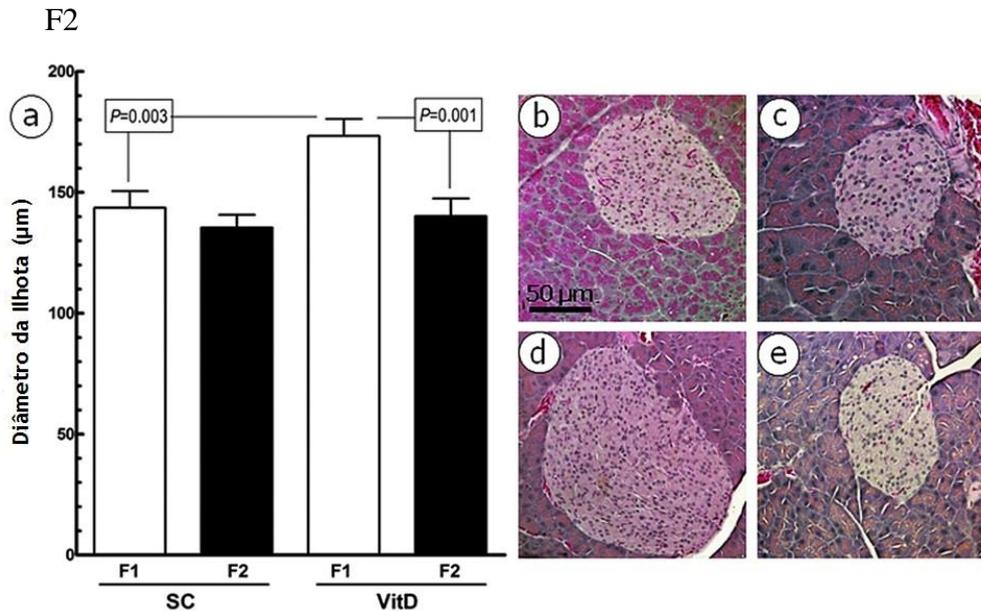
Legenda: a) esteatose hepática. b-e) Fotomicrografias da estrutura hepática corada com hematoxilina-eosina e em mesmo aumento. Os valores são expressos em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.8 Morfometria do pâncreas

A massa do pâncreas aferida, no momento da eutanásia, não apresentou diferença entre os grupos, como apresentado anteriormente pela Tabela 4.

A prole F1-VitD apresentou um aumento de 40% no diâmetro da ilhota pancreática, comparada ao grupo F1-SC ($P < 0,003$). Todavia, a alteração observada não foi transmitida para a geração seguinte, uma vez que a prole F2-VitD (-25% vs F1-VitD; $P = 0,001$) mostrou-se semelhante ao respectivo controle (Figura 20). Tais dados corroboram com os valores de TOTG e HOMA-IR, predizendo um quadro de resistência à insulina.

Figura 20 - Diâmetro da ilhota pancreática aos seis meses de vida em ambas as gerações F1 e F2



Legenda: a) Diâmetro da ilhota pancreática. b-e) Fotomicrografias da ilhota pancreática corada com hematoxilina-eosina e em mesmo aumento. Os valores são expressos em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.9 Western blotting

Os resultados para expressão de proteínas, pelo Western blotting, são expressos em percentual de acordo com o respectivo grupo SC, sendo este considerado 100%. Além disso, todos os dados foram normalizados para a expressão da proteína beta-actina (β -actina), tendo as suas expressões apresentadas inferiormente às expressões das proteínas de estudo. Vale ressaltar que os valores de β -actina não diferiram entre os grupos (dado não apresentado).

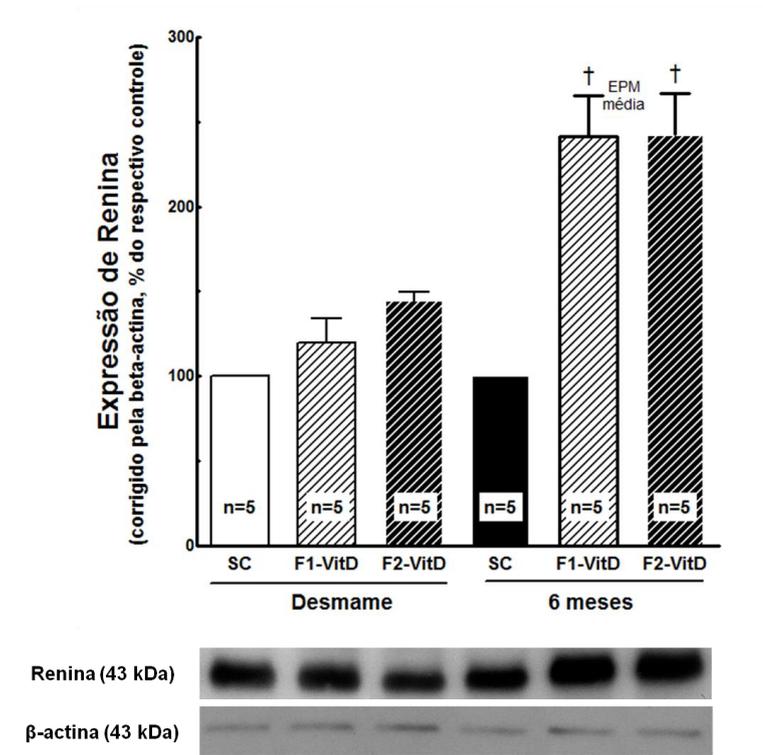
4.9.1 Rim

O tecido renal foi avaliado em diferentes idades para a expressão de algumas proteínas importantes no desenvolvimento ou função renal. São elas: renina, receptor AT1, podocina e WT1, que serão apresentadas, nessa mesma ordem, abaixo.

O SRA foi avaliado pelas proteínas renina e receptor do AT1 (AT1r) e é mostrado nas figuras 21 e 22. Em relação à expressão da renina, aos seis meses de vida, foi significativamente maior que ao desmame, em ambas as gerações provenientes de mães restritas em vitamina D ($P = 0,0003$). Ao desmame, a expressão de renina não foi diferente entre os grupos SC e VitD-, em ambas gerações. A expressão de AT1r aos seis meses de idade

foi significativamente maior que ao desmame, somente na prole F1-VitD- ($P=0,0007$) e somente nesse grupo a expressão foi maior que o grupo SC ($P<0,02$). Contudo, não houve diferença entre as gerações nos grupos F1-VitD- e F2-VitD- ou F1-SC e F2-SC.

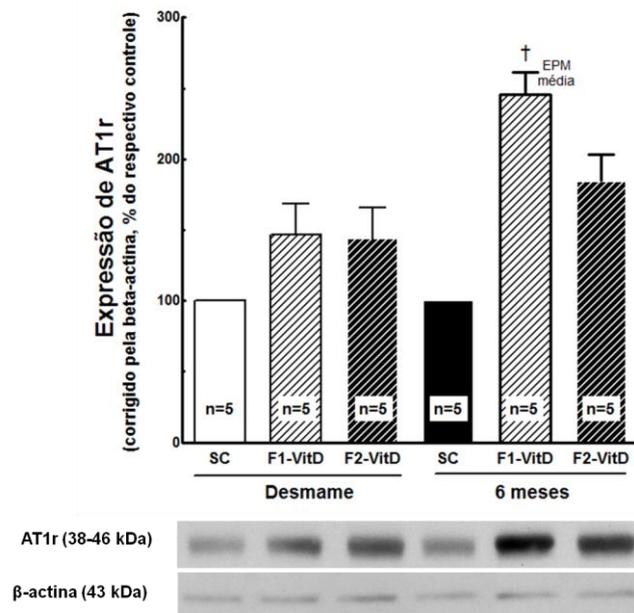
Figura 21 - Análise da expressão de renina pelo Western blotting no tecido renal ao desmame e aos seis meses de vida



Legenda: A média foi calculada e cada grupo foi corrigido para a expressão da proteína beta-actina. Os resultados são expressos em percentual ao respectivo controle, em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P<0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com a F1.

O WT1 é uma proteína importante para o desenvolvimento do glomérulo e desta forma, foi avaliada somente ao nascimento (Figura 24). Nessa idade, não encontramos diferenças entre os grupos ($P>0,05$; two-way ANOVA).

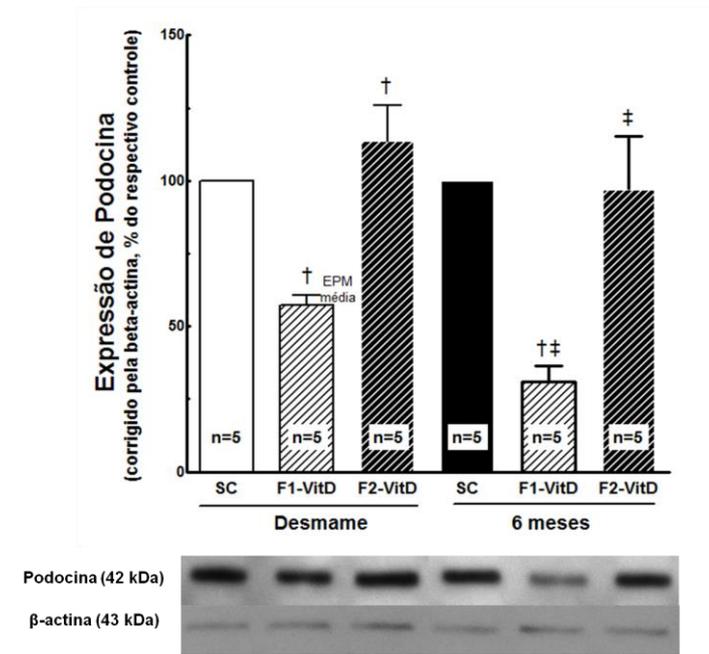
Figura 22 - Análise da expressão do receptor AT1 pelo Western blotting no tecido renal ao desmame e aos seis meses de vida



Legenda: A média foi calculada e cada grupo foi corrigido para a expressão da proteína beta-actina. Os resultados são expressos em percentual ao respectivo controle, em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com a F1.

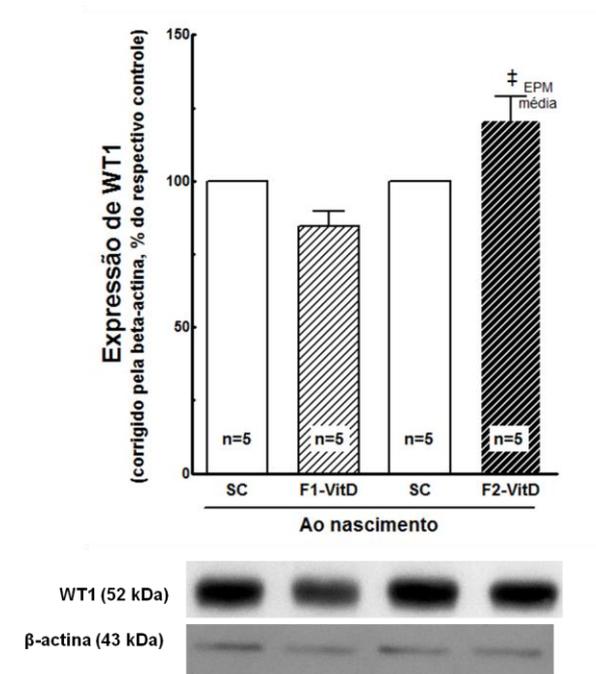
A Figura 23 mostra a expressão da proteína podocina. A prole F1-VitD apresentou, persistentemente, uma menor expressão de podocina ao desmame (-45%; $P = 0,0004$) e (-70%; $P = 0,0004$) aos seis meses de vida. Porém, a restrição de vitamina D não mostrou alteração na geração F2. Além disso, a expressão foi diferente entre os grupos F1-VitD- e F2-VitD- ao desmame ($P = 0,02$) e aos seis meses ($P = 0,004$).

Figura 23 - Análise da expressão de podocina pelo Western blotting no tecido renal ao desmame e aos seis meses de vida



Legenda: A média foi calculada e cada grupo foi corrigido para a expressão da proteína beta-actina. Os resultados são expressos em percentual ao respectivo controle, em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com a F1.

Figura 24 - Análise da expressão de WT1 pelo Western blotting no tecido renal ao nascimento

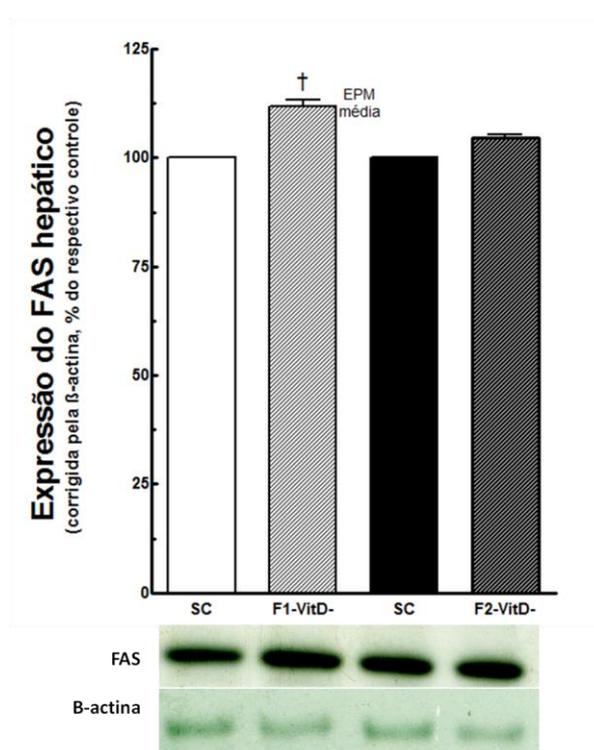


Legenda: A média foi calculada e cada grupo foi corrigido para a expressão da proteína beta-actina. Os resultados são expressos em percentual ao respectivo controle, em média \pm EPM e foram testados com two-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com a F1.

4.9.2 Fígado

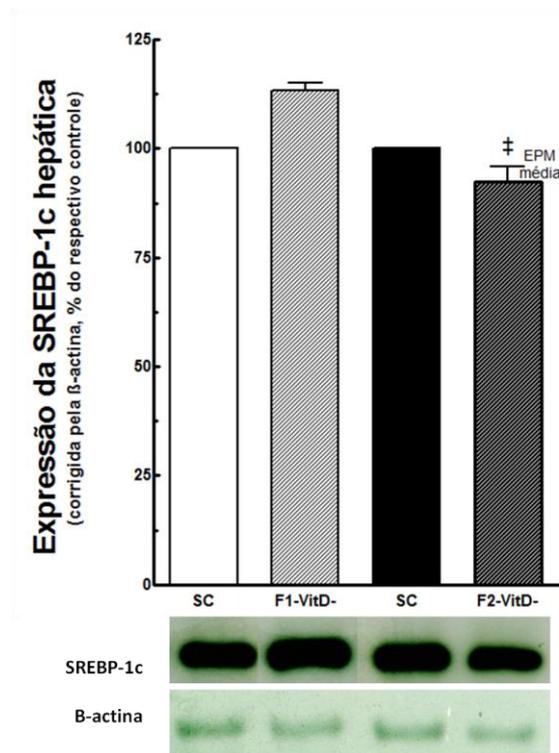
A expressão das proteínas envolvidas na lipogênese hepática, SREBP-1c e FAS, foram analisadas. Aos seis meses de vida, os animais F1-VitD apresentaram não só esteatose hepática, como este resultado veio acompanhado de maior expressão de FAS (+18%; $P=0,006$), comparados aos demais grupos (Figura 25). Ademais, a expressão de SREBP-1c foi reduzida no grupo F2-VitD (-15%; $P=0,016$) em relação ao grupo F1-VitD (Figura 26). Dado esse que corrobora com o resultado estereológico, apresentado anteriormente.

Figura 25 - Análise da expressão do FAS pelo Western blotting no tecido hepático aos seis meses de vida



Legenda: A média foi calculada e cada grupo foi corrigido para a expressão da proteína beta-actina. Os resultados são expressos em percentual ao respectivo controle, em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P<0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com a F1.

Figura 26 - Análise da expressão da SREBP-1c pelo Western blotting no tecido hepático aos seis meses de vida



Legenda: A média foi calculada e cada grupo foi corrigido para a expressão da proteína beta-actina. Os resultados são expressos em percentual ao respectivo controle, em média \pm EPM e foram testados com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). O símbolo † ilustra diferença estatística com o respectivo grupo controle e o ‡ ilustra diferença estatística com a F1.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a deficiência materna de vitamina D em camundongos causou alterações significativas na prole sobre: (I) incremento da massa corporal nas duas gerações, com aumento da adiposidade; (II) elevação da pressão arterial principalmente na geração F1; (III) resistência à insulina somente na geração F1, acompanhada de hipertrofia da ilhota pancreática e esteatose hepática; (IV) aumento na expressão das proteínas lipogênicas hepáticas na geração F1; (V) alteração da morfologia e desenvolvimento renal na prole, em ambas as gerações e (VI) alteração na expressão das proteínas do SRA no rim, assim como da proteína podocina.

A deficiência de micronutrientes durante o desenvolvimento, como por exemplo, a deficiência materna de vitamina D, pode ser considerada importante, uma vez que há relatos de deficiência materna por consumo excessivo de alimentos do tipo “*junk food*”. Além disso, a insuficiência de vitamina D ainda não é totalmente reconhecida e tratada, e estudos recentes mostram que aproximadamente 12% das gestantes da Europa apresentam níveis de insuficiência de vitamina D (Cavalier *et al.*, 2008).

A vitamina D é normalmente estocada no fígado e tecido adiposo e com seis semanas de restrição, os níveis de vitamina D são extremamente reduzidos, sem alterações de cálcio ou fósforo, em roedores (Eyles *et al.*, 2003). Ademais, estudos prévios com roedores mostram que a restrição de vitamina D por esse período assegura a deficiência de vitamina D durante a gestação (Maka *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2010).

É importante colocar também, que a deficiência de vitamina D em humanos, durante o terceiro trimestre da gestação, está relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade na prole (Pasco *et al.*, 2008). Tais relações poderiam ser associadas aos potentes efeitos da vitamina D sobre a adiposidade (Guzey *et al.*, 2004; Venti *et al.*, 2005). É recorrente que a restrição materna de vitamina D pode levar a adiposidade na prole (Bispham *et al.*, 2005), embora os mecanismos não sejam totalmente elucidados (Pasco *et al.*, 2008).

Contudo, a ingestão inadequada de cálcio tem sido associada à obesidade, uma vez que o cálcio parece influenciar a apoptose dos adipócitos. Assim, há uma importante hipótese que coloca a vitamina D como indutor na apoptose de adipócitos maduros via ativação da cascata Ca^{2+} /calpaína/caspase (Sergeev, 2009). Apesar disso, esse mecanismo necessita de novos estudos. No nosso estudo, a avaliação da adiposidade ou gênese dos adipócitos não foi

o foco de estudo e seria especulativo afirmar que os efeitos encontrados ocorrem pela inativação da via exemplificada acima. Porém, nosso estudo abre novas possibilidades para outros experimentos.

É bem discutido na literatura, que o excesso da massa corporal é capaz de alterar o metabolismo, principalmente das lipoproteínas, insulina e glicose (Franssen *et al.*, 2011; Hecker *et al.*, 2011). Ademais, a desregulação na distribuição da massa corporal, como o aumento do percentual de gordura corporal, é um importante determinante no desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Poljicanin *et al.*, 2011). Por exemplo, em humanos a gordura visceral é mais metabolicamente ativa e altera a produção de citocinas inflamatórias, que pode desempenhar efeito no metabolismo hepático de lipídios e carboidratos (Phillips e Prins, 2008). No entanto, em camundongos, o tecido adiposo considerado mais metabolicamente ativo é o epididimário, que é mais sensível a captação de glicose (Virtanen *et al.*, 2005). No presente trabalho, a restrição materna de vitamina D causou não somente um aumento na massa corporal, mas também, aumento na gordura epididimária. Além disso, esses efeitos parecem estar associados com a secreção de insulina e o HOMA-IR, mesmo sem alteração na glicemia plasmática, na geração F1.

Estudos prévios mostram que a resistência à insulina apresenta uma relação próxima com a morfologia da ilhota pancreática (Nascimento *et al.*, 2010; Souza-Mello *et al.*, 2011). É relevante notar que, apesar da elevada massa corporal e massa adiposa na geração F2, este grupo não apresentou resistência à insulina. Porém, a restrição materna de vitamina D causou resistência à insulina com hipertrofia da ilhota pancreática na geração F1. Um mecanismo possível é que a resistência à insulina pode aumentar a massa de célula beta pela hipertrofia ou hiperplasia compensatória (Rafacho *et al.*, 2008; Frantz *et al.*, 2011).

A resistência à insulina tem uma importante associação com a obesidade e com a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), que é diretamente relacionada com a esteatose hepática, e ocorre quando a gordura é depositada no fígado, sem o uso excessivo de álcool (Tailleux *et al.*, 2011). Dados recentes na literatura indicam que a DHGNA pode levar ao desenvolvimento da esteatohepatite não-alcoólica e deve ser considerada como a manifestação hepática da síndrome da resistência à insulina (Aguila *et al.*, 2010).

Todavia, diversas alterações moleculares e fisiológicas ocorrem na gênese da esteatose hepática via resistência à insulina. A principal explicação é a associação do aumento dos ácidos graxos livres (AGL) dos adipócitos para o fígado (Smith e Adams, 2011). Além disso, a síntese *de novo* de AG no fígado é mediada pela transcrição da proteína SREBP-1c, que é uma das isoformas da SREBP-1. No núcleo, a SREBP-1c ativa todos os genes necessários

para a lipogênese (Cortes *et al.*, 2009). Um importante resultado do nosso trabalho foi que a prole restrita em vitamina D na geração F1, comparada aos demais grupos, não apresentou somente aumento do HOMA-IR, mas também esteatose hepática, associada com alta expressão de FAS, que também é uma proteína importante na estimulação da lipogênese via SREBP-1. Por outro lado, a prole restrita na geração F2, não apresentou esteatose hepática e consequentemente teve menor expressão de SREBP-1c comparada à geração F1.

A vitamina D é associada com metabólitos ativos, que compreendem o fluxo de AGL para o fígado. No entanto, a deficiência de vitamina D pode levar ao depósito de AG no fígado. Nesse sentido, a vitamina D regula diretamente o metabolismo dos AGL pelo PPAR-gama, *in vitro* (Frederico *et al.*, 2011). Como consequência, pacientes com doença hepática podem apresentar baixos níveis de vitamina D (Barchetta *et al.*, 2011). No presente estudo, a restrição de vitamina D ocorreu somente no período do desenvolvimento e, como demonstrado, levou a diversas alterações metabólicas tanto no fígado quanto no pâncreas. Assim, o papel da vitamina D materna no desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina e consequentemente, esteatose hepática é realmente de grande interesse e merece outras investigações.

Outro achado interessante do nosso estudo está relacionado às alterações bioquímicas em associação ao incremento da massa corporal. Em humanos, a dislipidemia é normalmente associada com a obesidade e síndrome metabólica, assim como, as doenças coronarianas (Malham *et al.*, 2011). Porém, o camundongo não é o melhor modelo para estudo das dislipidemias, uma vez que os níveis das lipoproteínas estão elevados nesse modelo (Nascimento *et al.*, 2010). No nosso estudo, a prole restrita em vitamina D na geração F1 teve o TG elevado, quando comparada ao respectivo grupo controle. Em contrapartida, a prole F2 teve elevação somente no CT. Assim, como mencionado anteriormente, a resistência central à insulina pode ser um fator contribuinte na hipertrigliceridemia (Franssen *et al.*, 2011) e esta poderia ser uma possível explicação para a geração F2 não ter apresentado alterações do TG, uma vez que não houve resistência à insulina nessa geração.

Por outro lado, em ratos, tem sido observado que a deficiência materna em vitamina D leva ao aumento significativo do número de glomérulos, que é um efeito único e importante da restrição de vitamina D durante o desenvolvimento (Maka *et al.*, 2008). Para entender esse resultado, é necessário enfatizar que, nos roedores, ao contrário dos humanos, a nefrogênese continua após o nascimento até os primeiros dez dias da vida pós-natal e esse período é comparável ao terceiro trimestre gestacional dos humanos (Almeida e Mandarim-de-Lacerda, 2005). Alguns modelos experimentais demonstram que o bloqueio do SRA durante o

desenvolvimento causa mudanças na vascularização glomerular e que isso afeta a maturidade normal do rim. Contudo, a cascata do SRA durante o desenvolvimento renal ainda não é completamente compreendida (Machura *et al.*, 2009; Gubler e Antignac, 2010).

Pesquisas sugerem que a vitamina D desempenha um importante papel na diferenciação e maturação durante a proliferação celular (Dusso *et al.*, 2005) e pode ser considerada como regulador negativo da expressão do gene renina no rim (Maka *et al.*, 2008). No presente estudo as expressões das proteínas do SRA não foram analisadas na fase de desenvolvimento, mas a expressão de renina foi significativamente maior aos seis meses de idade em ambas as gerações F1 e F2, e a expressão do AT1r foi maior na geração F1, comparada ao grupo controle.

Vale ressaltar que a nefrogênese é iniciada e mantida devido a uma série de moléculas regulatórias. O WT1, por exemplo, é expresso no blastema metanéfrico e provavelmente desempenha um importante papel na diferenciação dos podócitos (Burrow, 2000; Ren *et al.*, 2010). No atual trabalho, nenhuma redução significativa foi vista na expressão do WT1 no rim ao nascimento na geração F1, ao contrário do que é observado em outros animais, como os *knock-out* (Pulkkinen *et al.*, 2008). No entanto, a prole F1 apesar de não apresentar redução na expressão do WT1 teve alteração na relação de glomérulos maduros e imaturos, ao nascimento, e a maturação glomerular foi entendida.

A deficiência materna de vitamina D pode contribuir também para o aumento no número de glomérulos, produzindo, como consequência, glomérulos menores quando comparados aos animais de prole não restrita. Aliás, isso pode ser uma possível explicação para a elevação da pressão arterial observada na prole restrita na geração F1 e a forte tendência da elevação da pressão arterial na geração F2. Todavia, estudos anteriores documentaram uma correlação negativa entre o número de glomérulos e a pressão arterial em humanos (Keller *et al.*, 2003) e em roedores (Almeida e Mandarin-de-Lacerda, 2005; Villar-Martini *et al.*, 2009).

Glomérulos menores são menos eficientes e podem causar uma hiperfiltração, que pode alterar a taxa de filtração glomerular (TFG) e até mesmo causar insuficiência renal precoce (Hostetter *et al.*, 2001). Isso é consistente com as altas expressões de renina e AT1r observadas no presente estudo. Além disso, a ativação do SRA pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento dos mecanismos que levam ao dano renal (Candido *et al.*, 2005). Após o dano renal a doença renal crônica progride em um ciclo que passa pela perda de néfrons danificados até a perda de néfrons saudáveis (Candido *et al.*, 2005).

A proteína podocina faz parte do citoesqueleto dos podócitos, formando a fenda de filtração. Assim, mudanças no citoesqueleto dos podócitos podem levar a problemas na TFG (Kreidberg, 2003) e podem também associar-se com a função renal. Em contrapartida, a proteína nefrina é expressada tardiamente no processo de diferenciação glomerular. Além disso, essa proteína é dispensável para a sobrevivência celular e possui um pequeno impacto na regulação gênica durante o desenvolvimento (Done *et al.*, 2008). Desta forma, em nosso estudo, priorizamos a avaliação da proteína podocina, pois embora os animais mais velhos não tenham apresentado proteinúria significativa, a deficiência materna em vitamina D alterou a expressão de podocina na prole F1 restrita, do desmame até os seis meses de idade, mas sem alterar a geração F2.

A questão de como a programação durante o desenvolvimento passa as gerações subsequentes merece atenção. A restrição materna intensa em proteínas, por exemplo, leva a doenças crônicas na vida adulta e afeta ambas as gerações F1 e F2 (Zambrano *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2008), alcançando às vezes a geração F3 (Frantz *et al.*, 2011). Uma explicação parcial parece estar relacionada com a metilação do DNA da prole (Attig *et al.*, 2010). Os mecanismos envolvidos na alteração da metilação do DNA e da expressão do RNA são potenciais candidatos para explicar os efeitos transgeracionais observados (Waterland *et al.*, 2009).

É importante apresentar que este estudo possui algumas limitações. O principal objetivo foi investigar o desenvolvimento e a estrutura renal ao nascimento, 10 dias e vida adulta de animais provenientes da prole de mães restritas em vitamina D, sobre o número de glomérulos, expressão de proteínas do SRA, assim como marcadores do desenvolvimento, tais como a podocina. No entanto, nós procuramos por outras variáveis, como massa corporal, pressão arterial e parâmetros bioquímicos e urinários. De fato, este estudo não foi desenhado para investigar a função renal ou consequências metabólicas, mas sim para tentar responder quando ocorre alterações glomerulares ou a presença de efeitos transgeracionais. Certamente, outros estudos se fazem necessários, principalmente embasados na função renal (incluindo a TFG). Além do mais, a literatura apresenta algumas correlações entre deficiência de vitamina D e desenvolvimento de tecido adiposo, e para esclarecer tais questões, outros estudos podem avaliar este mecanismo, assim como seus efeitos transgeracionais.

CONCLUSÃO

Em conclusão, estes resultados demonstram novas informações sobre a relação entre a deficiência materna de vitamina D e a ocorrência de alterações na prole. A deficiência materna de vitamina D é acompanhada de alterações metabólicas e estruturais no fígado, pâncreas e adiposidade, principalmente na geração F1. Além disso, alterações renais no desenvolvimento, maturação glomerular e prolongamento da nefrogênese, são evidenciadas em ambas as gerações. Porém, as alterações na expressão de proteínas como podocina, renina e AT1r são mais pronunciadas na geração F1.

REFERÊNCIAS

- Aguila MB, Fernandes-Santos C, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. 2010. Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. In: Molière J, Gauthier L, editors. *Insulin resistance: symptoms, causes and treatment*. Hauppauge, NY: Nova Science Pu. p 1-44.
- Alexander BT. Epigenetic changes in gene expression: focus on "The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298:R272-274.
- Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. Quantitative study of the comma-shaped body, S-shaped body and vascularized glomerulus in the second and third human gestational trimesters. *Early Hum Dev* 2002; 69:1-13.
- Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal gestational protein-calorie restriction decreases the number of glomeruli and causes glomerular hypertrophy in adult hypertensive rats. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:945-951.
- Almond K, Bikker P, Lomax M, Symonds ME, Mostyn A. The influence of maternal protein nutrition on offspring development and metabolism: the role of glucocorticoids. *Proc Nutr Soc* 2012; 71:198-203.
- Altschuler EL. Low maternal vitamin D and schizophrenia in offspring. *Lancet* 2001; 358:1464.
- Alwasel SH, Kaleem I, Sahajpal V, Ashton N. Maternal protein restriction reduces angiotensin II AT(1) and AT(2) receptor expression in the fetal rat kidney. *Kidney Blood Press Res* 2010; 33:251-259.
- Angeles-Agdeppa I, Capanzana MV, Li-Yu J, Schollum LM, Kruger MC. High-calcium milk prevents overweight and obesity among postmenopausal women. *Food Nutr Bull* 2010; 31:381-390.
- Annweiler C, Souberbielle JC, Schott AM, de Decker L, Berrut G, Beauchet O. [Vitamin D in the elderly: 5 points to remember]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 2011; 9:259-267.
- Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 2006; 147:S43-49.
- Attig L, Gabory A, Junien C. Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13:284-293.
- Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Jr., Stuebe AM, Boggess KA. First trimester maternal vitamin D status and risk for gestational diabetes mellitus: a nested case-control study. *Diabetes Metab Res Rev* 2011.

Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, Cavallo MG. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med* 2011; 9:85.

Barker DJ. A new model for the origins of chronic disease. *Med Health Care Philos* 2001; 4:31-35.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 2004a; 23:588S-595S.

Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004b; 58:114-115.

Barker DJ, Bagby SP, Hanson MA. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2:700-707.

Bell DS. Protean manifestations of vitamin D deficiency, part 1: the epidemic of deficiency. *South Med J* 2011; 104:331-334.

Bener A, Al-Ali M, Hoffmann GF. High prevalence of vitamin D deficiency in young children in a highly sunny humid country: a global health problem. *Minerva Pediatr* 2009; 61:15-22.

Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell Tissue Res* 1992; 270:37-45.

Bharati DR, Pal R, Kar S, Rekha R, Yamuna TV, Basu M. Prevalence and determinants of diabetes mellitus in Puducherry, South India. *J Pharm Bioallied Sci* 2011; 3:513-518.

Bispham J, Gardner DS, Gnanalingham MG, Stephenson T, Symonds ME, Budge H. Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: differential effects on messenger ribonucleic acid abundance for uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated and prolactin receptors. *Endocrinology* 2005; 146:3943-3949.

Black MJ, Briscoe TA, Constantinou M, Kett MM, Bertram JF. Is there an association between level of adult blood pressure and nephron number or renal filtration surface area? *Kidney Int* 2004; 65:582-588.

Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007a; 92:3517-3522.

Bodnar LM, Simhan HN, Powers RW, Frank MP, Cooperstein E, Roberts JM. High prevalence of vitamin D insufficiency in black and white pregnant women residing in the northern United States and their neonates. *J Nutr* 2007b; 137:447-452.

Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ Res* 2007; 100:520-526.

Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1995; 16:200-257.

Brannon PM. Vitamin D and adverse pregnancy outcomes: beyond bone health and growth. *Proc Nutr Soc* 2012;1-8.

Brannon PM, Picciano MF. Vitamin D in pregnancy and lactation in humans. *Annu Rev Nutr* 2011; 31:89-115.

Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 1999; 277:F157-175.

Burrow CR. Regulatory molecules in kidney development. *Pediatr Nephrol* 2000; 14:240-253.

Candido R, Carraro M, Fior F, Artero ML, Zennaro C, Burrell LM, Davis BJ, Cattin MR, Bardelli M, Faccini L, Carretta R, Fabris B. Glomerular permeability defect in hypertension is dependent on renin angiotensin system activation. *Am J Hypertens* 2005; 18:844-850.

Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, Garland CF, Giovannucci E. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect* 2006; 134:1129-1140.

Cao Z, Liu L, Packwood W, Merkel M, Hurn PD, Van Winkle DM. Sex differences in the mechanism of Met5-enkephalin-induced cardioprotection: role of PI3K/Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H302-310.

Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459:477-485.

Catta-Preta M, Oliveira DA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. *Life Sci* 2006; 80:219-229.

Cavalier E, Delanaye P, Morreale A, Carlisi A, Mourad I, Chapelle JP, Emonts P. [Vitamin D deficiency in recently pregnant women]. *Rev Med Liege* 2008; 63:87-91.

Chang HS, Anway MD, Rekow SS, Skinner MK. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology* 2006; 147:5524-5541.

Clifton-Bligh RJ, McElduff P, McElduff A. Maternal vitamin D deficiency, ethnicity and gestational diabetes. *Diabet Med* 2008; 25:678-684.

Clipp SL, Burke A, Hoffman-Bolton J, Alani R, Liegeois NJ, Alberg AJ. Sun-seeking behavior to increase cutaneous vitamin D synthesis: when prevention messages conflict. *Public Health Rep* 2011; 126:533-539.

Cortes VA, Curtis DE, Sukumaran S, Shao X, Parameswara V, Rashid S, Smith AR, Ren J, Esser V, Hammer RE, Agarwal AK, Horton JD, Garg A. Molecular mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance in the AGPAT2-deficient mouse model of congenital generalized lipodystrophy. *Cell Metab* 2009; 9:165-176.

Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol* 1990; 258:L148-156.

Cui J, Chen H, Huang BR. [The recent progress in the studies of vitamin D receptor]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 2011; 42:95-99.

Cui X, Pelekanos M, Burne TH, McGrath JJ, Eyles DW. Maternal vitamin D deficiency alters the expression of genes involved in dopamine specification in the developing rat mesencephalon. *Neurosci Lett* 2010; 486:220-223.

Davis LM, Chang SC, Mancini J, Nathanson MS, Witter FR, O'Brien KO. Vitamin D insufficiency is prevalent among pregnant African American adolescents. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2010; 23:45-52.

de Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46:4-14.

Diaz L, Noyola-Martinez N, Barrera D, Hernandez G, Avila E, Halhali A, Larrea F. Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *J Reprod Immunol* 2009; 81:17-24.

Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod Toxicol* 2007; 23:297-307.

Done SC, Takemoto M, He L, Sun Y, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K. Nephrin is involved in podocyte maturation but not survival during glomerular development. *Kidney Int* 2008; 73:697-704.

Dotsch J, Plank C, Amann K. Fetal programming of renal function. *Pediatr Nephrol* 2011.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F8-28.

Eyles D, Brown J, Mackay-Sim A, McGrath J, Feron F. Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience* 2003; 118:641-653.

Eyles DW, Feron F, Cui X, Kesby JP, Harms LH, Ko P, McGrath JJ, Burne TH. Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34 Suppl 1:S247-257.

Falkner B, Hulman S, Kushner H. Effect of birth weight on blood pressure and body size in early adolescence. *Hypertension* 2004; 43:203-207.

Farrant HJ, Krishnaveni GV, Hill JC, Boucher BJ, Fisher DJ, Noonan K, Osmond C, Veena SR, Fall CH. Vitamin D insufficiency is common in Indian mothers but is not associated with gestational diabetes or variation in newborn size. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63:646-652.

Fernandes-Santos C, Evangelista Carneiro R, de Souza Mendonca L, Barbosa Aguila M, Mandarim-de-Lacerda CA. Rosiglitazone aggravates nonalcoholic Fatty pancreatic disease in C57BL/6 mice fed high-fat and high-sucrose diet. *Pancreas* 2009; 38:e80-86.

Franssen R, Monajemi H, Stroes ES, Kastelein JJ. Obesity and dyslipidemia. *Med Clin North Am* 2011; 95:893-902.

- Frantz ED, Aguila MB, Pinheiro-Mulder Ada R, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech Ageing Dev* 2011; 132:110-116.
- Frederico MJ, Vitto MF, Cesconetto PA, Engelmann J, De Souza DR, Luz G, Pinho RA, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT. Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46:1381-1388.
- Frolich A, Rudnicki M, Storm T, Rasmussen N, Hegedus L. Impaired 1,25-dihydroxyvitamin D production in pregnancy-induced hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 47:25-29.
- Geary M, Crowley D. The Barker hypothesis. *Ir Med J* 1999; 92:390-391.
- Gezmish O, Tare M, Parkington HC, Morley R, Porrello ER, Bubb KJ, Black MJ. Maternal vitamin D deficiency leads to cardiac hypertrophy in rat offspring. *Reprod Sci* 2010; 17:168-176.
- Gilbert-Diamond D, Baylin A, Mora-Plazas M, Marin C, Arsenault JE, Hughes MD, Willett WC, Villamor E. Vitamin D deficiency and anthropometric indicators of adiposity in school-age children: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 2010; 92:1446-1451.
- Godfrey KM, Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21:199-205.
- Gong J, Savitz DA, Stein CR, Engel SM. Maternal ethnicity and pre-eclampsia in New York City, 1995-2003. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012; 26:45-52.
- Grecksch G, Ruthrich H, Holtt V, Becker A. Transient prenatal vitamin D deficiency is associated with changes of synaptic plasticity in the dentate gyrus in adult rats. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34 Suppl 1:S258-264.
- Gregori S, Giarratana N, Smioldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2002; 51:1367-1374.
- Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal fish oil supplementation benefits programmed offspring from rat dams fed low-protein diet. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:82 e81-87.
- Griffin MD, Kumar R. Effects of 1alpha,25(OH)2D3 and its analogs on dendritic cell function. *J Cell Biochem* 2003; 88:323-326.
- Gubler MC, Antignac C. Renin-angiotensin system in kidney development: renal tubular dysgenesis. *Kidney Int* 2010; 77:400-406.
- Guron G, Friberg P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens* 2000; 18:123-137.
- Guzey M, Jukic D, Arlotti J, Acquafondata M, Dhir R, Getzenberg RH. Increased apoptosis of periprostatic adipose tissue in VDR null mice. *J Cell Biochem* 2004; 93:133-141.

Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35:595-601.

Harrison M, Langley-Evans SC. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. *Br J Nutr* 2009; 101:1020-1030.

Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol* 1997; 154 Suppl:S57-73.

Hecker PA, O'Shea KM, Galvao TF, Brown BH, Stanley WC. Role of adiponectin in the development of high fat diet-induced metabolic abnormalities in mice. *Horm Metab Res* 2011; 43:100-105.

Hellemans K, Kerckhofs K, Hannaert JC, Martens G, Van Veldhoven P, Pipeleers D. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-retinoid X receptor agonists induce beta-cell protection against palmitate toxicity. *FEBS J* 2007; 274:6094-6105.

Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:638S-645S.

Holick MF. Vitamin D deficiency: what a pain it is. *Mayo Clin Proc* 2003a; 78:1457-1459.

Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003b; 88:296-307.

Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81:353-373.

Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980; 210:203-205.

Hollis BW, Wagner CL. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:717-726.

Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1315-1325.

Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, Wang Z. A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int* 1999; 56:1072-1077.

IBGE. 2010. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. In: Pesquisa Dd, editor. Rio de Janeiro. p 150.

Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007; 8:253-262.

Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:582S-586S.

- Karnchanasorn R, Ou HY, Chiu KC. Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels Are Favorably Associated With beta-Cell Function. *Pancreas* 2012.
- Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 2003; 348:101-108.
- Kesby JP, Cui X, Ko P, McGrath JJ, Burne TH, Eyles DW. Developmental vitamin D deficiency alters dopamine turnover in neonatal rat forebrain. *Neurosci Lett* 2009; 461:155-158.
- Kimura Y, Kawamura M, Owada M, Oshima T, Murooka M, Fujiwara T, Hiramori K. Effectiveness of 1,25-dihydroxyvitamin D supplementation on blood pressure reduction in a pseudohypoparathyroidism patient with high renin activity. *Intern Med* 1999; 38:31-35.
- Kreidberg JA. Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:806-814.
- Langley-Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc* 2001; 60:505-513.
- Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr* 1996; 126:1578-1585.
- Lantelme P, Rohrwasser A, Gociman B, Hillas E, Cheng T, Petty G, Thomas J, Xiao S, Ishigami T, Herrmann T, Terreros DA, Ward K, Lalouel JM. Effects of dietary sodium and genetic background on angiotensinogen and Renin in mouse. *Hypertension* 2002; 39:1007-1014.
- Lapillonne A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Med Hypotheses* 2010; 74:71-75.
- Limesand SW, Rozance PJ, Brown LD, Hay WW, Jr. Effects of chronic hypoglycemia and euglycemic correction on lysine metabolism in fetal sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:E879-887.
- Lindgaard ML, Nielsen LB. Maternal diabetes causes coordinated down-regulation of genes involved with lipid metabolism in the murine fetal heart. *Metabolism* 2008; 57:766-773.
- Machura K, Steppan D, Neubauer B, Alenina N, Coffman TM, Facemire CS, Hilgers KF, Eckardt KU, Wagner C, Kurtz A. Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297:F1371-1380.
- Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Karimi F, Shafaei AR, Larijani B. Correlation between vitamin D3 deficiency and insulin resistance in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24:27-32.
- Maka N, Makrakis J, Parkington HC, Tare M, Morley R, Black MJ. Vitamin D deficiency during pregnancy and lactation stimulates nephrogenesis in rat offspring. *Pediatr Nephrol* 2008; 23:55-61.

- Malham M, Jorgensen SP, Ott P, Agnholt J, Vilstrup H, Borre M, Dahlerup JF. Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology. *World J Gastroenterol* 2011; 17:922-925.
- Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol* 2010; 611:211-225.
- Martinez G, Mishina Y, Bertram JF. BMPs and BMP receptors in mouse metanephric development: in vivo and in vitro studies. *Int J Dev Biol* 2002; 46:525-533.
- Martini LA, Catania AS, Ferreira SR. Role of vitamins and minerals in prevention and management of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Rev* 2010; 68:341-354.
- Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005; 48:1247-1257.
- Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:1165-1168.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.
- McGrath J, Selten JP, Chant D. Long-term trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration--data from Australia and the Netherlands. *Schizophr Res* 2002; 54:199-212.
- McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; 85:571-633.
- Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43:1010-1018.
- Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65:1005-1015.
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 2004; 279:52353-52360.
- Mulligan JK, Bleier BS, O'Connell B, Mulligan RM, Wagner C, Schlosser RJ. Vitamin D3 correlates inversely with systemic dendritic cell numbers and bone erosion in chronic rhinosinusitis with nasal polyps and allergic fungal rhinosinusitis. *Clin Exp Immunol* 2011; 164:312-320.
- Mulligan ML, Felton SK, Riek AE, Bernal-Mizrachi C. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202:429 e421-429.
- Murphy SK, Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 2003; 25:577-588.

Muscogiuri G, Sorice GP, Ajjan R, Mezza T, Pilz S, Prioletta A, Scragg R, Volpe SL, Witham MD, Giaccari A. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012.

Nascimento FA, Barbosa-da-Silva S, Fernandes-Santos C, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62:17-25.

Nolan CR. Strategies for improving long-term survival in patients with ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 Suppl 2:S120-127.

Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006; 147:5542-5548.

Novakovic B, Sibson M, Ng HK, Manuelpillai U, Rakyan V, Down T, Beck S, Fournier T, Evain-Brion D, Dimitriadis E, Craig JM, Morley R, Saffery R. Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. *J Biol Chem* 2009; 284:14838-14848.

Pacifico L, Anania C, Osborn JF, Ferraro F, Bonci E, Olivero E, Chiesa C. Low 25(OH)D3 levels are associated with total adiposity, metabolic syndrome, and hypertension in Caucasian children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 2011; 165:603-611.

Pasco JA, Wark JD, Carlin JB, Ponsonby AL, Vuillermin PJ, Morley R. Maternal vitamin D in pregnancy may influence not only offspring bone mass but other aspects of musculoskeletal health and adiposity. *Med Hypotheses* 2008.

Peixoto-Silva N, Frantz ED, Mandarim-de-Lacerda CA, Pinheiro-Mulder A. Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2011; 106:1364-1373.

Phillips LK, Prins JB. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10:156-164.

Pinheiro-Mulder A, Aguila MB, Bregman R, Mandarim-de-Lacerda CA. Exercise counters diet-induced obesity, proteinuria, and structural kidney alterations in rat. *Pathol Res Pract* 2010; 206:168-173.

Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:381-392.

Pires KM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Sci* 2006; 79:2128-2134.

Pittas AG, Dawson-Hughes B. Vitamin D and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121:425-429.

Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2017-2029.

Poljicanin T, Pavlic-Renar I, Metelko Z. Obesity in type 2 diabetes: prevalence, treatment trends and dilemmas. *Coll Antropol* 2011; 35:829-834.

Powe CE, Seely EW, Rana S, Bhan I, Ecker J, Karumanchi SA, Thadhani R. First trimester vitamin D, vitamin D binding protein, and subsequent preeclampsia. *Hypertension* 2010; 56:758-763.

Pulkkinen K, Murugan S, Vainio S. Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis* 2008; 4:55-59.

Rafacho A, Ribeiro DL, Boschero AC, Taboga SR, Bosqueiro JR. Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. *Int J Exp Pathol* 2008; 89:264-275.

Rapuri PB, Kinyamu HK, Gallagher JC, Haynatzka V. Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2024-2032.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.

Ren X, Zhang J, Gong X, Niu X, Zhang X, Chen P. Differentiation of murine embryonic stem cells toward renal lineages by conditioned medium from ureteric bud cells in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010; 42:464-471.

Ritchie LD, Fung EB, Halloran BP, Turnlund JR, Van Loan MD, Cann CE, King JC. A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:693-701.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26:57-60.

Scholl TO, Chen X. Vitamin D intake during pregnancy: association with maternal characteristics and infant birth weight. *Early Hum Dev* 2009; 85:231-234.

Sergeev IN. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces Ca²⁺-mediated apoptosis in adipocytes via activation of calpain and caspase-12. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 384:18-21.

Shahbazi M, Naghdi N, Tahmasebi S, Sheikh M, Namvar Asl N, Kazemnejad A. The effect of iron and zinc dietary restriction of pregnant rats on physical growth of litters. *Biol Trace Elem Res* 2009; 128:232-238.

Shand AW, Nassar N, Von Dadelszen P, Innis SM, Green TJ. Maternal vitamin D status in pregnancy and adverse pregnancy outcomes in a group at high risk for pre-eclampsia. *BJOG* 2010; 117:1593-1598.

Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011; 48:97-113.

Souza-Mello V, Gregorio BM, Relvas-Lucas B, da Silva Faria T, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas* 2011; 40:715-722.

Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: Potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2011.

Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39:419-446, table of contents.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243:47-59.

Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 2011; 91:115-124.

Venti CA, Tataranni PA, Salbe AD. Lack of relationship between calcium intake and body size in an obesity-prone population. *J Am Diet Assoc* 2005; 105:1401-1407.

Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:842-856.

Villar-Martini VC, Carvalho JJ, Neves MF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. *J Hypertens* 2009; 27 Suppl 6:S47-51.

Virtanen KA, Iozzo P, Hallsten K, Huupponen R, Parkkola R, Janatuinen T, Lonnqvist F, Viljanen T, Ronnema T, Lonnroth P, Knuuti J, Ferrannini E, Nuutila P. Increased fat mass compensates for insulin resistance in abdominal obesity and type 2 diabetes: a positron-emitting tomography study. *Diabetes* 2005; 54:2720-2726.

Viteri FE, Gonzalez H. Adverse outcomes of poor micronutrient status in childhood and adolescence. *Nutr Rev* 2002; 60:S77-83.

Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol* 2011.

Waterland RA, Kellermayer R, Rached MT, Tatevian N, Gomes MV, Zhang J, Zhang L, Chakravarty A, Zhu W, Laritsky E, Zhang W, Wang X, Shen L. Epigenomic profiling indicates a role for DNA methylation in early postnatal liver development. *Hum Mol Genet* 2009; 18:3026-3038.

Watkins AJ, Lucas ES, Torrens C, Cleal JK, Green L, Osmond C, Eckert JJ, Gray WP, Hanson MA, Fleming TP. Maternal low-protein diet during mouse pre-implantation development induces vascular dysfunction and altered renin-angiotensin-system homeostasis in the offspring. *Br J Nutr* 2010; 103:1762-1770.

Webb AR, DeCosta BR, Holick MF. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:882-887.

Webb AR, Kift R, Berry JL, Rhodes LE. The vitamin D debate: translating controlled experiments into reality for human sun exposure times. *Photochem Photobiol* 2011; 87:741-745.

Weishaar RE, Simpson RU. Involvement of vitamin D₃ with cardiovascular function. II. Direct and indirect effects. *Am J Physiol* 1987; 253:E675-683.

Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 2004; 134:1299-1302.

Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286:481-486.

Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001; 49:460-467.

Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int* 2004; 65:1339-1348.

Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayoa PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 2006; 571:221-230.

Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Larrea F, Nathanielsz PW. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F₂) of female offspring (F₁) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005; 566:225-236.

Zehnder D, Evans KN, Kilby MD, Bulmer JN, Innes BA, Stewart PM, Hewison M. The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1 α -hydroxylase expression in human placenta and decidua. *Am J Pathol* 2002; 161:105-114.

Zemel MB. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *J Nutr* 2003a; 133:252S-256S.

Zemel MB. Role of dietary calcium and dairy products in modulating adiposity. *Lipids* 2003b; 38:139-146.

Zhou C, Assem M, Tay JC, Watkins PB, Blumberg B, Schuetz EG, Thummel KE. Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 2006; 116:1703-1712.