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

NATANY GARCIA REIS

Efeito da vitamina D na lesão renal aguda provocada por rabdomiólise em ratos

Ribeirão Preto-SP

2018

NATANY GARCIA REIS

Efeito da vitamina D na lesão renal aguda provocada por rabdomiólise em ratos

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

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

Ribeirão Preto-SP

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Natany Garcia

Efeito da vitamina D na lesão renal aguda provocada por rabdomiólise em ratos. Ribeirão Preto, 2018.

70p.:il.

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

Orientadora: Coimbra, Terezila Machado.

1. Vitamina D. 2. Lesão renal aguda. 3. Glicerol. 4. Rabdomiólise. 5. Inflamação. 6. Estresse oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Reis, Natany Garcia. **Efeito da vitamina D na lesão renal aguda provocada por rabdomiólise em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Departamento de Fisiologia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã, minha “vóvinha” e ao meu namorado, com amor e gratidão pelo carinho e compreensão pelas minhas ausências ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus, pela força e luz diária ao longo desta jornada, facilitando o caminho até aqui.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de pós-graduação em Fisiologia por terem me proporcionado a oportunidade de realização deste trabalho.

À Professora Terezila Machado Coimbra por ter aberto as portas do laboratório de Fisiologia Renal, compreendido minhas limitações e pela orientação desse trabalho.

À Heloisa Della Coletta Francescato pela amizade, carinho, paciência e conhecimento passado ao longo destes dois anos. Obrigada por ter me ajudado a me sentir um pouco mais em casa.

À Cleonice Giovanini pela amizade e pela ajuda com os animais e com as técnicas desenvolvidas nesse trabalho.

Aos companheiros de laboratório Lucas, Amanda e Frederico pela presença e pela ajuda direta ou indireta para o desenvolvimento deste projeto.

À Camila de Mattos Faleiros por ter sido luz no momento mais difícil. Obrigada pelo “empurrão”, pelas conversas e pela amizade.

Aos grandes amigos e amigas que ganhei ao longo desse caminho, em especial a Priscila, Fernanda, Heitor, Procópio, Aline e Ana Carolina. Obrigada pelos conselhos e pelo apoio e por terem feito esses dois anos um pouco mais leves.

Ao Leonardo Fidélis Filho, funcionário do biotério deste departamento, pela empatia e ajuda “braçal” com todas as caixas dos animais.

Aos técnicos do Departamento de Patologia da FMRP, Flávio Henrique Leite e Guilherme de Paula Lemos pelas inclusões e cortes dos tecidos renais em parafina.

Às secretárias Cláudia de Barcellos Vanzela e Elisa Maria Aleixo pela atenção, paciência, conversas e conselhos ao longo destes anos.

Aos meus pais Ademir e Fátima e a minha avó Maria que me deram o suporte necessário para que esse mestrado fosse concluído. Obrigada por terem me dado colo nos momentos difíceis e a força para continuar.

À minha irmã Natália por me ajudar a lembrar de que eu sou capaz.

Ao Rinaldo, veterinário do biotério geral, pela ajuda na troca da espécie dos animais e pelo fornecimento dos mesmos.

Aos professores Ana Paula Coelho Balbi, José Antônio Rocha Gontijo e Francisco José Albuquerque de Paula por terem aceito o convite de fazer parte da minha banca de defesa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos animais que possibilitaram a realização desse trabalho.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

REIS, Natany Garcia. **Efeito da vitamina D na lesão renal aguda provocada por rabdomiólise em ratos**. 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A rabdomiólise é uma causa importante de lesão renal aguda (LRA) e decorre da lise das células musculares esqueléticas, com liberação do conteúdo intracelular para o compartimento extracelular e para a circulação. O estresse oxidativo e o processo inflamatório contribui para as alterações da função e estrutura renal que ocorrem na LRA. Estudos recentes tem evidenciado a participação da Vitamina D (Vit. D) no controle do processo inflamatório e do estresse oxidativo. Este estudo avaliou o efeito do tratamento com calcitriol (1,25-dihidroxitivitamina D3) na evolução das alterações de estrutura e função renal, estresse oxidativo e no processo inflamatório renal provocados pela administração de glicerol. Ratos *Wistar Hannover* machos foram tratados com calcitriol (6 ng/dia, s.c., *osmotic pump*) ou veículo (salina 0,9%) por 7 dias, sendo no 3º dia injetados com glicerol (50%; 8ml/kg, i.m.) ou salina (8ml/kg, i.m.). Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle (n=7): receberam veículo s.c. e no 3º dia, injeção i.m de salina; Controle+Vit. D (n=7): receberam calcitriol s.c. e no 3º dia, injeção i.m de salina; Glicerol (n=13): receberam veículo s.c. e no 3º dia, injeção i.m de glicerol; Glicerol+Vit.D (n=10): receberam calcitriol s.c. e no 3º dia, injeção i.m de glicerol. Quatro dias após as injeções foram coletadas amostras de urina, plasma e tecido renal para estudos de função renal, histologia, imunoistoquímica, ELISA e *Western blot*. Os animais do grupo Glicerol tiveram aumento dos níveis plasmáticos de creatinina, redução da taxa de filtração glomerular, aumento da fração de excreção de sódio e redução da osmolalidade urinária comparados com os dos grupos controles. A análise histológica evidenciou aumento da área intersticial relativa e do número de túbulos com necrose no córtex renal dos animais tratados com glicerol. A lesão tubular foi também constatada pelo aumento da expressão de vimentina e PCNA nos animais do grupo Glicerol, em relação aos controles e ao grupo Glicerol+ Vit. D. Essas alterações foram menos intensas no grupo Glicerol+ Vit. D. A expressão de mioglobina estava aumentada no tecido renal de ambos os grupos tratados com glicerol. O estresse oxidativo foi observado pela aumento da expressão de 8-isoprostano nos animais do grupo Glicerol, essa alteração não estava presente nos animais controles e nos animais Glicerol+Vit. D. Ambos os grupos tratados com glicerol tiveram aumento do número de macrófagos, da expressão de NF-κB e dos níveis de IL1-β no córtex renal. Essas alterações foram atenuadas pelo tratamento com Vit. D. O grupo Glicerol apresentou também maior excreção urinária de VDBP, proteína transportadora de Vit. D e menor número de túbulos com bordadura em escova marcados com cubulina, receptor de Vit. D, em comparação aos grupos Controles e Glicerol+Vit. D. Portanto, a redução do receptor e a perda do transportador, reduz a captação de Vit. D nesse modelo, comprometendo a ativação renal de Vit. D e a sua ação no processo inflamatório e no estresse oxidativo no tecido renal. Concluindo, nossos resultados mostram que o tratamento com calcitriol reduziu as alterações de função e estrutura renal provocadas pelo glicerol. Esse efeito estava associado com a diminuição do processo inflamatório e do estresse oxidativo no tecido renal dos animais tratados com Glicerol+Vit. D.

Palavras-chave: Vitamina D, Lesão renal aguda; Glicerol; Rabdomiólise, Inflamação, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

REIS, Natany Garcia. **Effect of vitamin D in acute kidney injury induced by rhabdomyolysis in rats.** 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Rhabdomyolysis provoked by the lysis of skeletal muscle cells can induce acute kidney injury (AKI) with release of intracellular content to the extracellular compartment and circulation. The oxidative stress and the inflammatory process contribute to the changes in renal function and structure in AKI. Recent studies have show the effect of vitamin D (Vit. D) on inflammatory process control and in the oxidative stress. This study evaluated the effect of calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) in the renal function and structure induced by glycerol and its relationship with the inflammatory process and the oxidative stress. Male Wistar Hannover rats were treated with calcitriol (6 ng/day, s.c., administered through an osmotic pump) or vehicle (saline 0.9%) for 7 days, and injected with glycerol (50%; 8ml/kg, i.m.) or saline (8ml/kg, i.m) 3 days after the beginning of this treatment. The animals were divided into 4 groups: Control (n = 7): received vehicle s.c. and on 3rd day after an injection i.m of saline; Control + Vit. D (n = 7): received Calcitriol s.c. and 3rd day after an injection i.m of saline; Glycerol (n = 13): received vehicle s.c and on 3rd day after an injection i.m of glycerol and Glycerol + Vit. D (n = 10): received Calcitriol s.c. and 3rd day after an injection i.m of glycerol. Four days after injections, urine samples, plasma and renal tissue were collected for renal function, histology, immunohistochemistry, ELISA and Western blot studies. Glycerol injected rats presented increase in plasma creatinine levels and sodium fractional excretion, and reduction glomerular filtration rate and urinary osmolality compared to controls groups. Histological analysis showed an increase in the relative interstitial area and in the number of tubules with necrosis in the renal cortex of these animals treated with glycerol. The tubular lesion was also evidenced by increased expression of vimentin and PCNA in the animals of the Glycerol group compared to controls. These changes were less intense in the Glycerol + Vit. D group. The myoglobin expression was increased in the renal tissue of both groups of the animal treated with glycerol. The oxidative stress was observed by the increased expression of 8-isoprostane in the kidneys from Glycerol group. However, this change was not observed in the control and Glycerol + Vit. D treated rats. Both glycerol-treated groups had increased number of macrophages, NF- κ B expression and IL1- β levels in the renal cortex. These changes were less intense in Vit. D treated animals. Glycerol group also presented higher urinary excretion of VDBP and less number of tubules with brush border marked with cubilin (Vit. D receptor) compared to the Control and Glycerol + Vit. D. Therefore, the reduction of the receptor and the loss of the transporter, reduces the uptake of Vit. D in this model, compromising the renal activation of Vit. D and its action in the inflammatory process and oxidative stress in renal tissue. In conclusion, our results show that treatment with calcitriol reduced the changes in renal function and structure caused by glycerol. This effect was associated with decreased inflammatory process and oxidative stress in the renal tissue of animals treated with Glycerol + Vit. D.

Keywords: Vitamin D, Acute kidney injury; Glycerol; Rhabdomyolysis; Inflammation; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação esquemática do protocolo experimental.....	p.33
Figura 2-	Excreção urinária de VDBP (<i>Vitamin D binding protein</i>) por ELISA.....	p.40
Figura 3-	Secções histológicas coradas com Tricrômio de Masson, número de túbulos com necrose e área intersticial relativa cortical.....	p.41
Figura 4-	Imunolocalização e quantificação de vimentina no córtex renal.....	p.42
Figura 5-	Imunolocalização e quantificação de células PCNA-positivas (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>) no córtex renal.....	p.43
Figura 6-	Imunolocalização e quantificação de células ED1-positivas (macrófagos) no córtex renal.....	p.44
Figura 7-	Imunolocalização e quantificação de 8-isoprostano no córtex renal.....	p.45
Figura 8-	Imunolocalização e quantificação de NF- κ B (<i>Factor nuclear kappa B</i>) no córtex renal.....	p.46
Figura 9-	Imunolocalização e quantificação do número de túbulos com bordadura em escova marcada com cubulina no córtex renal.....	p.47
Figura 10-	Expressão de vimentina no córtex renal, avaliada por <i>Western Blot</i>	p.48
Figura 11-	Expressão de PCNA no córtex renal, avaliada por <i>Western Blot</i>	p.48
Figura 12-	Expressão de mioglobina no córtex renal, avaliada por <i>Western Blot</i>	p.49
Figura 13-	Quantificação da concentração de interleucina (IL)-1 β no córtex renal por ELISA.....	p.50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Parâmetros de função renal de ratos dos diferentes grupos.....	p.39
------------------	--	------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-epi-PGF2 α	<i>8-epi-prostaglandin F2 α</i> (8-isoprostano)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CDKIs	<i>Cyclins-dependent kinase inhibitor</i>
Creat	Creatinina
CREB	<i>cAMP responsive elemento binding protein</i>
CTGF	<i>Conective tissue growth factor</i>
DAB	3,3-diaminobenzidina
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRC	Doença renal crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
FENa ⁺	Fração de excreção de sódio
FGF23	<i>Fibroblast growth fator-23</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
i.m	Intramuscular
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IgG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LRA	Lesão renal aguda
MDA	Malondialdeído
MET	<i>Mesenchymal–epithelial transition</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
n	Número
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen</i>
NF- κ B	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NLRP3	<i>Nod-like receptor P3</i>
NO	Óxido nítrico

NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2</i>
NTA	Necrose tubular aguda
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
Pcreat	Creatinina plasmática
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
Prot	Proteína
PUMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
QM	Quilomícron
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBSt	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
Th1	<i>T-helper 1</i>
Th2	<i>T-helper 2</i>
Th22	<i>T-helper 22</i>
Th9	<i>T-helper 9</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Uosm	Osmolalidade urinária
V	Fluxo urinário
VDBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
VDBP _{ur}	Excreção urinária de VDBP
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VDRE	<i>Vitamin D response element</i>
Vit. D	Vitamina D
α -SMA	<i>α-Smooth muscle actin</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	Íon cálcio
Fe^{2+}	Íon ferro
O_2	Íon oxigênio
K^+	Íon potássio
h	Horas
mg	Miligrama
pg	Picograma
°C	Grau Celsius
μm	Micrômetro
ng	Nanograma
dL	Decilitro
ml	Mililitro
%	Porcentagem
Kg	Kilograma
g	Gramas
M	Molar
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
HCl	Ácido clorídrico
rpm	Rotação por minuto
μg	Micrograma
mm^2	Milímetro quadrado
mOsm	Miliosmol
min	Minuto
H_2O	Água

SUMÁRIO

1- Introdução.....	18
1.1) Lesão renal aguda induzida pela rabdomiólise	18
1.2) Efeitos da vitamina D na inflamação, proliferação e diferenciação celular.....	22
 2-Objetivos	28
2.1) Objetivos Gerais	28
2.2) Objetivos Específicos.....	28
 3- Hipótese	30
 4 Material e Métodos.....	32
4.1) Animais e delineamento experimental.....	32
4.2) Avaliação da função renal.....	33
4.3) Excreção urinária de VDBP.....	33
4.4) Estudo histológico e morfométrico	34
4.5) Análise Imunoistoquímica	34
4.6) Análise por <i>Western blot</i>	36
4.7) Quantificação da concentração de interleucina (IL)-1 β em tecido renal	37
4.8) Análise Estatística.....	37
 5- Resultados	39
5.1) Função Renal	39
5.2) Análise da excreção urinária de VDBP.....	39
5.3) Avaliação histológica e morfométrica	40
5.4) Análise imunoistoquímica	41

5.5) Análises por <i>Western Blot</i>	47
5.6) Quantificação de IL-1 β no tecido renal.....	49
6-Discussão	52
7- Conclusão	59
Referências	60
ANEXO A- Protocolo de ética experimental.....	69

1-Introdução

1- Introdução

1.1) Lesão renal aguda induzida pela rabdomiólise

A lesão renal aguda (LRA) provocada pela administração intramuscular (i.m) de glicerol em ratos, é semelhante a necrose tubular aguda (NTA) observada em humanos com rabdomiólise (NATH et al., 1992; ZAGER, 1996). A LRA é caracterizada por uma redução abrupta da função renal, desenvolve em horas ou dias e se mantém por dias ou semanas, resultando na incapacidade dos rins exercerem suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostase hidroeletrolítica do organismo (COSTA; VIEIRA-NETO; NETO, 2003). As alterações funcionais são potencialmente reversíveis, contudo, podem persistir áreas residuais de fibrose.

O termo rabdomiólise se refere a lesão do músculo estriado esquelético, que resulta na liberação dos constituintes das células musculares incluindo eletrólitos, mioglobina e outras proteínas sarcoplasmáticas para o fluido extracelular e para a circulação (BOSCH; POCH; GRAU, 2009; VANHOLDER et al., 2000). A rabdomiólise é geralmente associada com trauma, mas ocorre também em outras condições clínicas e experimentais tais como: alterações bruscas da temperatura corporal, exercício físico extenuante, exposição a toxinas como peçonhas de abelhas ou cobras, compressão muscular prolongada, drogas, defeitos genéticos, desordens eletrolíticas e metabólicas e infecções (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; AZEVEDO-MARQUES; FERREIRA; COSTA, 1992; BOSCH; POCH; GRAU, 2009). Independente da causa de rabdomiólise ser traumática ou não, a LRA é a complicação mais grave e o prognóstico é substancialmente pior se ocorre a lesão renal (BOSCH; POCH; GRAU, 2009).

A rabdomiólise foi descrita a milênios. No velho testamento (Livro dos Números 11:31–35), uma condição com características semelhantes à rabdomiólise é descrita quando os israelitas sofreram uma "praga" durante o êxodo do Egito após o consumo abundante de codornas. Essa condição foi supostamente provocada pela intoxicação com erva cicuta que as codornas consumiam durante a migração na primavera (VANHOLDER et al., 2000). Nos tempos modernos, os primeiros casos de síndrome do esmagamento associados com rabdomiólise e LRA foram relatados durante o terremoto da Sicília em Messina (1908) e na literatura médica militar alemã durante a primeira guerra mundial. Na literatura médica inglesa, Bywaters e Beall (1941), realizaram o primeiro relatório detalhado que mostrava a ligação entre LRA e a síndrome do esmagamento após observarem quatro soldados vítimas do bombardeio em Londres durante a batalha da Grã-Bretanha. Esses soldados desenvolveram LRA e morreram uma semana depois. Nas suas necropsias, foram encontrados cilindros pigmentados nos túbulos renais, que, na época, não puderam ser explicados. O fato da mioglobina estar diretamente envolvida nesse processo,

foi reconhecido três anos depois quando Bywaters e Stead (1944) induziram LRA em ratos pela infusão de mioglobina. Esses estudos experimentais mostraram também que dois fatores críticos predisõem a LRA mioglobinúrica: a hipovolemia e a acidose.

A LRA mioglobinúrica é a complicação mais séria de todas as causas de rabdomiólise e pode ser fatal. Nos Estados Unidos são descritos cerca de 26.000 casos anuais de rabdomiólise, sendo que 85% dos pacientes apresentavam lesões traumáticas (GRAVES; GILLUM, 1997; MOHAUPT, 2003). Estima-se que 10% a 40% dos pacientes com rabdomiólise desenvolvam LRA e que em cerca de 15% de todos os casos, a LRA pode ser consequência da rabdomiólise (KASAOKA et al., 2010; WATANABE, 2001; WATEMBERG et al., 2000). A mortalidade é de aproximadamente 20% naqueles que não desenvolvem lesão renal (MOHAUPT, 2003) e aumenta para 59% quando há o desenvolvimento da LRA (STANLEY; ADIGUN, 2017).

A taxa anual de rabdomiólise no exército americano é de 300 a 400% maior comparado a população em geral (NELSON et al., 2016). No Brasil, não há dados na literatura, entretanto, diante da incidência de casos de rabdomiólise no âmbito da força, o comando do exército aprovou uma portaria (Portaria nº 129, de 11 de março de 2010) para a implantação do programa de prevenção e controle da rabdomiólise induzida por esforço físico e pelo calor (Campanha de prevenção a rabdomiólise, Exército Brasileiro).

Embora as causas de rabdomiólise sejam muitas, a patogênese parece seguir uma via final comum. No miócito, o sarcolema, uma membrana que envolve as fibras musculares, contém numerosas bombas que regulam o gradiente eletroquímico dentro da célula (KHAN, 2009). A concentração de cálcio iônico (Ca^{2+}) extracelular é 10.000 vezes superior à concentração intracelular. Por isso, alterações mínimas na permeabilidade da membrana celular ao Ca^{2+} levam a consequências desfavoráveis para a integridade funcional das células. Por conseguinte, a célula precisa manter a homeostase desse íon com grande precisão. Com este propósito, a membrana celular, a mitocôndria e o retículo sarcoplasmático são equipados com proteínas reguladoras da permeabilidade ao Ca^{2+} , sendo estas bombas e canais (GIANNOGLOU; CHATZIZISIS; MISIRLI, 2007) que mantêm níveis baixos de Ca^{2+} no citoplasma quando o músculo está em repouso e permitem o aumento da concentração do mesmo durante a contração muscular. Esses processos dependem de ATP (*Adenosine triphosphate*) como fonte de energia. A depleção de ATP ocorre na maioria das condições que desencadeiam a rabdomiólise, resultando em disfunção das bombas Na^+/K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase (KHAN, 2009). A redução da atividade da Ca^{2+} -ATPase aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} , o qual interage com as proteínas contráteis mantendo o músculo contraído e culminando em esgotamento das reservas energéticas

de ATP, ativação de proteases e fosfolipases neutras dependentes de Ca^{2+} (ROSA et al., 2005; BOSCH; POCH; GRAU, 2009).

A mitocôndria atua como um reservatório de Ca^{2+} quando a concentração do mesmo no citoplasma é excessivamente aumentada, entretanto, se isso perdura por um longo período, a sobrecarga de Ca^{2+} afeta a estrutura e a integridade funcional da mitocôndria (disfunção da fosforilação oxidativa), comprometendo a produção de ATP. O aumento do Ca^{2+} mitocondrial provoca um aumento na produção de ROS (*Reactive oxygen species*). As ROS transportam na sua órbita exterior um ou mais elétrons desemparelhados, o que as torna substâncias químicas muito reativas, pois têm uma forte tendência a emparelhar seu elétron, provocando oxidação. O organismo humano possui uma abundância de sistemas endógenos antioxidantes, tais como SOD (*Superoxide dismutase*), a catalase e a glutathione redutase. Quando a capacidade antioxidante endógena é reduzida e a produção de ROS aumenta, estabelece-se uma condição chamada de estresse oxidativo (GIANNOGLOU; CHATZIZISIS; MISIRLI, 2007).

O aumento das ROS durante a lesão muscular leva a oxidação das várias biomoléculas da célula, tais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, promovendo alterações estruturais e funcionais das células. Além disso, as ROS induzem mutações em ambos os DNA (*Deoxyribonucleic acid*) nuclear e mitocondrial. A modificação do DNA nuclear conduz a desorganização funcional da célula muscular, ao passo que mutações do DNA mitocondrial, que contém as sequências de codificação para as proteínas da cadeia respiratória, conduz a degeneração estrutural e funcional do sistema de transporte de elétrons, resultando na redução da síntese de ATP (GIANNOGLOU; CHATZIZISIS; MISIRLI, 2007).

O glicerol hipertônico quando injetado no músculo, causa choque osmótico na célula levando a peroxidação lipídica e ao dano oxidativo, sendo portanto bastante utilizado no modelo de LRA induzida por rabdomiólise. A lesão na estrutura da membrana celular induz a entrada de Ca^{2+} . Portanto, o recurso patogênico comum de todos os processos que causam rabdomiólise é uma elevação aguda na concentração citosólica e mitocondrial de Ca^{2+} nas células do músculo afetado, o que desencadeia uma série de eventos que resulta em necrose dessas células (VANHOLDER et al., 2000; ROSA et al., 2005). Com a lise dos miócitos, grandes quantidades de eletrólitos e proteínas como a mioglobina passam para o fluido extracelular e para a circulação (KHAN, 2009).

A mioglobina é composta de globina, uma cadeia de polipeptídios de 135 aminoácidos e um grupo heme. A molécula de heme contém um anel de protoporfirina com um átomo de ferro (Fe^{2+}) central. O peso molecular da mioglobina é de aproximadamente 18 kDa. Essa proteína é encontrada nas células dos músculos cardíaco e esquelético dos mamíferos, onde atua

transportando oxigênio (O_2) para a mitocôndria em condições de baixa pressão parcial de O_2 (GIANNOGLOU; CHATZIZISIS; MISIRLI, 2007). Normalmente, a concentração plasmática de mioglobina é muito baixa (0 a 0,003 mg/dL) (KHAN, 2009) e circula no plasma ligada a globulina, sendo que uma pequena fração dela é filtrada pelo glomérulo. A reabsorção renal de mioglobina é mediada pelos receptores endocíticos megalina e cubulina (GBUREK et al., 2002) sendo em seguida degradada em globina e heme via proteólise (EFSTRATIADIS et al., 2007). A globina é então metabolizada gerando aminoácidos e o heme é degradado em um anel de protoporfirina e um íon Fe^{2+} , que são armazenados na forma de ferritina e podem ser reutilizados pelo organismo (GIANNOGLOU; CHATZIZISIS; MISIRLI, 2007). Quando ocorre a lesão de mais de 100 gramas de músculo estriado esquelético (como no caso da rabdomiólise), a capacidade de ligação da mioglobina às proteínas do plasma é excedida e essa proteína pode precipitar no interior dos túbulos renais causando obstrução e lesão renal (KHAN, 2009). A lesão renal provocada pela mioglobina, resulta da combinação de vários fatores além do efeito direto dessa proteína nas células dos túbulos proximais onde é reabsorvida, tais como: a hipovolemia, a intensa vasoconstrição intra-renal, o estresse oxidativo mediado pelo heme e a obstrução tubular (NATH et al., 1992; ZAGER, 1996). O Fe^{2+} liberado após a metabolização da mioglobina no rim reage com o peróxido de hidrogênio (reação de Fenton), gerando ROS que danificam a integridade da célula tubular renal. Estudos também mostram que a mioglobina por si só pode exibir atividade de enzima peroxidase, levando a oxidação não controlada de biomoléculas e peroxidação lipídica (BOSCH; POCH; GRAU, 2009). A lesão muscular induz também a ativação de várias citocinas que irão desencadear o estresse oxidativo, a inflamação e intensificar a vasoconstrição (BELLIERE et al., 2015; SOARES et al., 2007; ZAGER, 1996)

A lesão muscular leva a liberação de vários fatores que aumentam a permeabilidade vascular, como consequência há extravasamento de líquido do compartimento intravascular para o intersticial levando a hipovolemia. A depleção de volume intravascular leva a redução da taxa de filtração glomerular (TFG) por promover a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), do sistema nervoso simpático e liberação do hormônio antidiurético. Estudos experimentais também mostram que outros mediadores vasculares contribuem na redução do fluxo sanguíneo renal, incluindo a endotelina 1, tromboxano A₂, TNF- α (*Tumor necrosis factor-alpha*), F2 isoprostanos (HOLT et al. 1999; HOLT; MOORE, 2001) e a redução do NO (óxido nítrico). A mioglobina pode atuar como um depurador intracelular de NO, regulando seu nível no músculo esquelético e cardíaco, protegendo dessa forma a respiração mitocondrial que é prejudicada pelo aumento de NO (ASCENZI; BRUNORI, 2001).

A redução do volume plasmático ativa mecanismos que promoverão maior reabsorção de sódio e água, aumentando a concentração intratubular de mioglobina. Em pH ácido, como nos segmentos distais do nefro, a mioglobina forma um complexo com a proteína uromodulina (anteriormente chamada de *Tamm-Horsfall*) formando cilindros e obstruindo os túbulos renais (OKEN; ARCE; WILSON, 1966).

1.2) Efeitos da vitamina D na inflamação, proliferação e diferenciação celular

Durante a ruptura das células musculares, componentes fosfóricos inorgânicos e orgânicos são dissolvidos na corrente sanguínea, o que conduz a hiperfosfatemia (GIANNOGLOU; CHATZIZISIS; MISIRLI, 2007). O aumento dos níveis plasmáticos de fosfato inibe a expressão da enzima 1 α -hidroxilase, enzima importante na síntese de Vit. D (BOSCH; POCH; GRAU, 2009). Além disso, a Vit. D inativa é reabsorvida e ativada no túbulo proximal, portanto a lesão desse segmento provocada pela reabsorção de mioglobina, irá reduzir a síntese de Vit. D ativa. A Vit. D é um pré-hormônio obtido pela dieta e principalmente pela sua síntese na pele durante a exposição solar (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). Estima-se que aproximadamente 30% da população mundial sejam deficientes em Vit. D (níveis séricos de calcidiol < 20 ng/ml) e que 60% sejam insuficientes (níveis séricos de calcidiol entre 21 e 29 ng/ml) (DALY et al., 2012). Embora esta vitamina seja essencial para o metabolismo do osso e do fosfato, estudos recentes têm mostrado a importância da mesma para o funcionamento de diversos sistemas (HOLICK, 2017), atuando na multiplicação, diferenciação e imunomodulação (de BRAGANÇA et al., 2015).

Desde 1980, a perspectiva de como a Vit. D influencia a saúde humana mudou com base no achado de que há pelo menos 800 genes humanos para os quais existe um elemento responsivo para a Vit. D [*Vitamin D response element* (VDRE)] (HEANEY, 2008; HOLICK, 2007). Além disso, o VDR (*Vitamin D Receptor*) e a enzima 1- α -hidroxilase são expressos em muitos tipos de células que não estão envolvidas no metabolismo ósseo e mineral, como intestino, pâncreas, próstata e células do sistema imunológico (HOLICK, 2010; BATTAULT et al., 2013). A síntese extra-renal do metabólito ativo de Vit. D por células imunes e tecidos periféricos está relacionada com imunorregulação semelhante às citocinas localmente ativas (HEWISON, 2010; ADAMS; HEWISON, 2010). Tem sido constatado também que a incidência de certas doenças crônicas não-ósseas, como câncer e infecções crônicas, estão fortemente correlacionada com a latitude e, portanto, menor síntese cutânea de Vit. D (HEANEY, 2008; HOLICK, 2007).

A Vit. D é composta por um grupo de esteróis produzidos pela ação da luz ultravioleta (comprimento de onda de 290-310 nanômetros) sobre as provitaminas ergosterol (plantas) e 7-

deidrocolesterol (animais). O 7- deidrocolesterol é sintetizado no fígado e encontra-se na pele. Os produtos da reação fotolítica são o ergocalciferol (Vit. D₂) e o colecalciferol (Vit. D₃). Ambos são transportados no plasma pela VDBP (*Vitamin D binding protein*), uma globulina glicosilada de 58 kDa responsável por transportar metabólitos de Vit. D através da circulação. No fígado, são convertidos em uma série de derivados hidroxilados pela ação da enzima 25-hidroxilase em 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃; calcidiol). O rim possui uma participação fundamental na reabsorção e ativação da Vit.D (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). O complexo calcidiol/VDBP é filtrado pelos glomérulos e posteriormente se liga aos receptores megalina e cubulina presentes na borda em escova da membrana apical das células dos túbulos proximais e são reabsorvidos por processo de endocitose. A ativação da Vit. D ocorre nas mitocôndrias dos túbulos proximais, onde o calcidiol é novamente hidroxilado pela ação da enzima 1 α -hidroxilase, formando o composto ativo 1 α -,25-di-hidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃; calcitriol). Essa via renal possui um alto grau de complexidade, sendo regulada por diversos fatores, entre eles, o paratormônio, o fósforo e o FGF-23 (*Fibroblast growth factor-23*) (NYKJAER et al.1999, HOLICK, 2007). A Vit. D₃ também pode ser encontrada na dieta, embora em proporções bem menores e sua absorção está associada a de outras gorduras, sendo transportada para o fígado em quilomícrons (QM). No fígado, a Vit. D₃ é liberada dos QM e hidroxilada formando o calcidiol que posteriormente seguirá para o rim onde será convertido em calcitriol. O calcitriol é o metabólito da Vit. D mais potente sendo transportado no plasma ligado à VDBP (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

Uma vez que o receptor para o complexo VDBP/calcidiol está presente nas células tubulares proximais, a lesão desse segmento irá provocar perda de VDBP na urina (VDBP_{ur}). O estudo de Doorenbos et al. (2012) mostrou que a VDBP_{ur} estava elevada em pacientes com doença renal crônica (DRC). Em indivíduos diabéticos, VDBP_{ur} é aumentada em comparação aos não-diabéticos, especialmente quando há albuminúria (THRAILKILL et al., 2011). O estudo de Mirkovic et al. (2013) mostrou que ocorre excreção maciça de VDBP_{ur} em ratos seis semanas após a injeção de adriamicina.

O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares e funciona como um fator de transcrição induzido pelo ligante (MCKENNA; O'MALLEY, 2002). A ligação do calcitriol ao domínio de ligação ao ligante do receptor VDR induz uma alteração conformacional no receptor e a dimerização com os receptores do retinóide X. Os heterodímeros resultantes se ligam então aos VDRE no DNA para estimular a expressão gênica (ação genômica clássica). Embora a regulação direta da expressão gênica pelo VDR dependa da presença de VDRE nos promotores dos genes alvos, alguns genes regulados pelo calcitriol não contêm VDRE em seus promotores e

acredita-se que são regulados indiretamente. Assim, o VDR não só pode afetar a expressão gênica por ligação ao VDRE, mas também pode regular outras expressões genéticas associando-se a vários fatores de transcrição (SHAH et al., 2006).

A deficiência de Vit. D está associada com câncer, hipertensão, diabetes e doença cardiovascular e é uma das principais manifestações da DRC (RAVANI et al., 2009). Vários mecanismos estão envolvidos na redução dos níveis de calcitriol no decurso da doença renal. A diminuição da massa renal com consequente redução da TFG irá limitar as quantidades de 1α -hidroxilase e o fornecimento de substrato para a mesma, limitando a capacidade do rim de produzir calcitriol. Isso pode ser agravado pelo aumento de FGF-23 que é frequente em pacientes com doença renal. Estudos demonstraram que o FGF-23 pode diminuir os níveis de calcitriol e induzir uma redução dose-dependente do mRNA (*Messenger ribonucleic acid*) da 1α -hidroxilase, limitando a capacidade renal de manter os níveis de calcitriol na doença renal progressiva (SHIMADA et al., 2004). Além disso, a atividade dessa enzima pode ser diretamente inibida pela hiperfosfatemia (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005).

A Vit. D modula negativamente o SRAA e há relação inversa entre os níveis de Vit. D e a pressão arterial. Li et al. (2004) observaram que a administração de calcitriol promoveu redução da síntese de renina, enquanto que a inibição da produção de calcitriol, levou ao aumento da expressão de renina. A secreção de renina pelas células granulares é controlada pela via de sinalização do cAMP (*Cyclic adenosine monophosphate*) sendo que a Vit. D atua, ao prevenir a ligação do CREB (*cAMP responsive element binding protein*) ao gene promotor da renina.

Outro papel importante da Vit. D é a regulação da via do NF- κ B (*Factor nuclear kappa B*). O NF- κ B refere-se a um grupo de fatores de transcrição que modulam os genes envolvidos na resposta imune como no processo de inflamação e fibrose, que contribuem para a evolução da DRC. Ativação do NF- κ B desencadeia uma cascata de eventos que produzem citocinas, quimiocinas e outros fatores inflamatórios que exacerbam a lesão tecidual. Foi constatado a existência de uma relação inversa entre os níveis séricos de Vit. D e o grau de inflamação do tecido em vários tipos de doença renal (LI, 2011; ZHANG et al., 2008). A Vit. D modula ainda diversas citocinas inflamatórias, atenuando a expressão das pró-inflamatórias e aumentando a expressão das anti-inflamatórias (ZHANG et al., 2008). Cantorna (2011) observou em estudos realizados *in vitro* que o tratamento de células T com calcitriol ou análogos inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias Th (*T-helper*) 1 [IL (Interleucina)2, TNF- α , IFN- γ (*Interferon-gamma*)], Th9 (IL9) e Th22 (IL22) e promove a produção de citocinas Th2 anti inflamatórias (IL3, IL4, IL5, IL10).

Em modelo de nefropatia provocada pela ligadura do ureter, Tan, Li e Liu (2006) observaram que o tratamento com Vit. D, reduzia acentuadamente a fibrose tubulointersticial, inibindo a produção, acúmulo de componentes da matriz e suprimindo a expressão do gene do TGF- β 1 (*Transforming growth factor-beta 1*). A superfamília TGF- β compreende citocinas pleiotrópicas que regulam a sinalização via SMAD e não-SMAD (HELDIN; MIYAZONO; TEN DIJKE, 1997). A transdução de sinal de TGF- β -SMAD é conhecida por estar envolvida na fibrose tecidual, incluindo a fibrose renal. Estudos têm mostrado que a ligação do calcitriol ao VDR inibe especificamente a transdução de sinal de TGF- β -SMAD através da interação direta com a SMAD3. Em modelos de ratos de fibrose tecidual, o tratamento com calcitriol impediu a fibrose renal através da supressão da transdução de sinal dessa via (ITO et al., 2013).

O calcitriol está envolvido também na regulação de vários processos celulares, entre eles na regulação da proliferação e diferenciação celular (LI, 2011). Uma das primeiras manifestações desse efeito foi em um estudo realizado com a linhagem de células de leucemia promielocítica humana (HL-60). O tratamento com doses fisiológicas de calcitriol suprimiu o crescimento celular e induziu a diferenciação monocítica (BAR-SHAVIT et al., 1983). O calcitriol induziu aumento na expressão das CDKIs (*Cyclins dependent kinase inhibitor*) p27 e p21 em várias linhas celulares de câncer. Esses CDKIs parecem ser os reguladores mais importantes da parada das células na fase G0/G1 do ciclo celular mediada pela Vit. D (MUNKER et al., 1996; CAMPBELL et al., 1997).

Vários estudos vem mostrando a participação da Vit. D em modelos experimentais de doenças renais. De Bragança et al. (2015) mostraram que a deficiência de Vit. D intensifica a LRA induzida por isquemia/reperfusão (I/R). Esses animais apresentaram uma redução maior da função renal, aumento da excreção urinária de proteínas, lesões tubulares mais intensas e maior infiltração de linfócitos no tecido renal comparado aos animais com níveis normais de Vit. D submetidos à I/R renal. Makibayashi et al. (2001) e Panichi et al. (2001) mostraram que a administração de um análogo da Vit. D previne a albuminúria, acúmulo de matriz, infiltração inflamatória e apoptose em ratos com modelo de glomerulonefrite anti-Thy-1. Park et al., (2012) constataram que o calcitriol prevenia a inflamação e a lesão renal provocada pela gentamicina e a apoptose e proliferação celular induzida pela cisplatina. Os podócitos são conhecidos por expressarem receptores de Vit. D (STUMPF et al., 1979; STUMPF et al., 1980) e tem sido reconhecidos como mediadores importantes na progressão da lesão glomerular (KRIZ; LEMLEY, 1999; MUNDEL; SHANKLAND, 2002). A redução do número de podócitos observada em ratos submetidos à nefrectomia 5/6 foi atenuada após o tratamento com calcitriol (KUHLMANN et al., 2004). Contudo, não existem ainda relatos sobre o efeito do calcitriol na

LRA provocada pela rabdomiólise, modelo este que é mais complexo e envolve diferentes mecanismos relacionados com a NTA, inflamação, regeneração e fibrose renal.

2-Objetivos

2-Objetivos

2.1) Objetivos Gerais

Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol (a forma ativa de Vit. D) na evolução das alterações de estrutura e função renais provocadas pelo glicerol e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo.

2.2) Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol nas alterações da função renal (TFG, osmolalidade urinária e da fração de excreção de sódio) em ratos provocadas pela administração de glicerol.
- Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol nas alterações de estrutura renal provocadas pelo glicerol.
- Analisar o efeito do tratamento com calcitriol no estresse oxidativo, processo inflamatório e proliferação celular nos rins de ratos lesados pelo glicerol.
- Analisar o efeito do tratamento com calcitriol na expressão de cubulina no tecido renal e na excreção urinária de VDBP nos ratos tratados com glicerol.

3-Hipótese

3- Hipótese

A injeção i.m de glicerol em ratos provoca hipovolemia e liberação de mioglobina pelas células musculares e outras substâncias tóxicas, podendo desencadear LRA. Em humanos a rabdomiólise é uma das principais causas de LRA. Contudo, a Vit. D ativa (Calcitriol) está reduzida nessa condição devido a hiperfosfatemia e a lesão das células dos túbulos proximais pela mioglobina. A Vit. D está envolvida na modulação do gene da renina, na inflamação e nos processos de multiplicação, diferenciação e regeneração celular, eventos importantes na evolução da LRA. Portanto, a administração de calcitriol poderá prevenir ou atenuar a LRA induzida pela rabdomiólise reduzindo o estresse oxidativo, o processo inflamatório renal e promovendo a diferenciação e regeneração das células tubulares nesses animais.

4-Material e Métodos

4 Material e Métodos

4.1) Animais e delineamento experimental

Ratos machos *Wistar Hannover*, de 180-200 gramas de peso, provenientes do Biotério Central do campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP em ambiente com temperatura e ciclo de luz controlados (22°C; 12 h claro/12 h escuro). Esses animais receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos quatro animais por caixa. Os experimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo (FMRP-USP), sob protocolo de número 186/2016 (**Anexo A**).

A LRA foi induzida pela injeção i.m. de glicerol a 50% (Sigma Chemical Company, St Louis, USA), diluído em solução de NaCl 0,9%, 8 ml/kg, dividido em cada coxa. Os animais controles receberam injeção de NaCl 0,9% pela mesma via. Os ratos permaneceram sem acesso a água por um período de 24 h antes e 1 h após as injeções. Parte destes animais recebeu Vit. D (6 ng/dia, Abbott, Chicago, USA) e a outra parte, o veículo (solução de NaCl 0,9%) através de *mini-osmotic pumps* (Model 2001, Alzet, Cupertino, CA) implantados subcutaneamente no dorso do animal sob anestesia com Isoflurano (Cristália, Itapira, Brasil). O tratamento com Vit. D foi iniciado três dias antes da administração de glicerol e continuou até o quarto dia após as injeções i.m. Os animais foram assim divididos em quatro grupos:

- **Controle** (n=7): receberam *mini pump* com o veículo (NaCl 0,9%) e no 3º dia, injeção i.m de NaCl 0,9% (8ml/kg);
- **Controle+Vit. D** (n=7): receberam *mini pump* com calcitriol (6 ng/dia) e no 3º dia, injeção i.m de NaCl 0,9% (8ml/kg);
- **Glicerol** (n=13): receberam *mini pump* com o veículo (NaCl 0,9%) e no 3º dia, injeção i.m de glicerol a 50% (8ml/kg);
- **Glicerol+Vit.D** (n=10): receberam *mini pump* com o calcitriol (6 ng/dia) e no 3º dia, injeção i.m de glicerol a 50% (8ml/kg).

No terceiro dia após as injeções i.m. de salina ou glicerol, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta da urina de 24 h e no 4º dia foram anestesiados com Thiopental sódico (0,1ml/100g, Cristália, Itapira, Brasil) e a artéria abdominal canulada para a coleta de sangue. Um dos rins foi retirado e fixado em Methacarn (metanol à 60%, clorofórmio à 30%, e

ácido acético à 10%) para estudo histológico e imunoistoquímico e o outro perfundido com PBS [*Phosphate buffered saline* (NaCl 0,15 M e tampão PO_4 , pH=7,4)], sendo utilizado para os estudos de Western blot e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). A urina da bexiga foi coletada para determinação de VDBP por ELISA (**Figura 1**).

Figura 1: Delineamento experimental

4.2) Avaliação da função renal

A função renal foi avaliada utilizando as amostras de sangue e urina coletadas após quatro dias da administração de glicerol ou salina. O volume urinário dos animais foi mensurado em proveta graduada, após coleta de urina de 24 h. As amostras de 24 h de urina e de plasma foram utilizadas para as dosagens de creatinina para avaliação da TFG, osmolalidade urinária e fração de excreção de sódio. A creatinina plasmática e urinária foi determinada utilizando um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) pelo método colorimétrico tendo como cromógeno o ácido pícrico. O sódio urinário e plasmático, foi analisado pela técnica de quantificação por eletrodos de íons seletivos (9180 Electrolyte Analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A osmolalidade urinária foi determinada em osmômetro (The Advanced Osmometer, Model 3250; Advanced Instruments, Norwood, EUA), pelo método de abaixamento do ponto de congelamento.

4.3) Excreção urinária de VDBP

As amostras de urina coletadas diretamente da bexiga quatro dias após a administração de glicerol ou salina foram tratadas com PMSF 1mM (fluoreto de fenilmetilsulfonil, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) e estocadas à -70 °C. A quantificação de VDBP foi realizada por ELISA usando kit comercial (Alpco, Keewaydin Drive, Salem). As amostras de urina dos

animais foram diluídas 1:200 e 1:1500 para animais controles e experimentais, respectivamente. Os valores de VDBP foram expressos em ng/mg de creatinina.

4.4) Estudo histológico e morfométrico

O rim esquerdo dos animais dos grupos controles e experimentais foi retirado e fixado em solução de Methacarn durante 24h. Após esse período, a solução foi substituída por álcool 70%. Esse tecido foi então incluído em parafina, realizadas secções de 3 µm, corados com Tricrômico de Masson e examinados sob microscopia de luz. O acometimento túbulo intersticial do córtex renal foi avaliado pela determinação da área intersticial relativa e pelo número de túbulos com necrose em 30 campos/rim. A área intersticial foi circundada manualmente e determinada por morfometria computacional (Axion versão 4.8.3, Zeiss, Alemanha) e os valores médios foram calculados por rim.

4.5) Análise Imunoistoquímica

Cortes histológicos foram colocados em três banhos consecutivos de xilol para a eliminação da parafina e em seguida colocados em três banhos de álcool em concentrações decrescentes para a hidratação do corte. As lâminas foram então incubadas por 10 min em solução contendo azida sódica à 10% e água oxigenada à 30% para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Logo após, foram lavadas em PBS por 5 minutos e os cortes incubados com os seguintes anticorpos primários:

- **Anti-ED1:** monoclonal (Serotec, Oxford, UK), incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (1:1000). Este anticorpo reage especificamente com o antígeno presente no citoplasma de macrófagos e monócitos.
- **Anti- Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA):** monoclonal (Sigma Chemical Company, St Louis, USA), incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (1:1000). Este anticorpo reage com antígenos presentes nos núcleos de células que estão em fase de proliferação.
- **Anti-Vimentina:** monoclonal (Dako, Glostrup, Dinamarca), incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (1:500). Este anticorpo é um marcador de lesão da célula tubular. As células tubulares renais só expressam esse antígeno quando estão em fase de proliferação.

- **Anti-Cubulina:** policlonal (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (1:1500). A cubulina é um receptor endocítico envolvido na reabsorção de Vit D.
- **Anti-Fator nuclear kappa B (NF-κB):** policlonal (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), incubação overnight a -4°C (1:80). Este anticorpo reage com a subunidade p65 do NF-κB.
- **Anti-8-epi-prostaglandina F2α (8-epi-PGF2 α ou 8-Isoprostano):** policlonal (Oxford Biomedical Research, Oxford, UK), incubação overnight a -4°C (1:500). Os isoprostanos são marcadores de estresse oxidativo.

Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina (IgG) produzido em camundongo (1:200) (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) para as reações de vimentina, ED1 e PCNA, coelho (1:400) (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) para NF-κB ou cabra (1:400) (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) para 8-isoprostano e cubulina, por 30 min à temperatura ambiente. O produto da reação foi detectado usando um complexo de avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) e a cor foi revelada com DAB [3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Company, St Louis, EUA)] e cloreto de níquel, na presença de peróxido de hidrogênio. A contra-coloração foi realizada com *methylgreen* com exceção da marcação para NF-κB que foi revelada somente com DAB e contra-corada com hematoxilina. Também realizamos estudos imunohistoquímicos para NF-κB usando fatias sem contra-coloração, a fim de verificar a presença de marcação no núcleo. O material foi então desidratado e montado. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela diluição dos anticorpos primários e secundários em uma solução de PBS contendo BSA 1% [*Bovine serum albumin* (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)].

Os resultados das reações imunoistoquímicas para ED1 e PCNA foram avaliados pela contagem de células positivas do córtex renal. Enquanto que, as reações para vimentina, 8-isoprostano e NF-κB foram avaliadas analisando-se a porcentagem do córtex renal marcado utilizando o software NIH ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, EUA). A reação para cubulina foi avaliada pela contagem do número de túbulos com bordadura em escova marcada com cubulina no córtex renal. Foram avaliados 30 campos consecutivos do córtex renal de cada animal e determinado a média para cada rato da porcentagem de área marcada, número de células ou túbulos por campo (0,1 mm²).

4.6) Análise por *Western blot*

As expressões de vimentina, PCNA e mioglobina foram avaliadas por *Western blot* nas amostras de tecidos do córtex renal dos animais, coletadas quatro dias após a administração de glicerol ou salina. As amostras foram homogeneizadas com tampão de lise: Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), Triton X-100 (1%), SDS; 0,1% (dodecil sulfato de sódio), aprotinina (1 µg/mL), leupeptin (1 µg/mL), fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 mM), ortovanato de sódio (1 mM, pH 10), pirofosfato de sódio (1 mM), fluoreto de sódio (25 mM), EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético 0,001 M, pH 8) e centrifugadas à 4 °C por 15 minutos à 10000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford. Essas amostras foram guardadas à -70°C.

Amostras contendo 30 µg de proteína foram solubilizadas em tampão de amostra: Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8), glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol; aquecidas à 100 °C por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida à 15% para mioglobina e 10% para as reações de PCNA e vimentina. As amostras contendo as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, sendo as membranas incubadas por 2 h em 50 mL de tampão de bloqueio [TBSt (*Tris Buffered Saline with Tween*): trizma base (0,05 M), NaCl (0,15 M), tween 20 (pH 7,6) e leite desnatado (5%)]. Em seguida, as membranas foram lavadas em tampão TBSt e incubadas overnight à 4 °C com os anticorpos primários: anti-vimentina [monoclonal (1:1500), Dako, Glostrup, Dinamarca], anti-PCNA [monoclonal (1:1000), Sigma Chemical Company, St Louis, USA] e anti-mioglobina [monoclonal (1:200), Santa Cruz Biotechnology, CA, USA] e como proteína de referência a GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) [monoclonal, (1:1000), Cell Signaling Technology, Danvers, EUA]. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBSt e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (1:10000; Dako, Glostrup, Dinamarca) por 1 h em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente e o resultado da reação detectado pelo *Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Chemical, Rockford, EUA) e capturado por programa de imagem (Molecular Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, EUA). A análise da densitometria das bandas foi realizada pelo programa NIH Image J software (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, EUA) e os resultados expressos como porcentagem em relação à média do grupo Controle, que foi indicado como 100%.

4.7) Quantificação da concentração de IL-1 β em tecido renal

Fragmentos do córtex renal dos animais foram homogeneizados em tampão de lise: Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), Triton X-100 (1%), SDS; 0,1%, aprotinina (1 μ g/mL), leupeptin (1 μ g/mL), fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 mM), ortovanato de sódio (1mM, pH 10), pirofosfato de sódio (1 mM), fluoreto de sódio (25 mM), EDTA (0,001 M, pH 8), e centrifugados à 4 °C por 15 minutos à 10000 rpm. O sobrenadante do lisado renal foi então retirado e feita a dosagem de proteínas pelo método de Bradford. Em seguida, a quantificação de IL-1 β no sobrenadante foi realizada por ELISA, utilizando kit comercial (R&D Systems Inc, Minneapolis, EUA), numa diluição de 1:3. Os valores de IL-1 β foram expressos em pg/mg de proteína.

4.8) Análise Estatística

Os dados foram plotados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) com exceção dos dados de fluxo urinário que estão expressos como mediana e percentil 25% e 75%. As variáveis dependentes foram submetidas a teste de normalidade, por gráfico de normalidade e de dispersão e também através do teste de Kolomogorv-Smirnov. A análise de Variância de duas vias (two-way ANOVA) com o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls foi utilizada para as variáveis com distribuição normal [TFG, fração de excreção de sódio, fluxo urinário, área intersticial relativa, número de túbulos com necrose, vimentina (Imunoistoquímica), PCNA (Imunoistoquímica), ED1, 8-isoprostano, NF- κ B, cubulina e IL1- β] ou que mostraram distribuição normal após a transformação em log_e, [creatinina plasmática, osmolalidade urinária, VDBPur, vimentina (*Western Blot*), PCNA (*Western Blot*) e mioglobina]. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa STATISTICA versão 10 (StatSoft, Tulsa, EUA). Os gráficos foram construídos utilizando GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, EUA). O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

5-Resultados

5- Resultados

5.1) Função Renal

Os resultados do presente estudo demonstram que os animais injetados com glicerol tiveram aumento dos níveis plasmáticos de creatinina (Pcreat.) e da fração de excreção de sódio (FENa⁺) e redução da TFG em comparação aos grupos controles, evidenciando queda da função renal induzida por esse agente. Além disso foi constatado aumento do fluxo urinário e redução da osmolalidade urinária (Uosm) nos animais tratados com glicerol. Essas alterações foram menos intensas nos animais tratados com Vit. D (**Tabela 1**).

Tabela 1: Parâmetros de função renal de ratos Controle, Controle+Vit. D, Glicerol e Glicerol+Vit. D.

Parâmetros funcionais	Controle (n=7)	Controle +Vit. D (n=7)	Glicerol (n=13)	Glicerol+Vit. D (n=10)
Pcreat. (mg%)	0,61±0,03	0,62±0,05	2,73±0,39**,++	2,07±0,43*,+
TFG (ml/min/100g)	0,421±0,06	0,490±0,03	0,113±0,02***,+++	0,240±0,04**,+++,#
FENa ⁺ (%)	0,290±0,06	0,317±0,05	3,713±0,51***,+++	1,96±0,64+,#
Uosm (mOsm/kgH ₂ O)	2080±241,6	1809±117,9	541,5±25,49***,+++	696,0±33,45***,+++
V (ml/min)	0,004 (0,002;0,01)	0,005 (0,003;0,01)	0,020 (0,01;0,02)***,+++	0,013 (0,007;0,01)*,+,###

Pcreat: creatinina plasmática (mg%); TFG: taxa de filtração glomerular (ml/min/100g); FENa⁺: fração de excreção de sódio (%); Uosm: osmolalidade urinária (mOsm/kgH₂O); V: fluxo urinário (ml/min). Os dados estão expressos como média±EPM, com exceção dos dados de fluxo urinário que estão expressos como mediana e percentil 25% e 75%. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* Controle; +p<0,05, ++p<0,01 e +++p<0,001 *versus* Controle+Vit.D; #p<0,05 e ###p<0,001 *versus* Glicerol.

5.2) Análise da excreção urinária de VDBP

A VDBP é reabsorvida exclusivamente no túbulo proximal, a detecção urinária desta proteína indica a existência de lesão neste segmento, de modo que esta proteína pode ser considerada como um biomarcador de lesão dos túbulos proximais. Foi observado aumento significativo na excreção urinária de VDBP nos animais tratados com glicerol quando

comparados aos seus respectivos controles. Esse aumento foi menor nos animais do grupo Glicerol+Vit. D (**Figura 2**).

Figura 2: Excreção urinária de VDBP (ng/mg Creat) nos grupos Controle, Controle+Vit.D, Glicerol e Glicerol+Vit.D. Os dados estão expressos como média±EPM. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ *versus* Controle; ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ *versus* Controle+Vit.D; ## $p < 0,01$ *versus* Glicerol.

5.3) Avaliação histológica e morfométrica

Os resultados dos estudos histológicos evidenciaram a presença de lesões na fase aguda características de NTA nos animais de ambos os grupos tratados com glicerol como descamação de células necróticas na luz tubular, desnudamento da membrana basal com perda da bordadura em escova e dilatação da luz tubular. Essa lesão foi menos intensa nos animais tratados com Vit. D (**Figuras 3 A, B, C e D**). O acometimento tubulointersticial do córtex renal, analisado pela porcentagem de área intersticial relativa e pelo número de túbulos com necrose, foi significativamente maior nos animais do grupo Glicerol quando comparados aos respectivos controles (**Figuras 3 E e F**).

Figura 3: Cortes histológicos corados com Tricrômico de Masson representativos dos animais dos grupos Controle (A), Controle+Vit. D (B), Glicerol (C) e Glicerol+Vit. D (D). Número de túbulos com necrose (E) e área intersticial relativa (F) dos diferentes grupos. Note que as lesões tubulointersticiais são mais intensas em (C) do que em (D). Os dados estão expressos como média±EPM. A barra indica 50 μm * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ *versus* Controle; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ *versus* Controle+Vit. D; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ *versus* Glicerol.

5.4) Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica evidenciou aumento significativo da imunorreação para vimentina no córtex renal dos animais do grupo Glicerol quando comparados aos controles e aos Glicerol+Vit.D (**Figuras 4 A, B, C, D e E**). A vimentina é um marcador de lesão tubular recente. Normalmente esta proteína encontra-se presente nos glomérulos, arteríolas e fibroblastos intersticiais, como pode ser observada nos animais controles. As células tubulares só expressam vimentina quando estão proliferando evidenciando lesão recente dessas células, como observado nos animais tratados com Glicerol.

Figura 4: Imunolocalização de vimentina no córtex renal dos animais dos grupos Controle (A), Controle+Vit. D (B), Glicerol (C) e Glicerol + Vit. D (D). Porcentagem de área tubulointersticial no córtex renal marcados com vimentina (E) nos diferentes grupos. Note que a expressão de vimentina é maior em (C) do que em (D). A barra indica 50 μm. Os dados estão expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus Controle; + $p < 0,05$ e +++ $p < 0,001$ versus Controle+Vit. D; ### $p < 0,001$ versus Glicerol.

A proteína PCNA está associada com o ciclo celular. O anticorpo para PCNA reage com antígenos presentes nos núcleos de células que estão em fase de proliferação. A imunolocalização para PCNA (**Figura 5 A, B, C, D e E**), revelou um aumento do número de células positivas para PCNA (PCNA+) nos animais tratados com Glicerol comparados com os controles. O aumento da proliferação celular foi menor nos animais do grupo Glicerol+Vit. D.

Figura 5: Imunolocalização de PCNA no córtex renal dos animais dos grupos Controle (A), Controle+Vit. D (B), Glicerol (C) e Glicerol + Vit. D (D). Número de células PCNA+ no córtex renal dos diferentes grupos (E). Note que o número de células PCNA+ no córtex renal é maior em (C) do que em (D). A barra indica 50 μm. Os dados estão expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ *versus* Controle; + $p < 0,05$ e +++ $p < 0,001$ *versus* Controle+Vit. D; ### $p < 0,001$ *versus* Glicerol.

A imunolocalização de ED1, marcador de macrófagos, evidenciou aumento do número de células positivas para ED1 (ED1+) no córtex renal de ambos os grupos de animais que receberam Glicerol comparados aos respectivos controles (**Figura 6 A, B, C, D e E**). Contudo, o tratamento com Vit. D reduziu o número de macrófagos.

Figura 6: Imunolocalização de células ED1-positivas (macrófagos) no córtex renal dos animais dos grupos Controle (A), Controle+Vit. D (B), Glicerol (C) e Glicerol+Vit. D (D) e quantificação de células ED1+ no compartimento tubulointersticial (E). Note que o número de células ED1+ no córtex renal é maior em (C) do que em (D). Barra indica 50 µm. Os dados estão expressos como média±EPM. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ *versus* Controle; + $p < 0.05$ e +++ $p < 0.001$ *versus* Controle+Vit. D e # $p < 0.05$ *versus* Glicerol.

Os produtos finais da peroxidação lipídica mediada por espécies reativas incluem entre outros compostos os isoprostanos, dentre eles, o 8-isoprostano tem sido utilizado como marcador do estresse oxidativo. Nossos resultados mostram que houve aumento significativo de 8-isoprostano nos animais do grupo Glicerol quando comparados aos controles. O tratamento com Vit. D, um potente antioxidante, preveniu o efeito do glicerol no estresse oxidativo, como pode ser observado nas figuras (**Figuras 7 A, B, C, D e E**).

Figura 7: Imunolocalização de 8-isoprostano no córtex renal dos grupos Controle (A), Controle+Vit. D (B), Glicerol (C) e Glicerol+Vit. D (D). Porcentagem da área tubulointersticial do córtex renal marcados com 8-isoprostano nos diferentes grupos (E). Note que a expressão de 8-isoprostano é maior em (C) do que em (D). Barra indica 50 μm. Os dados estão expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus Controle; +++ $p < 0,001$ versus Controle+Vit. D e ### $p < 0,001$ versus Glicerol.

Nossos resultados também mostram aumento da expressão de NF-κB no córtex renal dos ratos tratados com glicerol (**Figuras 8 A, B, C, D e E**). As figuras da parte superior direita (sem contracoloração), destacam a localização da marcação para NF-κB nos diferentes grupos. Nos animais controles e naqueles tratados com Glicerol+Vit. D, a marcação para NF-κB se encontra predominantemente no citoplasma da célula, enquanto que, nos animais do grupo Glicerol a marcação é nuclear.

Figura 8: Imunolocalização de NF- κ B no córtex renal dos grupos Controle (A), Controle+Vit. D (B), Glicerol (C) e Glicerol+Vit. D (D). As imagens da parte superior direita mostram um túbulo representativo dos diferentes grupos sem contracoloração. Porcentagem da área tubulointersticial do córtex renal marcados com NF- κ B nos diferentes grupos (E). Note que a marcação para NF- κ B no citoplasma e no núcleo são mais intensos em (C) do que em (D). Barra indica 50 μ m. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ *versus* Controle; + $p < 0,05$ e +++ $p < 0,001$ *versus* Controle+Vit. D e ### $p < 0,001$ *versus* Glicerol.

A cubulina é um dos receptores endocíticos envolvidos na reabsorção da Vit D ligada com a VDBP presentes na luz dos túbulos proximais. Podemos observar na imunolocalização para cubulina que nos animais controles, a marcação se encontra na bordadura em escova dos túbulos proximais (**Figuras 9 A, B, C, D e E**). Nos túbulos necrosados (NTA), ocorre perda da bordadura em escova, descamação das células e a marcação se encontra na luz. A contagem do número de túbulos com bordadura em escova marcada com cubulina, mostra que há redução nos animais tratados com glicerol, mas essa alteração foi menor naqueles tratados com Glicerol+Vit. D.

Figura 9: Imunolocalização de cubulina no córtex renal dos grupos Controle (A), Controle+Vit. D (B), Glicerol (C) e Glicerol+Vit. D (D). Número de túbulos com bordadura em escova marcada com cubulina (E) nos diferentes grupos. Note que o número de túbulos com bordadura em escova marcada com cubulina é menor em (C) do que em (D). Barra indica 50 μ m. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p<0,001$ versus Controle; +++ $p<0,001$ versus Controle+Vit. D e ### $p<0,001$ versus Glicerol.

5.5) Análises por Western Blot

O resultado das análises de *Western Blot* para vimentina e PCNA estão de acordo com aquelas encontradas nas análises de imunoistoquímica para essas proteínas. Houve aumento na expressão de vimentina (**Figuras 10 A e B**) e de PCNA (**Figuras 11 A e B**) nos animais do grupo Glicerol quando comparados aos controles, esse aumento foi atenuado nos animais do grupo Glicerol+Vit. D.

Figura 10: Expressão de vimentina avaliada por *Western blot* no tecido renal (A) dos animais dos grupos Controle (banda 1), Controle+Vit. D (banda 2), Glicerol (banda 3) e Glicerol+Vit. D (banda 4). Análise da densitometria das bandas de vimentina dos diferentes grupos (B). A razão densitométrica entre as bandas de vimentina e de GAPDH foi calculada e os dados foram expressos em comparação aos grupos controles, com o valor médio designado como 100%. Os dados estão expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus Controle; ++ $p < 0,01$ versus Controle+Vit. D e ### $p < 0,001$ versus Glicerol.

Figura 11: Expressão de PCNA avaliada por *Western blot* no tecido renal (A) dos animais dos grupos Controle (banda 1), Controle+Vit. D (banda 2), Glicerol (banda 3) e Glicerol+Vit. D (banda 4). Análise da densitometria das bandas de PCNA dos diferentes grupos (B). A

razão densitométrica entre as bandas de PCNA e de GAPDH foi calculada e os dados foram expressos em comparação aos grupos controles, com o valor médio designado como 100%. Os dados estão expressos como média±EPM. * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ *versus* Controle; + $p<0,05$ e +++ $p<0,001$ *versus* Controle+Vit. D e # $p<0,05$ *versus* Glicerol.

Em relação a mioglobina, a expressão da mesma estava aumentada em ambos os grupos tratados com glicerol (**Figuras 12 A e B**), quando comparados aos respectivos controles.

Figura 12: Expressão de mioglobina avaliada por *Western blot* no tecido renal (A) dos animais dos grupos Controle (banda 1), Controle+Vit. D (banda 2), Glicerol (banda 3) e Glicerol+Vit. D (banda 4). Análise da densitometria das bandas de mioglobina dos diferentes grupos (B). A razão densitométrica entre as bandas de mioglobina e de GAPDH foi calculada e os dados foram expressos em comparação aos grupos controles, com o valor médio designado como 100%. Os dados estão expressos como média±EPM. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ *versus* Controle; + $p<0,05$ e +++ $p<0,001$ *versus* Controle+Vit. D.

5.6) Quantificação de IL-1 β no tecido renal

A quantificação de IL-1 β no tecido renal por ELISA evidenciou aumento dos níveis desta citocina no córtex renal dos animais do grupo Glicerol quando comparados aos controles (**Figura 13**), essa alteração foi atenuada nos animais que receberam tratamento com Vit. D.

Figura 13: Níveis de IL-1 β no córtex renal dos animais dos grupos Controle, Controle+Vit. D, Glicerol e Glicerol+Vit. D. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. ***p<0,001 *versus* Controle; +++p<0,001 *versus* Controle+Vit. D e ###p<0,001 *versus* Glicerol.

6-Discussão

6-Discussão

A LRA induzida pelo glicerol em ratos é um dos modelos mais utilizados para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na LRA mioglobinúrica, modelo este que é semelhante a lesão renal que ocorre em humanos com rabdomiólise (WOLFERT; OKEN, 1989). Embora a fisiopatologia do modelo de LRA induzida pela mioglobina ainda não esteja completamente compreendida, há evidências de que a redução do fluxo renal e a isquemia participam dos danos renais (WOLFERT; OKEN, 1989; KARAM et al., 1995). Além disso, o efeito tóxico direto da mioglobina, provocando a geração de ROS, inflamação e vasoconstrição (ZAGER et al., 1996; VALDIVIELSO et al., 2000) e a precipitação da mesma com formação de cilindros e obstrução da luz tubular (ZAGER et al., 1991), são fatores que também participam da gênese dessa lesão.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito do calcitriol na LRA provocada pela mioglobina e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que os animais tratados com glicerol desenvolvem LRA com redução da TFG, aumento dos níveis plasmáticos de creatinina e da fração de excreção de sódio e redução da osmolalidade urinária, alterações semelhantes as observadas por vários autores que estudaram esse modelo (WESTENFELDER et al., 1980; KARAM et al., 1995; SHULMAN et al., 1993). Contudo, essas alterações foram menos intensas nos animais que receberam Vit. D. Além disso, nós observamos que a expressão de mioglobina estava aumentada no córtex renal de ambos os grupos tratados com glicerol quando comparados aos respectivos controles, o que deve estar contribuindo para a queda da função renal observada nesses animais.

Alguns estudos mostram que a mioglobina induz a peroxidação lipídica de membranas celulares, produzindo MDA (malondialdeído) e isoprostanos, causando comprometimento ainda maior do funcionamento do tecido (REEDER et al., 2002). Os isoprostanos são produtos da oxidação do ácido araquidônico e são vasoconstritores muito potentes, aumentando a expressão de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias, as quais promovem o recrutamento de macrófagos (PANIZO et al., 2015). Os nossos resultados mostraram aumento significativo da expressão de 8-isoprostano nos animais do grupo Glicerol, essa alteração não foi constatada nos animais controles e naqueles tratados com Glicerol+Vit. D. Os mecanismos moleculares responsáveis pelas ações da Vit. D no estresse oxidativo do tecido renal podem estar relacionados, pelo menos em parte, à inibição da expressão da NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*) oxidase e ao aumento da enzima citosólica SOD (FINCH et al., 2012). O tratamento com paricalcitol em pacientes em hemodiálise reduziu os níveis dos

marcadores de estresse oxidativo no soro, incluindo MDA, NO e proteína carbonil e aumentou o nível de defesas antioxidantes contendo atividade glutatônica, catalase e SOD (IZQUIERDO et al., 2012). Estes resultados estão de acordo com os observados em estudos prévios de LRA induzida por glicerol em que foi constatado que o estresse oxidativo, a apoptose e a inflamação são mediadores importantes da perda da função renal observada nesse modelo (HOMSI; BRITO; JANINO, 2010; KIM et al., 2006).

Os resultados dos estudos histológicos dos rins desses animais evidenciaram a presença de lesões na fase aguda característica de NTA em ambos os grupos tratados com glicerol, como descamação de células necróticas na luz tubular, desnudamento da membrana basal com perda da bordadura em escova e dilatação da luz tubular. Além disso, observamos também aumento da área intersticial relativa do córtex renal dos animais tratados com glicerol. Essas alterações foram menos intensas nos animais tratados com Vit. D. Korrapati, Shaner e Schnellmann (2012) mostraram que associado às alterações de função renal, os ratos tratados com glicerol exibiram extensa necrose tubular em toda a região corticomedular. Al Asmari et al. (2017) observaram danos generalizados no córtex renal de ratos injetados com glicerol. O estudo histológico evidenciou perda de microvilosidades, dilatação tubular e vacuolização, necrose tubular e restos celulares no lúmen tubular. Westenfelder et al. (1980) e Park et al. (2012) demonstraram que a LRA induzida pelo glicerol promovia queda da TFG com alterações na fração de excreção de sódio. Essas alterações estavam correlacionadas com lesões histológicas e diminuição na atividade da Na^+K^+ -ATPase nesse segmento. Uma das consequências da lesão tubular consiste em alterações da membrana basolateral provocadas pela redução de ATP. A depleção de ATP leva a disfunção da bomba Na^+K^+ -ATPase e contribui para os distúrbios de estrutura e função dos túbulos renais e redução da reabsorção de sódio no túbulo proximal (DEVARAJAN, 2006).

A lesão tubular também pode ser evidenciada pelo aumento da expressão de vimentina nos animais tratados com glicerol. A vimentina é uma proteína da família dos filamentos intermediários e encontra-se presente normalmente nos glomérulos, arteríolas e fibroblastos intersticiais. Essa proteína pode ser usada como um marcador de lesão da célula tubular uma vez que estas expressam vimentina apenas quando estão proliferando e evidencia lesão recente dessas células. Este resultado está de acordo com o que encontramos em relação a proliferação celular. Os animais tratados com glicerol tiveram aumento do número de células PCNA+. A expressão de PCNA é um índice de regeneração renal, pois sua expressão no núcleo das células está relacionada com a proliferação celular e síntese de DNA (LI et al., 2015). Tanto a expressão de vimentina, quanto a de PCNA foram atenuadas pelo tratamento com Vit. D. Esses resultados

mostram que os animais do grupo Glicerol+Vit. D tiveram menor lesão das células tubulares e consequentemente menor regeneração celular.

Tan, Li e Liu (2006) utilizando camundongos com nefropatia obstrutiva, constataram que a deficiência de Vit. D pode ser um fator que contribui para a destruição progressiva do parênquima renal e da perda de função renal nesse modelo. O tratamento dos animais com paricalcitol reduziu a transição epitélio mesenquimal (*mesenchymal–epithelial transition* [MET]) evidenciada pela preservação da E-caderina epitelial e inibição de marcadores mesenquimais como α -SMA (*α -Smooth muscle actin*) e fibronectina, prevenindo o aumento intersticial de matriz e da fibrose renal. Além disso, o paricalcitol inibiu o Snail, um importante gene regulador da MET que desempenha um papel fundamental na supressão da expressão de E-caderina (BATLLE et al., 2000; CANO et al., 2000; PÁLMER et al., 2004). Estes resultados mostram que a Vit. D endógena pode ser essencial para a manutenção da integridade estrutural e funcional do epitélio tubular normal (TAN; LI; LIU, 2006).

Estudos sugerem que a LRA induzida por rabdomiólise está associada com um processo inflamatório, onde os macrófagos desempenham um papel importante na patogênese das lesões renais (BELLIERE et al., 2015; SOARES et al., 2002). Para análise do processo inflamatório, utilizamos o anticorpo anti-ED1 que reage apenas contra antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos. Nós observamos que ambos os grupos tratados com glicerol tiveram aumento no número de macrófagos em relação aos animais controles, entretanto, essa alteração foi menos intensa naqueles animais que receberam também o tratamento com Vit. D. Diferentes subgrupos de macrófagos, M1 (ativado e pró-inflamatório) e M2 (função anti-inflamatória e de remodelação de tecidos) estão presentes durante a LRA mioglobínica (ANDERS; RYU, 2011). Os trabalhos mostram que há alteração fenotípica dos macrófagos infiltrantes ao longo da progressão da rabdomiólise, com maior presença de macrófagos M1 nos primeiros dias, enquanto que M2 são mais abundantes em estádios posteriores (BELLIERE et al., 2015). Os macrófagos irão promover a síntese e liberação de mediadores fibróticos, tais como CTGF (*Connective tissue growth factor*) e TGF- β contribuindo para a fibrose renal (RUBIO-NAVARRO et al., 2016). O trabalho de Soares et al. (2002) mostrou aumento do número de macrófagos e da expressão de TGF- β nos animais tratados com glicerol 5, 30 e 60 dias após a injeção. KIM et al. (2014) observaram que a depleção de macrófagos reduz as alterações de função renal na LRA induzida por glicerol, diminuindo a apoptose das células epiteliais tubulares e reduzindo a expressão de mediadores inflamatórios. Em estudo recente foi constatado que nesse modelo, a depleção de macrófagos reduzia lesões histológicas, fibrose e melhorava a reparação renal

aumentando a sobrevivência dos animais, evidenciando a importância da participação dos macrófagos na progressão da lesão renal provocada pela rabdomiólise (BELLIERE et al., 2015).

Os níveis de IL-1 β no tecido renal foram também avaliados no presente trabalho. A IL-1 β é uma das formas moleculares de IL-1, produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas e é considerada um dos mais importantes marcadores da resposta inflamatória (FERRERO-MILIANI et al., 2007). Houve aumento significativo dessa citocina nos animais tratados com glicerol quando comparados aos controles e aos tratados com Glicerol+Vit. D. Em um estudo clínico, foi observado que os níveis de IL-1 β e TNF- α foram inibidos de maneira dose-dependente em pacientes com DRC tratados com calcitriol (PANICHI et al., 1998). A produção não controlada ou prolongada de IL-1 β está implicada em vários distúrbios inflamatórios (CARTA et al., 2011; STOJANOV; KASTNER, 2005; DINARELLO, 2005), portanto sua atividade é rigorosamente controlada nos níveis de transcrição, tradução, maturação e secreção. Ao contrário de outras citocinas, a IL-1 β é inicialmente produzida como um precursor bioinativo (pró-IL-1 β) e requer subsequente clivagem proteolítica intracelular pela caspase 1 para maturação e liberação para o ambiente extracelular. A caspase 1 é quebrada e se torna ativa após a sensibilização do receptor NLRP3 (*NOD-like receptor P3*) renal por PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) ou DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) originando uma plataforma molecular chamada de inflamassoma (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Uma vez no interstício renal, a mioglobina pode ativar diretamente os macrófagos. A exposição à mioglobina sensibiliza o receptor NLRP3 levando a formação de fatores pró-inflamatórios como a IL-1 β (BELLIERE et al., 2015). Isso é consistente com um outro estudo que mostra que o heme (um componente da mioglobina) desempenha um papel essencial na secreção de IL-1 β por macrófagos durante a inflamação renal (LI et al., 2014).

A proteína uromodulina é exclusivamente secretada no túbulo distal e é imunologicamente inerte dentro do lúmen tubular. A lesão tubular, no entanto, permite a saída dessa proteína para o compartimento intersticial onde ela se transforma em um DAMP que ativa células dendríticas intersticiais via TLR4 (*Toll like receptor 4*) (SÄEMANN et al., 2005). A uromodulina promove fagocitose e desestabilização endossomal em células dendríticas, um processo que ativa NLRP3 e resulta na liberação de IL-1 β (DARISIPUDI et al., 2012). No túbulo distal, o complexo uromodulina/mioglobina forma cilindros que pode desencadear ativação do sistema imune através do mecanismo acima descrito (MULAY; EVAN; ANDERS, 2013).

A via do NF- κ B pode ser ativada pelo estresse oxidativo (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002) e pelos processos inflamatórios induzidos pelo glicerol (SOARES et al., 2002). Em nosso trabalho, os animais tratados com glicerol tiveram maior expressão de NF- κ B

quando comparados aos controles. Entretanto, é possível observar que nos animais tratados com Glicerol+Vit. D, a marcação para NF- κ B se encontra predominantemente no citoplasma da célula, enquanto que, nos animais do grupo Glicerol a marcação está no núcleo. Em condições normais, o NF- κ B (p65/p50) permanece no citoplasma ligado à sua proteína inibitória, a I κ B, a qual o mantém em estado inativo. A via clássica de ativação e translocação nuclear do NF- κ B, envolvida na resposta inflamatória e nos mecanismos de sobrevivência, requer a remoção da proteína I κ B α do complexo NF- κ B/ I κ B α . Após um estímulo, um complexo de quinases de I κ B, chamadas de IKK são fosforiladas e tornam-se ativas. Este complexo fosforila I κ B (JEON; JEONG; JUE, 2000; UMEZAWA; ARIGA; MATSUMOTO, 2000; SHIH et al., 2011) e esta é então imediatamente reconhecida pelo complexo ubiquitina ligase E3. No momento em que o I κ B é degradado, NF- κ B fica exposto, é reconhecido pelas carioferinas (proteínas de transporte nucleocitoplasmático) e translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, o NF- κ B se liga em sua região promotora do DNA e inicia a transcrição de inúmeros genes, particularmente àqueles relacionados à atividade pró-inflamatória, como TNF- α , IL-1, IL-6, PAF (*Platelet-activating factor*) e a enzima NOS-2 (*Nitric oxide synthase 2*) (KELLEHER et al., 2007; KARIN; DELHASE, 2000; HARHAJ; DIXIT, 2011; LIU; CHEN, 2011)

O efeito renoprotetor anti-inflamatório da Vit. D via inibição do NF- κ B foi previamente demonstrado num modelo de nefropatia obstrutiva (TAN; LI; LIU, 2006). Adicionalmente, os estudos *in vitro* utilizando células HK-2 mostraram que o paricalcitol atenuou a ativação de NF- κ B induzido por ciclosporina e gentamicina (PARK et al., 2010a; PARK et al., 2010b). Utilizando o modelo de LRA induzida por LPS (lipopolissacarídeo), o trabalho de Xu et al. (2015) mostrou que, nos animais tratados com Vit. D, o VDR ativado, inibia a via do NF- κ B renal induzida por LPS através da sua interação física com a subunidade p65 do NF- κ B. Da mesma forma, é provável que no modelo de LRA induzida por rabdomiólise, a interação entre o VDR renal com a subunidade p65 forneça uma possível explicação para a atividade anti-inflamatória mediada pela Vit. D nesse modelo.

As alterações de função das células epiteliais dos túbulos proximais e/ou de estrutura devido a lesão do parênquima renal, como observado nas doenças renais, causam um déficit na produção e fornecimento de Vit. D ativa (TAN; LI; LIU, 2006). No modelo de rabdomiólise induzida pelo glicerol há redução de calcitriol tanto pela hiperfosfatemia, a qual inibe a expressão da enzima 1 α - hidroxilase (BOSCH; POCH; GRAU, 2009), quanto pela redução da captação de calcidiol devido a lesão do túbulo proximal provocada pela reabsorção de mioglobina. Os nossos resultados mostraram que os animais do grupo Glicerol tiveram também grande perda de VDBPur quando comparados aos animais controles e àqueles tratados com

Glicerol+Vit. D. A reabsorção tubular de VDBP é mediada pelos receptores megalina e cubulina (LEHESTE et al., 1999; NYKJAER et al., 2001), nossos resultados mostraram redução do número de túbulos que expressam cubulina na bordadura em escova dos animais tratados com glicerol, consequência da NTA, o que contribui para a maior excreção urinária de VDBP. Deste modo, o VDBPur pode ser utilizado como um biomarcador de lesão dos túbulos proximais. O trabalho de Nykjaer et al. (2001) mostrou que cães com transtorno hereditário que afeta a biossíntese de cubulina apresentam metabolismo anormal de Vit. D. Da mesma forma, pacientes humanos com mutações que causam disfunção de cubulina exibem excreção urinária de calcidiol. Portanto, a falta do receptor para Vit. D devido à lesão das células do túbulo proximal com perda do transportador na urina, reduz a captação de Vit. D nesse modelo, o que pode contribuir para a intensificação da lesão renal, reiterando a importância do tratamento com Vit. D nessas condições.

7-Conclusão

7- Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o tratamento com Vit. D teve efeito protetor no dano renal induzido pelo glicerol, atenuando o declínio da função renal, as lesões tubulointersticiais, o processo inflamatório e o estresse oxidativo. O efeito anti-inflamatório e antioxidante da Vit. D foi evidenciado pela redução do número de macrófagos, menores níveis de IL-1 β e da expressão de NF- κ B e 8-isoprostano no tecido renal. A inflamação é um dos fatores que contribui para a lesão renal na rabdomiólise e deve estar relacionada, pelo menos em parte, com a deficiência de produção de Vit. D ativa nesse modelo, sendo atenuada pela administração da mesma. Não houve diferença na expressão renal de mioglobina nos dois grupos experimentais.

Referências

- ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Update in vitamin D. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 2, p. 471-478, 2010.
- AL ASMARI, A. K. et al. Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. **BMC Nephrol**, v. 18, n. 1, p. 41, 2017.
- ANDERS, H. J.; RYU, M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. **Kidney Int.**, v. 80, n. 9, p. 915-925, 2011.
- ASCENZI, P.; BRUNORI, M. Article Myoglobin: a pseudo-enzymatic scavenger of nitric oxide. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v. 29, n. 5, p. 183-185, 2001.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; FERREIRA, D. B.; COSTA, R. S. Rhabdomyonecrosis experimentally induced in Wistar rats by Africanized bee venom. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 344-348, 1992.
- BAR-SHAVIT, Zvi et al. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 80, n. 19, p. 5907-5911, 1983.
- BATLLE, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 2, p. 84-89, 2000.
- BATTAULT, S. et al. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. **Eur J Nutr**, v. 52, n. 2, p. 429-441, 2013.
- BAYNES J. W.; DOMINICZAK M. H. Bioquímica médica - 4. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BELLIÈRE J. et al. Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury. **J Am Soc Nephrol** 26:1363-1377, 2015.
- BOSCH X.; POCH E.; GRAU J. M. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. **N Engl J Med**. 36:62-72, 2009.
- BYWATERS E. G. L.; BEALL D. Crush injuries with impairment of renal function. **BMJ**. 1941.
- BYWATERS E. G. L.; STEAD J. K. The production of renal failure following injection of solution containing myohaemoglobin. **Q J Exp Physiol**. 33: 53-70, 1944.

CAMPBELL, M. J. et al. Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 19, n. 1, p. 15-27, 1997.

CANO, A. et al. The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 2, p. 76-83, 2000.

CANTORNA, M. T. Why do T cells express the vitamin D receptor?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1217, n. 1, p. 77-82, 2011.

CARTA, S. et al. The rate of interleukin-1 β secretion in different myeloid cells varies with the extent of redox response to Toll-like receptor triggering. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 31, p. 27069-27080, 2011.

COSTA, J. A. C; VIEIRA-NETO, O.M; NETO, M. M. Lesão renal aguda. **Simpósio: Urgências e emergências nefrológicas**. Capítulo I. pp. 307-324, 2003.

DALY, R. M. et al. Prevalence of vitamin D deficiency and its determinants in Australian adults aged 25 years and older: a national, population-based study. **Clin. Endocrinol.**, v. 77, n. 1, p. 26-35, 2012.

DARISIPUDI, M. N. et al. Uromodulin Triggers IL-1 β –Dependent Innate Immunity via the NLRP3 Inflammasome. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 23, n. 11, p. 1783-1789, 2012.

de BRAGANÇA A. C. et al. Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats. **Physiol Rep.** 7:12331, 2015.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, n. 6, p. 1503-1520, 2006.

DINARELLO, C. A. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 461-462, 2005.

DOORENBOS C. R. et al. Antiproteinuric treatment reduces urinary loss of vitamin D-binding protein but does not affect vitamin D status in patients with chronic kidney disease. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 128: 56–61, 2012.

DUSSO A. S.; BROWN A. J.; SLATOPOLSKY E. Vitamin D. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 289: F8–F28, 2005.

EFSTRATIADIS, G. et al. Rhabdomyolysis updated. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 129, 2007.

Exército brasileiro (Brasil). Campanha de prevenção a rabdomiólise. Disponível em: <http://www.eb.mil.br/campanha-de-prevencao-a-rabdomiolise1>

FERRERO-MILIANI, L. et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, n. 2, p. 227-235, 2007.

FINCH, J. L. et al. Effect of combining an ACE inhibitor and a VDR activator on glomerulosclerosis, proteinuria, and renal oxidative stress in uremic rats. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**, v. 302, n. 1, p. F141-F149, 2012.

GBUREK, J. et al. Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 13, n. 2, p. 423-430, 2002.

GIANNOGLOU G. D.; CHATZIZISIS Y. S; MISIRLI G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. **Eur. J Int Med**. 18: 90–100, 2007.

GRAVES, E; GILLUM, B. S. **National hospital discharge survey: annual summary, 1994**. US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, 1997.

HARHAJ, E. W.; DIXIT, V. M. Deubiquitinases in the regulation of NF- κ B signaling. **Cell Res**, v. 21, p. 22-39. 2011.

HEANEY, R. P. Vitamin D in health and disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, n. 5, p. 1535-1541, 2008.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 465-471, 1997.

HEWISON, M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 39, n. 2, p. 365-379, 2010.

HOLICK M. F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**. 19;357:266-281, 2007.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Rev Endocr Metab Disord**, p. 1-13, 2017.

HOLICK, M. F. Vitamin D: extraskeletal health. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am**, v. 39, n. 2, p. 381-400, 2010.

HOLT S. G. et al. Increased lipid peroxidation in patients with rhabdomyolysis. **Lancet**. 353(9160):1241, 1999.

HOLT S. G.; MOORE K. P. Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. **Intensive Care Med**. 27: 803-811, 2001.

HOMSI, E.; BRITO, S. M. de; JANINO, P.. Silymarin exacerbates p53-mediated tubular apoptosis in glycerol-induced acute kidney injury in rats. **Renal Failure**, v. 32, n. 5, p. 623-632, 2010.

ITO, I. et al. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v. 123, n. 11, p. 4579, 2013.

IZQUIERDO, M. J. et al. Paricalcitol reduces oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. **BMC Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 159, 2012.

JEON, K.; JEONG, J.; JUE, D. Thiol-reactive metal compounds inhibit NF- κ B activation by blocking I κ B kinase. **J Immunol**, v. 22, p. 5981- 5989. 2000.

KARAM, H. et al. Role of endothelin in acute renal failure due to rhabdomyolysis in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, n. 1, p. 481-486, 1995

KARIN, M.; DELHASE, M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. **Semin Immunology**, v. 12, p. 85-98. 2000.

KASAOKA, S. et al. Peak value of blood myoglobin predicts acute renal failure induced by rhabdomyolysis. **J Crit Care**, v. 25, n. 4, p. 601-604, 2010.

KELLEHER, Z. T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J. S.; MARSHALL, H. E. NOS2 regulation of NF- κ B by S-nitrosylation of p65. **J Biol Chem**, v. 282, p. 30667-30672. 2007.

KHAN F.Y. Rhabdomyolysis: a review of the literature. **J Med**. Vol.67, 9, 2009.

KIM J. et al. Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. A role for manganese superoxide dismutase. **J Biol Chem**. 281:20349-20356. 2006.

KIM, J. H. et al. Macrophage depletion ameliorates glycerol-induced acute kidney injury in mice. **Nephron Exp Nephrol**, v. 128, n. 1-2, p. 21-29, 2014.

KORRAPATI, M. C.; SHANER, B. E.; SCHNELLMANN, R. G. Recovery from glycerol-induced acute kidney injury is accelerated by suramin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 341, n. 1, p. 126-136, 2012.

KRIZ W.; LEMLEY K. V. The role of the podocyte in glomerulosclerosis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 8: 489–497, 1999.

KUHLMANN A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. **Am J Physiol Renal Physiol**. 286:F526-533, 2004.

LEHESTE, J. R. et al. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. **Am. J. Pathol.**, v. 155, n. 4, p. 1361-1370, 1999.

LI Y. C. et al. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. **J Steroid Biochem & Mol Biol**. 89–90 387–392, 2004.

LI Y. C. Podocytes as a target of Vitamin D. **Curr Diab Rev**.7:35-40, 2011.

- LI, Y. et al. Attenuation of Inflammation by Emodin in Lipopolysaccharide-induced Acute Kidney Injury via Inhibition of Toll-like Receptor 2 Signal Pathway. **Iran J Kidney Dis**, v. 9, n. 3, 2015.
- LIU, S.; CHEN, Z. Expanding role of ubiquitination in NF- κ B signaling. **Cell Res**, v. 21, p. 6-21. 2011.
- MAKIBAYASHI K. et al. A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. **Am J Pathol**.158: 1733–1741, 2001.
- MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **J. Cell. Physiol.**, v. 192, n. 1, p. 1-15, 2002.
- MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J.. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL- β . **Molecular cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.
- MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 465-474, 2002.
- MIRKOVIC K. et al. Urinary vitamin D binding protein: a potential novel marker of renal interstitial inflammation and fibrosis. **Plos One**. 8(2):e55887, 2013.
- MOHAUPT M.G. Rhabdomyolysis **Ther Umsch**.60(7):391-7, 2003.
- MULAY, S. R.; EVAN, A.; ANDERS, H. J. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 29, n. 3, p. 507-514, 2013.
- MUNDEL P.; SHANKLAND S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol**.13: 3005–3015, 2002.
- MUNKER, R. et al. A new series of vitamin D analogs is highly active for clonal inhibition, differentiation, and induction of WAF1 in myeloid leukemia. **Blood**, v. 88, n. 6, p. 2201-2209, 1996.
- NATH K. A. et al. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. **J Clin Invest**. 90:267-270, 1992.
- NELSON, D. A. et al. Sick cell trait, rhabdomyolysis, and mortality among US Army soldiers. **N Engl J Med**, v. 375, n. 5, p. 435-442, 2016.
- NYKJAER A. et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. **Cell**. 19:507-515. 1999.
- NYKJAER, A. et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25 (OH) vitamin D3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 24, p. 13895-13900, 2001.

- OKEN D. E.; ARCE M. L.; WILSON D. R. Glycerol-induced acute renal failure in the rat. I. Micropuncture study of the development of oliguria. **J Clin Invest.** 45:724-735,1966.
- PÁLMER, H. G. et al. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. **Nat Med**, v. 10, n. 9, p. 917-919, 2004.
- PANICHI V. et al. Effects of 1,25(OH)₂D₃ in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. **Kidney Int.** 60:87-95, 2001.
- PANICHI, V. et al. Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium. **Kidney Int.**, v. 54, n. 5, p. 1463-1469, 1998.
- PANIZO N. et al. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. **Kidney Blood Press Res.** 40:520-532, 2015.
- PARK J. W. et al. Paricalcitol prevents cisplatin-induced renal injury by supressing apoptosis and proliferation. **European J Pharm.**683:301-309, 2012.
- PARK, J. W. et al. Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats.**Kidney Int.**, v. 77, n. 12, p. 1076-1085, 2010a.
- PARK, J. W. et al. Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin-induced kidney injury in rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 298, n. 2, p. F301-F313, 2010b.
- RAVANI P. et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. **Kidney Int.** 75:88-95, 2009.
- REEDER, B. J. et al. Toxicity of myoglobin and haemoglobin: oxidative stress in patients with rhabdomyolysis and subarachnoid haemorrhage. **Biochem. Soc. Trans.** 30(4)745-748; 2002
- ROSA N. G. et al. Rabdomiólise. **Acta Med Port.** 18: 271-282, 2005.
- RUBIO-NAVARRO, A. et al. CD163-macrophages are involved in rhabdomyolysis-induced kidney injury and may be detected by MRI with targeted gold-coated iron oxide nanoparticles. **Theranostics**, v. 6, n. 6, p. 896, 2016.
- SÄEMANN, M. D. et al. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4–dependent mechanism. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 468, 2005.
- SHAH, S. et al. The molecular basis of vitamin D receptor and β -catenin crossregulation. **Molecular cell**, v. 21, n. 6, p. 799-809, 2006.
- SHIH, V. F.; TSUI, R.; CALDWELL, A.; HOFFMANN, A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. **Cell Res**, v. 21, p. 86-102. 2011.

SHIMADA T. et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **J Bone Miner Res.**19: 429–435, 2004.

SHULMAN L. M. et al. Glycerol induced ARF in rats is mediated by tumor necrosis factor. **Kidney Int.** 43:1397-1401, 1993.

SOARES T. J. et al. Effects of resveratrol on glycerol induced renal injury. **Life Sci.** 81:647-656, 2007.

SOARES T. J. et al. Long-term evolution of acute tubular necrosis induced by glycerol; role of myofibroblasts and macrophages. **Int J Exp Path** 83:165-172, 2002.

STANLEY M, ADIGUN R. Rhabdomyolysis. [Updated 2017 Oct 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Jun-.Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448168/>

STOJANOV, S.; KASTNER, D. L. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. **Curr Opin Rheumatol**, v. 17, n. 5, p. 586-599, 2005.

STUMPF W. E. et al. Cellular and subcellular localization of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in rat kidney: comparison with localization of parathyroid hormone and estradiol. **Proc Natl Acad Sci. USA** 77: 1149–1153, 1980.

STUMPF W. E. et al. Target cells for 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. **Science.** 206: 1188–1190, 1979.

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

THRAILKILL K. M. et al. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: A role in vitamin D deficiency? **J Clin Endocrinol Metab** 96: 142–149, 2011.

UMEZAWA, K.; ARIGA, A.; MATSUMOTO, N. Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF-κB functions. **Anticancer Drug Des**, v. 15, p. 239-244. 2000.

VALDIVIELSO, J. M. et al. Role of glomerular nitric oxide in glycerol-induced acute renal failure. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 78, n. 6, p. 476-482, 2000.

VANHOLDER, R. et al. Rhabdomyolysis. **J Am Soc Nephrol** 11: 1553–1561, 2000.

WATANABE, T. Rhabdomyolysis and acute renal failure in children. **Pediatr Nephrol**, v. 16, n. 12, p. 1072-1075, 2001.

WATEMBERG, N. et al. Acute pediatric rhabdomyolysis. **J. Child Neurol**, v. 15, n. 4, p. 222-227, 2000.

WESTENFELDER, C. et al. Renal tubular function in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney Int.** v. 18, n. 4, p. 432-444, 1980.

WOLFERT, A. I.; OKEN, D. E. Glomerular hemodynamics in established glycerol-induced acute renal failure in the rat. **J Clin Invest**, v. 84, n. 6, p. 1967, 1989.

XU, S. et al. Vitamin D3 pretreatment regulates renal inflammatory responses during lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 18687, 2015.

ZAGER R. A. Myoglobin depletes renal adenine nucleotide pools in the presence and absence of shock. **Kidney Int.** 39:111-119, 1991.

ZAGER R. A. Rhabdomyolysis and myoglobinuric acute renal failure. **Kidney Int.** 49:314-326, 1996.

ZHANG Z. et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy blockade of compensatory renin increase. **Proc Natl Acad Sci USA.** 14;105(41):15896-901, 2008.

ANEXO

ANEXO A- Protocolo de ética experimental

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Efeito da Vitamina D na lesão renal provocada por rabdomiólise em ratos*", registrado com o número **186/2016**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 31 de outubro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 50 ratos Wistar machos pesando 180g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 31/10/2016 a 05/12/2018.

We certify that the Protocol *n° 186/2016*, entitled "*Effect of Vitamin D in renal injury in rats caused by rhabdomyolysis*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/31/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 50 male Wistar rats weighing 180g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/05/2018.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2016

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