JANAÍNA GARCIA GONÇALVES

Bloqueio da ativação do receptor do EGF em ratos deficientes em vitamina D
submetidos à nefrectomia 5/6: efeitos do tratamento duplo losartana/erlotinib na
formação de fibrose renal

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Nefrologia
Orientador: Dr. Rildo Aparecido Volpini

SÃO PAULO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Janaína Garcia
Bloqueio da ativação do receptor do EGF em ratos
deficientes em vitamina D submetidos à nefrectomia
5/6 : efeitos do tratamento duplo
losartana/erlotinib na formação de fibrose renal /
Janaína Garcia Gonçalves. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Rildo Aparecido Volpini.

Descritores: 1.Fibrose 2.Insuficiência renal
crônica 3.Progressão da doença 4.Deficiência de
vitamina D 5.Sistema renina-angiotensina-
aldosterona 6.Inibidores do crescimento 7.Inflamação
8.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-201/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM12), Departamento de Nefrologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio à pesquisa (Proc.: nº 2018/12297-1 e nº 2015/05513-1).

Dedicatória

À minha mãe, Marlice Garcia Lopes Gonçalves (*in memoriam*), a quem sempre terei como fonte de inspiração pelo exemplo de vida e amor. De onde estiver, ela estará celebrando mais uma conquista nossa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, **Dr. Rildo Aparecido Volpini**, exemplo de retidão e dedicação à pesquisa. Nosso convívio me proporcionou tantas histórias, viagens, risadas e alegrias nesses últimos anos... um aprendizado imensurável. Não estaria defendendo essa tese sem seu suporte, incentivo e ensinamentos.

Às minhas amigas do laboratório, **Dra. Ana Carolina de Bragança Viciania** e **Dra. Daniele Canale**. Minha trajetória ao longo desses últimos anos se mescla ao nosso convívio e troca. Sou muito grata por todo o aprendizado que vocês tão generosamente me proporcionaram. E certamente, levarei a amizade de vocês para a vida toda.

À querida **Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu**, que sempre me acolheu como filha. Sua presença tornou o caminho mais leve e divertido.

A toda equipe do LIM-12 (**Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro, Prof. Dr. Antonio José de Barros Magaldi, Eloá Neves, Nivaldo Francisco da Silva e Denise Ariane de Jesus**) pela solicitude e suporte administrativo. O apoio de vocês foi crucial ao longo dessa caminhada.

Ao meu pai **Joaquim**, por ter me incentivado no caminho dos estudos e da ciência, desde a tenra infância... seu apoio e presença fizeram toda a diferença.

A minha irmã **Jaciara**, por trazer ao mundo meu amado sobrinho e afilhado **Bernardo**. Eles me lembram que a vida sem raízes não tem sentido e que nossas conquistas merecem ser compartilhadas.

Ao meu doce parceiro e amigo **Thiago Albuquerque da Silva**, com quem venho dividindo as alegrias e dificuldades da minha jornada. Sua gratidão pela vida e seu

tão evidente entusiasmo pela ciência e pelos estudos me trouxeram outra visão da beleza da pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho, enfermeiras queridas e técnicos de enfermagem, por fazerem meu dia sempre melhor. O trabalho nem sempre foi fácil, porém certamente foi mais prazeroso e produtivo devido a todos vocês. Em especial aos meus queridos amigos do Hospital Brigadeiro, Hospital 9 de Julho, Hospital São Luiz e da Clínica INEDI.

E finalmente, a todos meus amigos... mesmo aqueles que não participaram ativamente desse momento. Sou muito grata pelos grandes e fiéis amigos que a vida me proporcionou. O convívio com vocês me tornou uma pessoa melhor. Em especial, agradeço a **Carolina Sarmiento Duarte, Vander Emiro Muniz, Giselle de Barros Silva** ('comadre' que me agraciou com a honra de ser madrinha do Bernardo), **Lidiane Soares Campos, Luiza Karla R. P. de Araújo, Eliana Candido da Silva, Alessandra Correa Pereira, Flávio Roberto Abs de Lima e Muna Badaoui** pela convivência, apoio e por me 'suportarem' nos momentos mais difíceis.

“Há momentos assim na vida, em que nos sentimos tão próximos da beleza e da verdade que todo o resto parece irremediavelmente fútil.

Acredito, pelo que aprendi, experimentando, que viver é largar e seguir em frente. Mesmo que em frente esteja apenas o incerto, o desconhecido, o não vivido. Aprendi também que vemos o que vemos, o que queremos ver e o que ninguém mais enxerga. Vemos tanto mais quanto a nossa disponibilidade de ver: viajamos para dentro de nós, primeiro que tudo”.

Livro: Não se encontra o que se procura (Miguel Sousa Tavares)

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

Fundamentação do projeto de pesquisa

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença Renal Crônica: um grave problema de saúde global	1
1.1.1 Mecanismos e fatores de progressão da DRC	2
1.2. Vitamina D, Klotho e FGF-23.....	8
1.3. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, deficiência de vitamina D e progressão de DRC.....	10
1.4 Papel do fator de crescimento epidérmico (EGF) e seu receptor na progressão da DRC: conhecendo o eixo.....	12
1.5. Conhecimento atual sobre o Erlotinib: inibidor seletivo do EGFR	15
2. OBJETIVO.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. Grupos experimentais	18
3.2. Representação Esquemática do Protocolo Experimental.....	20
3.3. Estudos de Gaiola Metabólica	20

3.4. Determinação da pressão arterial média e taxa de filtração glomerular.	20
3.5. Análises Bioquímicas	21
3.6. Análise Histomorfométrica	23
3.6.1. Área Intersticial Relativa (AIR)	22
3.7. Análise Imuno-histoquímica	23
3.8. Análise da expressão proteica	24
3.9. Análise Estatística	25
4. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO.....	64
7. ANEXOS.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

25(OH)D	Calcidiol ou 25-hidroxivitamina D
1,25(OH) ₂ D	Calcitriol ou 1,25-diidroxivitamina D
ADAM17	Desintegrina e metaloproteinase 17
α -SMA	Alfa-actina de músculo liso
AIR	Área intersticial relativa
Ang II	Angiotensina II
AT1R	Receptor do tipo 1 da angiotensina II
AT2R	Receptor do tipo 2 da angiotensina II
CD68+	Células ED-1 positivas ou conjunto de macrófagos dos subtipos M1 e M2
CD206+	Células que expressam receptor de manose; macrófagos do subtipo M2
C _{in}	<i>Clearance</i> de Inulina
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DBP	Proteína ligante da vitamina D
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPM	Erro Padrão Médio
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1	Endotelina-1
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos-23
HB-EGF	Fator de crescimento epidérmico ligado à heparina
IL-1	Interleucina-1
INF- γ	Interferon-gama

IRA	Injúria Renal Aguda
LPS	Lipopolissacáride
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
NaPi-2a	Cotransportador sódio/fósforo do subtipo 2a
N+D	Rato deficiente em vitamina D submetido a nefrectomia 5/6
N+D+L	Rato deficiente em vitamina D submetido a nefrectomia 5/6 e tratado com losartana
N+D+E	Rato deficiente em vitamina D submetido a nefrectomia 5/6 e tratado com erlotinib
N+D+L+E	Rato deficiente em vitamina D submetido a nefrectomia 5/6 e tratado com losartana e erlotinib
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PAM	Pressão arterial média
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PC	Peso Corpóreo
p-EGFR	Forma fosforilada do receptor do fator de crescimento epidérmico
P _{Ca}	Concentração plasmática de cálcio total
P _K	Concentração plasmática de potássio
P _{Mg}	Concentração plasmática de magnésio
P _{Na}	Concentração plasmática de sódio
P _P	Concentração plasmática de fósforo
PTH	Paratormônio
SDS-Page	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
STAT-1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
TACE	Enzima conversora do fator de necrose tumoral-alfa
TCR	<i>T cell receptor</i>
TFG	Taxa de filtração glomerular
TIMP	Inibidor das metaloproteinases de matriz

TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TGF- α	Fator de crescimento transformador-alfa
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador- β 1
TGFR1	Receptor do tipo 1 do fator de crescimento transformador- β
U _{Prot}	Excreção urinária de proteínas
VDR	Receptor de vitamina D
Vitamina D2	Ergocalciferol
Vitamina D3	Colecalciferol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mediadores canônicos e vias moleculares na fibrose renal	06
Figura 2.	Mudanças nos fatores reguladores de fósforo durante a progressão da doença renal crônica.....	10
Figura 3.	Vias de sinalização ativadas pela angiotensina II durante o desenvolvimento da doença renal	14
Figura 4.	Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada pelo clearance de inulina....	26
Figura 5.	Pressão arterial média e concentração plasmática de aldosterona	27
Figura 6.	Concentração plasmática de PTH intacto	28
Figura 7.	Concentração plasmática de FGF-23	29
Figura 8.	Gráfico ilustrativo da relação entre TFG e concentração plasmática de PTH e FGF-23	30
Figura 9.	Proteinúria	31
Figura 10.	Área intersticial relativa	32
Figura 11.	Células CD68 positivas	34
Figura 12.	Células CD206 positivas	35
Figura 13.	Gráfico ilustrativo do balanço de macrófagos M1 e M2	36
Figura 14.	Células T CD3 positivas	37
Figura 15.	Avaliação semiquantitativa da expressão proteica de TGF- β 1	38
Figura 16.	Imunolocalização de TGF- β 1 no córtex renal	40
Figura 17.	Quantificação de TGF- β 1 (ELISA) em tecido renal	41
Figura 18.	Imunolocalização de TACE no córtex renal	42
Figura 19.	Imunolocalização de TGF- α no córtex renal	43
Figura 20.	Quantificação de EGF (ELISA) em tecido renal	44
Figura 21.	Imunolocalização de EGFR no córtex renal	45
Figura 22.	Avaliação semiquantitativa da expressão proteica de p-EGFR	46
Figura 23.	Imunolocalização de fibronectina no córtex renal	47
Figura 24.	Quantificação de colágeno III (ELISA) em tecido renal	48

Figura 25.	Imunolocalização de α -SMA no córtex renal	50
Figura 26.	Imunolocalização de vimentina no córtex renal	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal, ingestão de água, volume urinário e parâmetros funcionais/hemodinâmicos.....	65
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos.....	66
Tabela 3. Avaliação da expressão proteica pelos métodos de <i>Western blot</i> e ELISA	67
Tabela 4. Análise histo-morfológica e avaliação imuno-histoquímica.....	68

RESUMO

Gonçalves JG. *Bloqueio da ativação do receptor do EGF em ratos deficientes em vitamina D submetidos à nefrectomia 5/6: efeitos do tratamento duplo losartana/erlotinib na formação de fibrose renal [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Na maioria dos países, a incidência e prevalência da doença renal crônica (DRC) vem aumentando ao longo dos anos. Embora tenha havido uma melhora significativa no manejo da DRC com os inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a doença ainda é progressiva, levando a necessidade do surgimento de novas estratégias protetoras. A fibrose renal progressiva está presente na DRC e envolve a participação de várias citocinas, com destaque para a via de sinalização canônica do *TGF- β 1*. O ambiente inflamatório também exerce papel crucial na progressão do processo fibrótico. Contudo, os mecanismos de progressão da DRC são ainda pouco entendidos e a integração entre as vias moleculares relacionadas segue desconhecida. Estudos recentes indicam a participação de vias alternativas no mecanismo de formação de fibrose. Neste nosso estudo, além dos mecanismos inflamatórios, analisamos a participação da via do fator de crescimento epidérmico (EGF) na progressão da DRC. Tendo em vista o papel essencial da vitamina D na manutenção de diversas funções fisiológicas, além da observação da queda dos níveis deste hormônio na DRC, nosso objetivo foi estudar os efeitos de um inibidor do receptor do EGF (erlotinib) e da losartana, um bloqueador do receptor do tipo 1 da angiotensina II (AT1R), em um modelo experimental de DRC já bem estabelecido associado a um fator de risco não tradicional, a hipovitaminose D (D). Para essa análise, ratos Wistar deficientes em vitamina D e submetidos a nefrectomia 5/6 (N) foram acompanhados por 90 dias e alocados para recebimento de losartana, erlotinib ou ambas as medicações nos últimos 53 dias. O protocolo em questão mostrou que os animais N+D apresentaram

aumento dos níveis de pressão arterial média e aldosterona, redução no clearance de inulina, aumento da proteinúria e elevação dos níveis plasmáticos de PTH e FGF-23. Além disso, foi observada expansão da área intersticial, aumento do infiltrado de macrófagos e células T e elevação da expressão de fatores relacionados à formação de fibrose, tais como TGF- β 1, TACE, TGF- α , EGF e da forma fosforilada do EGFR. Ainda neste grupo de animais, observamos maior expressão de componentes de matriz extracelular (colágeno III e fibronectina) e de marcadores de alteração fenotípica (vimentina e α -SMA). Nos grupos submetidos ao tratamento com losartana ou erlotinib, foi observada a prevenção de alterações túbulo-intersticiais crônicas importantes (fibrose renal e infiltrado inflamatório). Entretanto, nossos resultados mostram que o tratamento duplo com losartana e erlotinib foi mais efetivo na prevenção da ativação e/ou expressão de fatores relacionados ao desenvolvimento de lesões morfológicas renais. Em suma, nosso estudo demonstra o papel relevante da via alternativa do EGF na formação de fibrose, sugerindo que novas estratégias terapêuticas devam ser consideradas para mitigar a DRC progressiva.

Descritores: Fibrose; Insuficiência renal crônica; Progressão da doença renal; Deficiência de vitamina D; Sistema renina-angiotensina; Inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico; Inflamação; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Gonçalves JG. *Blockade of EGF receptor activation in vitamin D-deficient rats submitted to 5/6 nephrectomy: effects of the dual treatment losartan/erlotinib on renal fibrosis formation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

In most countries, the incidence and prevalence of chronic kidney disease (CKD) have been increasing over the years. Although there has been a significant improvement in the management of CKD with renin-angiotensin-system inhibitors, the disease is still progressive, leading to the need for new protective strategies. Progressive renal fibrosis is present in CKD and involves the participation of several cytokines, especially the TGF- β 1 canonical pathway. The inflammatory environment also plays a crucial role in the progression of fibrotic process. However, the mechanisms of CKD progression are still poorly understood and the integration among the related molecular pathways remains unknown. Recent studies indicate the role of alternative pathways in the mechanism of fibrosis formation. In our study, in addition to the inflammatory mechanisms, we analyzed the participation of the epidermal growth factor (EGF) pathway in CKD progression. Given the essential role of vitamin D in various physiological functions as well as the observation of the drop in its levels in CKD, our objective was to study the effects of an EGF receptor inhibitor (erlotinib) and losartan, a blocker of type 1 angiotensin II receptor (AT1R), in an experimental model of CKD associated with hypovitaminosis D (D). For this analysis, vitamin D deficient Wistar rats submitted to 5/6 (N) nephrectomy were followed for 90 days and allocated to receive losartan, erlotinib or both medications for the last 53 days. Our results showed that N+D animals exhibited increased levels of mean arterial pressure and aldosterone, reduction in inulin clearance, increased proteinuria and plasma levels of PTH and FGF-23. In addition, we observed an expansion of the fractional interstitial area, increased infiltration of macrophages and T cells and increased expression of factors related to renal fibrosis formation (RFF),

such as TGF- β 1, TACE, TGF- α , EGF and p-EGFR. Furthermore, we observed a greater expression of extracellular matrix components (collagen III and fibronectin) and markers of phenotypic changes (vimentin and α -SMA) in N+D animals. In losartan- or erlotinib-treated groups, we observed prevention of important chronic tubulo-interstitial alterations (renal fibrosis and inflammatory infiltrate). Most importantly, our results show that the dual treatment with losartan and erlotinib was more effective in preventing activation and/or expression of factors related to the development of renal morphological lesions. In summary, our study demonstrates the relevant role of the EGF alternative pathway in RFF, suggesting that new therapeutic strategies should be considered to mitigate the progressive CKD.

Descriptors: Fibrosis; Renal insufficiency, chronic; Renal disease progression; Vitamin D deficiency; Renin-angiotensin system; Epidermal growth factor receptor inhibitor; Inflammation; Rats Wistar.

Fundamentação do projeto de pesquisa

A presente tese de doutorado deriva-se de minha dissertação de mestrado intitulada “Avaliação dos eventos envolvidos na evolução crônica da lesão renal aguda pós isquêmica em ratos com deficiência de vitamina D” (1) finalizada em agosto de 2014. Naquele trabalho, estudamos o papel da deficiência de vitamina D na progressão da doença renal crônica (DRC) em ratos que foram submetidos à injúria por isquemia/reperfusão renal. Dentre os vários achados, verificamos que a hipovitaminose D contribuiu ‘per se’ para o agravamento da lesão renal aguda pós isquêmica através da ativação de vias inflamatórias e com participação do fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1). Além disso, essas alterações estavam associadas às modificações túbulo-intersticiais crônicas importantes, caracterizadas principalmente pela presença de fibrose renal e infiltrado inflamatório do interstício. A deficiência de vitamina D induziu a queda da expressão do receptor de vitamina D (VDR) e intensificou as modificações da estrutura renal (1).

No mesmo período, nosso grupo de pesquisa também investigou o papel da deficiência de vitamina D nos modelos de injúria renal aguda isquêmica (2) e de nefrotoxicidade pelo antirretroviral Tenofovir (3). Ambos os trabalhos evidenciaram o agravamento da lesão renal pela hipovitaminose D, estando o primeiro possivelmente relacionado a interferências na expressão do inibidor de ciclo celular p21 e do VDR e, no modelo de nefrotoxicidade, associado a maior ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e aumento do estresse oxidativo (2, 3).

Mais recentemente, nosso laboratório avaliou a influência da deficiência de vitamina D em um modelo experimental de ablação renal 5/6 (N), objetivando um estágio moderado de DRC. De forma semelhante aos estudos pregressos, a hipovitaminose D foi um fator agravante em relação a recuperação renal nos ratos nefrectomizados em virtude de um pior controle pressórico, presença de disfunção endotelial e ativação de vias inflamatórias, maior expressão de componentes de

matriz extracelular (MEC) e de alteração fenotípica assim como maior expressão do fator de crescimento TGF- β 1 (4).

A partir destes resultados, surgiu o interesse em prosseguir com a linha de estudo do modelo de nefrectomia 5/6 associado a deficiência de vitamina D com o intuito de analisar outras vias de sinalização envolvidas na formação de fibrose renal. À luz dos conhecimentos atuais, sabe-se que nenhum tratamento efetivo foi capaz de pausar completamente a progressão da DRC (5). O bloqueio do SRAA com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou com bloqueadores dos receptores do tipo 1 da angiotensina II (AT1R) é considerado o pilar de tratamento na DRC (6, 7). Essas drogas retardam a perda da função renal principalmente reduzindo a pressão arterial e a proteinúria, apesar de que em muitos casos, a renoproteção completa não seja observada. Manobras de bloqueio duplo, combinando um inibidor da ECA com um bloqueador do receptor AT1R, ou até mesmo utilizando um inibidor da renina associado a um bloqueador da aldosterona, também não oferecem renoproteção total e podem, inclusive, piorar os efeitos colaterais tais como hipercalcemia, hipotensão e injúria renal aguda (IRA) (6, 7).

Dentre as vias de sinalização envolvidas na formação de fibrose, vários estudos experimentais sugerem que o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) teria papel importante na formação da fibrose renal (8-13). Yamamoto et al investigaram possíveis efeitos renoprotetores do erlotinib, um conhecido inibidor de tirosina-kinase do EGFR, em um modelo murino de nefrectomia 5/6 (14, 15). Os autores demonstraram neste elegante estudo que o tratamento com o erlotinib foi associado com redução na expressão de genes fibróticos (TGF- β e fibronectina) assim como suprimiu o recrutamento de macrófagos com a concomitante 'downregulation' de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os efeitos renoprotetores da droga foram independentes da redução nos níveis pressóricos (14).

A partir do acompanhamento desses artigos e prosseguindo com a linha de pesquisa do nosso laboratório, elaborou-se um projeto que investigasse os efeitos do erlotinib em uma via não canônica de desenvolvimento de fibrose renal,

representada pela via de sinalização do EGF (fator de crescimento epidérmico). Neste estudo atual, optamos pelo modelo de nefrectomia 5/6 associado à deficiência de vitamina D como fator de risco para DRC, utilizando o erlotinib isoladamente ou associado a losartana, um reconhecido fármaco renoprotetor.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica: um grave problema de saúde global

A DRC é um importante problema de saúde pública em todo o mundo e está associada com complicações graves bem descritas na literatura, incluindo risco aumentado de mortalidade e doença renal em estágio avançado, agravamento da doença cardiovascular, distúrbio mineral e ósseo, distúrbios metabólicos e nutricionais, infecções, função cognitiva reduzida e risco aumentado de IRA (16, 17). Estima-se que a mortalidade seja de 8 a 10 vezes maior nos pacientes portadores de DRC quando comparados aos não portadores desta enfermidade (16).

A DRC afeta cerca de 8 a 16% da população mundial e sua prevalência aumenta de 23,4 a 35,8% nos pacientes acima dos 64 anos (18). Há uma tendência alarmante de aumento da DRC avançada e tal fato se deve ao envelhecimento populacional e ao aumento da prevalência global de diabetes mellitus, hipertensão arterial, obesidade e doença cardiovascular (16, 19). Infelizmente, uma grande parcela dos pacientes desconhece seu próprio status de portador de DRC e muitos ainda não têm acesso à terapia renal substitutiva culminando em morte evitável devido à falta de tratamento adequado (diálise ou transplante renal) (17, 20).

Ao longo da última década, tem-se destacado o aumento no interesse sobre os fatores de risco relacionados à progressão da DRC. Tal fato deve-se à alta prevalência da DRC, seus custos elevados assim como risco de progressão para um estágio avançado com suas complicações cardiovasculares e risco de morte (21). Os fatores de risco tradicionais envolvidos na progressão da DRC são idade, gênero, etnia, história familiar de DRC, presença de diabetes mellitus, síndrome metabólica, proteinúria e hipertensão arterial. Estudos clínicos disponíveis

mostram que a hipertensão arterial sistêmica e a proteinúria teriam papel chave na fisiopatologia da progressão da DRC (22). Contudo o papel de cada um desses fatores na progressão da DRC ainda é incerto (21). Entretanto, os riscos tradicionais como doenças cardiovasculares e infecções explicam apenas metade das causas de mortalidade nesses pacientes, existindo no momento interesse em outros fatores de riscos não tradicionais, como, por exemplo, o status da vitamina D (1). Atualmente, os esforços têm se concentrado no sentido de entender a interconexão e o real papel fisiopatológico entre o metabolismo do fósforo, eixo FGF-23/Klotho, vitamina D e o SRAA no desenvolvimento da DRC (20).

1.1.1 Mecanismos e fatores de progressão da doença renal crônica

Durante a década pregressa, modelos conceituais distintos para DRC e IRA foram desenvolvidos para facilitar a abordagem em pesquisas clínicas e *trials*. Contudo, estudos epidemiológicos e mecanísticos sugerem que as duas síndromes não são entidades distintas e estão intimamente interconectadas (23, 24). Ou seja, a DRC é fator de risco para a IRA; a IRA é fator de risco para o desenvolvimento de DRC; e ambas são fatores de risco para a doença cardiovascular (23).

A DRC progressiva pode ser entendida através de três fases (5, 25-27). A primeira fase compreenderia a injúria inicial e a resposta aguda a tal agravo. Nesse período, entrariam em ação a ativação de células inflamatórias e das células epiteliais lesionadas. Essas células produziram não apenas fatores pró-inflamatórios mas também mediadores pró-fibróticos que culminariam com desdiferenciação epitelial (5). As células mesenquimais residentes e recrutadas (fibrócitos, fibroblastos e pericitos) e possivelmente as células epiteliais sofreriam transdiferenciação, tornando-se miofibroblastos contráteis produtores de MEC (5, 27). Na segunda fase, o reparo mal direcionado induziria disfunção e fibrose, porém, como parte de um processo auto-limitado com o intuito de cessar a injúria inicial. Na terceira fase, com o panorama de injúria grave ou persistente, o processo

de fibrose progrediria mesmo após a resolução da injúria inicial. Haveria, portanto, uma perda progressiva e estável dos néfrons remanescentes ao longo do tempo (18, 26, 28). Independente da doença renal primária, os mecanismos fisiopatológicos que causam a destruição progressiva do parênquima renal convergem em uma via comum caracterizada pela fibrose intersticial progressiva e perda de capilares peritubulares, causando hipóxia e destruição de néfrons funcionantes devido à atrofia tubular (5, 27).

A fibrose intersticial é característica da lesão renal crônica e está intimamente correlacionada com a deterioração da função renal (29). A resposta fibrogênica depende basicamente dos fibroblastos, considerados as células efetoras desse processo. Os fibroblastos sintetizam uma grande variedade de componentes da MEC, cuja regulação e indução são efetuadas por fatores de crescimento derivados de macrófagos e células tubulares (30). Esse processo caracteriza-se, de modo geral, pelo acúmulo de proteínas de MEC, como o colágeno (tipos I, III, V, VI), fibronectina, condroitina e heparan sulfato, dentre outros. O aumento da MEC não se relaciona apenas com aumento na síntese dessas proteínas, mas também pela diminuição na degradação das mesmas (31). A degradação do colágeno e de outras proteínas da MEC é realizada pelas metaloproteinases, que consistem em collagenases intersticiais produzidas por vários tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células sinoviais e algumas células epiteliais) (25, 31). O processo de remodelamento tecidual cicatricial inclui retração tecidual, resultado da ação de microfilamentos retráteis como a α -actina de músculo liso (α -SMA) e outras proteínas do citoesqueleto. Neste processo, os fibroblastos modificam seu fenótipo para miofibroblastos, que são reconhecidos pela presença de α -SMA (30). A origem dos fibroblastos e miofibroblastos é ainda incerta, podendo ser derivada dos fibroblastos intersticiais residentes e de células perivasculares ou através das células epiteliais tubulares, através de um processo de transdiferenciação. Essa transformação fenotípica é regulada por citocinas inflamatórias diversas como IL-1 (interleucina-1), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β , FGF (fator de crescimento de fibroblasto), dentre outros (30).

Várias citocinas parecem estar envolvidas na gênese e progressão do processo fibrótico, tais como o TGF- β , CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo), angiotensina II (Ang), endotelina-1 (ET-1), PDGF, EGF, dentre outros fatores (31). Sabe-se, contudo, que o TGF- β é a principal citocina pró-fibrótica envolvida na formação de fibrose na maioria das formas de DRC (28, 32). A inibição da isoforma TGF- β 1 ou de sua via de sinalização à jusante limita consideravelmente a formação de fibrose renal em vários modelos de doença associados à superexpressão desse fator de crescimento (33-35). O TGF- β 1 pode induzir a fibrose renal através da ativação da via de sinalização canônica (*Smad-based*) e de vias alternativas, não canônicas (*non-Smad based*), resultando na ativação de miofibroblastos, na produção excessiva de MEC e na inibição de degradação dessa matriz (28, 32). O papel das proteínas *Smad* na regulação da fibrose é complexo, demonstrando ações antagônicas pró e anti-fibróticas e com uma interação complicada entre TGF- β /*Smads* e outras vias de sinalização (32).

Referente a via de sinalização canônica, o TGF- β 1 age através da fosforilação e ativação das proteínas *Smad 2* e *Smad 3* pelo receptor do tipo 1 do TGF- β (TGFR1). A proteína *Smad 4* se liga ao complexo ativado *Smad2/3*, o que possibilita a translocação deste complexo até o núcleo com a subsequente transcrição de moléculas pró-fibróticas, incluindo a α -SMA, colágeno tipo I e o inibidor das metaloproteinases de matriz (TIMP), o que culmina com a ativação de miofibroblastos e deposição de MEC. A proteína *Smad7*, por outro lado, é um regulador negativo da ação do complexo ativado *Smad2/3*, competindo pela ligação ao TGFR1 ativado e, portanto, reduzindo a sinalização pela via TGF- β /*Smad* e inibindo o processo fibrótico. Vale destacar que a ativação do TGFR1 pelo TGF- β 1 pode também desencadear a atividade de vias alternativas de sinalização, independentes de *Smad*, com o intuito de modificação da função celular (figura 1) (28, 32).

O ambiente inflamatório também exerce papel crucial na progressão do processo fibrótico. É sabido que a inflamação geralmente precede a fibrose. O recrutamento de células inflamatórias ao sítio de injúria aguda é parte do processo

inicial de reparação tecidual (25). Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, absorvendo debris celulares e fagocitando corpos apoptóticos. Na sequência, macrófagos infiltram tecidos lesionados e secretam citocinas pró-fibróticas nesse processo, tais como TGF- β 1. Os linfócitos T e B são também recrutados ao sítio de injúria e facilitam a secreção adicional de citocinas fibrogênicas (25).

A infiltração macrofágica no rim é uma característica comum na DRC e há uma correlação entre este grau de infiltração e a severidade da lesão renal (36). A ativação e o estado funcional dos macrófagos dependem do estágio de lesão e reparo tecidual, refletindo um espectro dinâmico e diversificado de fenótipos de macrófagos (36, 37). De forma geral, os macrófagos podem ser classificados em dois subtipos, dependendo do seu microambiente local: macrófagos do tipo M1, ou classicamente ativados e macrófagos do tipo M2, de ativação alternativa (36). Os macrófagos M1 são considerados pró-inflamatórios devido a capacidade de liberar citocinas como interleucinas 1 e 6 e TNF- α e são produzidos após exposição a interferon-gama (INF- γ) ou lipopolissacáride (LPS). Por outro lado, os macrófagos M2 possuem função anti-inflamatória e expressam arginase, receptor de manose e interleucina-10, dentre outros. Além de citocinas inflamatórias, os macrófagos M2 também secretam componentes da MEC, o que confere a essas células a função de reparo e remodelamento tecidual (36).

Figura 1 – Mediadores canônicos e vias moleculares na fibrose renal. Vários estímulos prejudiciais convergem na via de sinalização do TGF- β , que tem efeitos pleiotrópicos dependentes do contexto e se conecta com outras vias relacionadas. AGEs, produtos finais de glicação avançada; BMP-7, proteína óssea morfogenética 7; FzR, receptor *frizzled*; HGF, fator de crescimento de hepatócitos; HIF, fator induzível por hipóxia; ROS, espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Vanhove, MD *et al.* Kidney Fibrosis: Origins and Interventions. *Transplantation*. 2017; Vol 101: 713 –726.

É importante ressaltar que evidências mais recentes sugerem um papel central do túbulo renal proximal na DRC progressiva (27, 38, 39). Sabe-se que as células epiteliais submetidas a injúria se desdiferenciam numa tentativa de reparo, estimulando o processo inflamatório e recrutando miofibroblastos. Além disso, a perda tecidual estimularia a hipertrofia dos néfrons remanescentes (27). A sobrecarga gerada pelo transporte tubular excessivo excederia a capacidade geradora de energia dos néfrons remanescentes levando ao metabolismo anaeróbico, acidose, hipóxia, reparo inadequado e respostas mal adaptativas, culminando em mais perda de néfrons e um ciclo vicioso de injúria e progressão da lesão renal (27, 38).

Embora os sinais do endotélio lesionado e células imunes/inflamatórias também contribuam, a injúria tubular *per se* é suficiente para produzir a patologia intersticial necessária para a formação de fibrose renal (39). A hipóxia produzida pela patologia microvascular pode também impedir a recuperação tubular (39). Contudo, a fibrose não é intrinsecamente progressiva e a patologia microvascular se desenvolve estritamente ao redor dos túbulos danificados. Portanto, a deterioração adicional da estrutura renal após a transição de IRA para DRC requer nova injúria renal aguda ou outros mecanismos de progressão (39). A severidade da IRA parece ser o fator de risco mais significativo para um pior desfecho a longo prazo (40, 41).

A progressão da DRC mostra-se consideravelmente variável entre os indivíduos e é afetada tanto pelos fatores de riscos tradicionais já conhecidos quanto por novas variáveis em estudo como FGF-23, metabolismo do cálcio e fósforo e adiponectina (18). Nesse contexto, estudos têm demonstrado que a hipovitaminose D está associada ao aumento da prevalência da proteinúria na população adulta em geral (1, 42, 43). Existem ainda grandes dificuldades no estabelecimento de uma terapia adequada para o controle da progressão da DRC considerando que tratamentos que podem ser vantajosos no curso inicial da doença, facilitando o reparo tecidual, podem ser deletérios em fases mais tardias da DRC. Além disso, não dispomos de biomarcadores acurados para essas diferentes fases de resposta à injúria (27). Embora a tentativa de bloquear o TGF- β 1 como terapia anti-fibrótica seja improvável de ser bem sucedida, visto que essa citocina está envolvida em outros processos fisiológicos relevantes, o entendimento sobre as várias vias pelas quais o TGF- β 1 controla o processo de fibrose renal pode identificar alvos alternativos para o desenvolvimento de novas terapias que contribuam para o retardo na progressão da DRC (28, 32). A habilidade para reconhecer tais preditores, mecanismos envolvidos e seu papel na progressão da DRC permitirá a identificação de pacientes de alto risco, uma melhor vigilância, permitindo um tratamento diferenciado e direcionado com intuito de redução na taxa de progressão da doença renal.

1.2 Vitamina D, Klotho e FGF-23

A vitamina D é um hormônio circulante no organismo responsável pela regulação de várias funções fisiológicas essenciais como a osteogênese e a manutenção da homeostase mineral. A síntese da vitamina D é um processo já bem conhecido que começa na pele e continua através do fígado e do rim até produzir a forma biologicamente ativa, a 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] ou calcitriol (44, 45). A deficiência da vitamina D é comum nos portadores de DRC, mesmo nas fases iniciais e aumenta com a progressão da doença (46, 47). A deficiência deste hormônio também tem sido relacionada ao aumento da prevalência da hipertensão, síndrome metabólica, resistência à insulina, obesidade, doença cardiovascular e albuminúria (48). Tal achado implica em aumento de morbidade e gera preocupação nos dias atuais. Além disso, a vitamina D vem recebendo atenção cada vez maior do meio científico e recentemente, tem sido avaliada quanto a um possível papel na progressão da doença renal (1, 49).

Com relação a produção da vitamina D, ambas as vitaminas D₂ e D₃ (ergocalciferol e colecalciferol, respectivamente) são transportadas pela α 1-globulina DBP (proteína ligante da vitamina D) até o fígado, onde passam pelo primeiro passo da hidroxilação, com a ação da enzima 25-hidroxilase, formando o composto 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], conhecido também como calcidiol (46, 50, 51). A 25(OH)D é a forma circulante no organismo e sua produção no fígado, além de rápida, sofre pouca regulação, refletindo a reserva corporal de vitamina D (52, 53). A conversão final, ou seja, a geração da forma biologicamente ativa ocorre principalmente nos rins, nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais, onde a 25(OH)D é novamente hidroxilada pela ação da enzima 1- α -hidroxilase, transformando-se em 1,25(OH)₂D ou calcitriol. Essa passagem renal, ao contrário da hepática, é estreitamente regulada por vários fatores. Entre eles destacam-se o paratormônio (PTH), o fósforo e o fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) (51).

O FGF-23 é uma proteína de 26 kDa, pertencente à família dos FGF, nesse caso específico à subfamília FGF-19, com composição de 251 aminoácidos. Ela é produzida principalmente no tecido ósseo pelos osteócitos e osteoblastos frente a elevação nos níveis séricos de fósforo, sendo também produzida por tecidos como fígado e rim (54). A atividade fosfatúrica do FGF-23 deve-se a sua propriedade em reduzir o número de cotransportadores sódio-fósforo do tipo 2a (NaPi-2a) na borda em escova dos túbulos proximais, promovendo a excreção renal de fósforo (54). Além disso, o FGF-23 suprime a síntese e promove degradação do calcitriol, estando relacionado com a *downregulation* do gene *Cyp27b1* que codifica a 1- α -hidroxilase, enzima que sintetiza o calcitriol e a *upregulation* da expressão do gene *Cyp24* que codifica a 24-hidroxilase, enzima que inativa o calcitriol (55-57). É importante destacar que para sua atividade biológica, o FGF-23 necessita da proteína Klotho como co-receptora obrigatória (58). O gene α -Klotho é expresso predominantemente nas células tubulares renais distais assim como nas células da glândula paratireóide e no plexo coróide. A α -Klotho é uma proteína multifuncional que regula o metabolismo do fósforo, cálcio e vitamina D, podendo também agir como um hormônio (59, 60).

Durante os estágios iniciais da DRC, o FGF-23 (e seu co-receptor obrigatório Klotho) evitam o desenvolvimento de hiperfosfatemia e do hiperparatireoidismo secundário devido à sua capacidade de aumentar a excreção de fósforo e inibir diretamente a produção do PTH (55). Além disso, o aumento nos níveis de FGF-23 leva a supressão da 1- α -hidroxilase e um aumento da 24-hidroxilase, com consequente redução na geração do calcitriol (61). Com o declínio da função renal, os níveis progressivamente elevados de FGF-23 não são mais suficientes para normalizar a fosfatemia, comportando-se como marcador de perda de massa renal e sobrecarga de fósforo (Figura 2) (55).

Figura 2 – Mudanças nos fatores reguladores de fósforo durante a progressão da doença renal crônica. O decréscimo nos níveis urinários de Klotho é a mudança mais precoce detectável nos estágios iniciais da DRC. O aumento nos níveis do FGF-23, o decréscimo da vitamina D e aumento do PTH precedem a hiperfosfatemia durante a progressão da DRC. Adaptado de Kuro-o M. Phosphate and Klotho. *Kidney Int.* 2011; 79 (Suppl 121): S20 – S23.

1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, deficiência de vitamina D e progressão de DRC

O SRAA é um dos mediadores centrais da injúria renal progressiva na DRC e está envolvido na deterioração renal mediada pela proteinúria e hipertensão arterial (62, 63). A Angiotensina II (Ang II) é o principal peptídeo vasoativo do SRAA, desempenhando papel fundamental no controle das funções cardiovascular e renal. Dentre as diversas funções, esse peptídeo participa da modulação da resistência arteriolar glomerular, do transporte iônico ao longo do néfron e da regulação do ciclo celular, induzindo proliferação ou hipertrofia, a depender dos fatores extracelulares envolvidos (64, 65). A Ang II, como fator de crescimento, estimula a proliferação celular e a hipertrofia mas também tem propriedades inflamatórias e pró-fibróticas significativas. Ela ativa fibroblastos intersticiais e células tubulares e mesangiais; aumenta a expressão e síntese das proteínas de MEC e pode se comportar como uma citocina pró-

inflamatória (22). Além disso, a All age no córtex da glândula adrenal, estimulando a liberação de aldosterona. A All e a aldosterona promovem inflamação renal, fibrose e injúria podocitária (66). Aliado a isso, a reação inflamatória nas regiões glomerulares e intersticiais com o envolvimento de macrófagos e linfócitos está comumente presente nas doenças renais (67).

Sabe-se também que a hiperatividade do SRAA pode resultar no desenvolvimento de alterações cardiovasculares tais como hipertensão arterial, hipertrofia miocárdica e aterosclerose assim como no desenvolvimento de lesões renais como glomeruloesclerose e DRC (68). A maioria das ações biológicas da All é desencadeada após a sua ligação com receptores do tipo AT1R, apesar dela também se ligar, com alta afinidade, em receptores do tipo 2 da All (AT2R). A ligação da All com o AT1R pode ativar vias clássicas de transdução de sinal, como ativação das fosfolipases A2, C e D; ativação de canais para cálcio do tipo L e inibição da adenilato ciclase, assim como pode ativar vias alternativas, como a fosforilação da proteína kinase Src e a ativação do EGFR, os quais estão envolvidos na via de sinalização da proteína kinase ativada por mitógeno (MAPK) após estímulo com All (69).

A All causa lesão renal através de alterações na hemodinâmica renal e estímulo ao crescimento tecidual e deposição de MEC, atuando principalmente como mediador canônico na via do TGF- β (10). Entretanto, a All também atua na via alternativa de formação de fibrose através da transativação de uma desintegrina e metaloproteinase (ADAM)17 – também conhecida como enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (TACE), e pela liberação do fator de crescimento transformador α (TGF- α), o qual se liga e ativa o EGFR, processo este ilustrado na figura 3 (10). Outro modulador humoral envolvido seria a aldosterona. Muito se discute atualmente quanto a participação da aldosterona nos mecanismos de fibrose renal e miocárdica. Dentre os vários mecanismos citados na literatura, há relato de que a aldosterona pode induzir disfunção mitocondrial das células epiteliais renais assim como estimular a expressão de citocinas pró-fibróticas, como o TGF- β 1, PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio-1), ET-1, osteopontina, entre outros

(70). Em 2012, Barrera-Chimal *et al* demonstraram que o tratamento de ratos Wistar com espironolactona (antagonista da aldosterona), antes ou após uma injúria isquêmica, preveniu o desenvolvimento subsequente de DRC por evitar a ativação de vias inflamatórias e fibróticas (71).

Outro aspecto relevante e atual é a interação entre o SRAA e as vias de sinalização da vitamina D. A deficiência de vitamina D tem ampla prevalência na população geral e principalmente nos pacientes portadores de DRC. Na DRC, os baixos níveis de calcitriol aumentam a produção de renina e a ativação subsequente do SRAA, e por outro lado, reduzem a expressão da proteína Klotho, co-fator do FGF-23 (1). Além disso, o aumento nos níveis de FGF-23 leva a supressão da 1- α -hidroxilase e consequente redução na geração do calcitriol (61). Em 2002, Li e *cols* demonstraram uma regulação negativa do gene da renina pela vitamina D, evidenciada pela supressão direta pela 1,25(OH)₂D da expressão e atividade do gene da renina em cultura de células (61, 72). A All, por sua vez, pode reduzir a expressão de Klotho através de seu receptor AT1R (73).

Os mecanismos de progressão das doenças renais são ainda pouco entendidos e a integração entre as vias moleculares relacionadas segue desconhecida. Contudo, existem evidências crescentes na literatura de que o desequilíbrio na interação entre vitamina D, FGF-23, Klotho e SRAA contribuiriam para a progressão da lesão renal (61, 73).

1.4 Papel do EGF e seu receptor na progressão da DRC: conhecendo o eixo

A relação entre os componentes do SRAA, EGFR e vitamina D também tem sido tema de interesse no estudo da progressão da doença renal (67). Estudos experimentais têm demonstrado que o bloqueio genético ou farmacológico do EGFR pode desacelerar a progressão da doença renal, principalmente pela redução da formação de fibrose renal (10, 11, 14, 66, 74).

Em relação ao SRAA, ambas All e aldosterona, após se ligarem aos seus respectivos receptores, podem transativar o EGFR via ADAM, regulando funções celulares tais como proliferação, hipertrofia e migração (Figura 3) (75-77). ADAMs são metaloproteases que atravessam a membrana citoplasmática envolvidas na clivagem de substratos extracelulares [via *shedding* (deslizamento)], incluindo a família de ligantes do EGF, sendo que essa clivagem pode ser tanto constitutiva assim como em resposta a algum estímulo regulatório (66, 78). No rim, a ADAM17, também conhecida como TACE, participa do processo de “deslizamento” dos ligantes do EGFR, e dentre os 12 descritos atualmente, apenas a anfiregulina, o CTGF, o fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF) e o TGF- α apresentam relevância na patologia renal (66). Os ligantes HB-EGF e TGF- α , por exemplo, estão envolvidos na transativação do EGFR induzida pela All nos rins, regulando a hipertrofia e a fibrose (Figura 3) (66). Recentemente foi demonstrado que a aldosterona também pode ativar o EGFR via “deslizamento” do eixo TACE/TGF- α , promovendo um aumento da produção de fatores pró-inflamatórios, além da regulação da proliferação celular e fibrose renal (66).

Estudos anteriores mostraram uma relação entre a vitamina D e as vias de sinalização do EGFR (66, 67). Tais achados mostraram que a vitamina D ou seus análogos podem promover alterações no tráfego do EGFR na membrana celular e consequente declínio na via de sinalização, sugerindo que o efeito antiproliferativo resultante possa ser mediado pela modulação do ciclo de crescimento autócrino do eixo TGF- α /EGFR (66). Essa modulação parece ser devida principalmente à estabilização da enzima TACE, que deixaria de “liberar” o TGF- α , evitando seu “deslizamento” para o EGFR, inibindo sua ativação (66, 67). Inclusive, a própria inibição da ativação do EGFR termina por diminuir a expressão de TACE nas células (66, 67). Como consequência, há interferência na ativação das vias proliferativas da quinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e STAT-1 (transdutor de sinal e ativador da transcrição-1) (66). Portanto, as propriedades anti-inflamatórias da vitamina D e de seus análogos podem ser mediadas pela inibição do eixo TACE/TGF- α /EGFR e das subseqüentes vias de sinalização, tais como ERK e STAT-1, relacionadas ao crescimento, proliferação e migração celular (66).

Desta maneira, acredita-se atualmente que a ativação do EGFR via TACE pela Ang II e/ou aldosterona seja uma importante causa da progressão da doença renal e não somente a hipertensão *per se* resultante da ativação do SRAA, como se pensava anteriormente (67). Esses achados indicam um papel crucial da transativação do EGFR-dependente de Ang II na deterioração renal e sugerem uma nova estratégia terapêutica a ser estudada na prevenção de progressão das doenças renais crônicas (10).

Figura 3 – Vias de sinalização ativadas pela angiotensina II durante o desenvolvimento da doença renal. A ligação da angiotensina II aos seus receptores heptahelicoidais AT1 causa a ativação da fosfolipase Cβ1 (PL Cβ1)-linked Gq/11 e a geração de diaciglicerol e trifosfato inositol – o que leva à ativação da proteína quinase C (PKC) e à liberação de cálcio dos estoques intracelulares. A transativação do receptor de EGF resulta na ativação das moléculas de sinalização como a cascata Ras-Raf-MEK-ERK, PI 3-K-Akt, m-TOR e fatores de transcrição, levando a proliferação e crescimento celular e desenvolvimento de lesões renais. Adaptado de Catt KJ. TACE-dependent EGF receptor activation in angiotensin-II-induced kidney disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006; Vol 27: 235 –237.

1.5 Conhecimento atual sobre o Erlotinib: inibidor seletivo do EGFR

O erlotinib (Tarceva®; OSI Pharmaceuticals, Inc., Melville, NY) é uma pequena molécula (peso molecular: 429,9 Da) que inibe seletivamente a atividade de tirosina kinase do EGFR. Foi aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA) em novembro de 2004 para uso oncológico como droga de segunda e terceira linha para tratamento do carcinoma pulmonar de pequenas células (15, 79).

A droga já tem uma farmacocinética bem estabelecida. Está disponível para administração oral, com biodisponibilidade média de 60% após sua administração. Sua concentração máxima no sangue ocorre após cerca de 2 – 4 horas com meia vida de 10 a 20h. A droga é encontrada ligada a proteínas plasmáticas, sendo 95% ligada principalmente a albumina e α -1 glicoproteína ácida. Sua metabolização é hepática, via citocromo CYP3A4, com excreção pelas fezes (68%) e urina (13%) (79).

As toxicidades não hematológicas mais comuns com o uso dos inibidores seletivos de EGFR foram *rash* cutâneo, diarreia, anorexia, fadiga, dispneia, náuseas e vômitos. Outros eventos adversos menos relatados foram tosse, estomatite, prurido, pele seca e conjuntivite (79). Há relatos também de elevação transitória de transaminases e bilirrubina. Não há relato de mielossupressão significativa com uso em monoterapia das drogas desta classe (erlotinib e gefitinib - Iressa®; AstraZeneca Pharmaceuticals, Wilmington, DE) (79).

Vários estudos analisaram o papel dos inibidores seletivos do EGFR no contexto renal. Dentre estes, um estudo publicado em 2016 demonstrou o papel relevante do EGFR na fibrose renal induzida pela AI, por mecanismos intracelulares desconhecidos (74). A inibição farmacológica deste receptor por pequenas moléculas (compostos AG1478, 451 e 557) atenuou as alterações morfológicas associadas à fibrose renal (74). Em outro estudo experimental, o EGF esteve relacionado ao desenvolvimento da injúria crônica do enxerto renal, caracterizada por fibrose intersticial e disfunção tubular (80). Rintala *et al* demonstraram que, em

ratos submetidos a transplante renal e em uso de ciclosporina isoladamente ou em associação com o erlotinib, o tratamento com inibidor do EGFR reduziu as alterações morfológicas crônicas e se associou a uma melhor função do enxerto (80). Mais recentemente, em 2017, Yamamoto *et al* investigaram possíveis efeitos renoprotetores do erlotinib em um modelo murino de nefrectomia 5/6 (14, 15). Como já mencionado anteriormente, o tratamento com o erlotinib atenuou a progressão da DRC, reduzindo a expressão de genes fibróticos, incluindo TGF- β e fibronectina. Além disso, diminuiu o recrutamento de macrófagos com a concomitante *downregulation* de citocinas pró-inflamatórias (14).

Em suma, o modelo experimental de nefrectomia 5/6 é um modelo clássico que mimetiza a DRC em humanos (81, 82). Estudos histológicos no rim remanescente após a ablação renal mostram uma resposta complexa identificada por três fases: fase hipertrófica, incluindo hipertrofia glomerular e dilatação tubular; fase quiescente, com alterações histológicas mínimas; e finalmente, a fase em que há o desenvolvimento de glomeruloesclerose segmentar e focal e fibrose túbulo-intersticial (83, 84). A hiperfiltração presente nesse modelo é a principal responsável pela hipertrofia glomerular e formação de glomeruloesclerose e as células inflamatórias, como os macrófagos, apresentam um papel fundamental na injúria renal induzida pela hiperfiltração glomerular observada na redução da massa renal pela ablação (85). Nosso objetivo foi estudar os efeitos de um inibidor do EGFR (erlotinib) e de um bloqueador do AT1R (losartana) em um modelo experimental de DRC já bem estabelecido associado a um fator de risco não tradicional, a hipovitaminose D. Além das vias inflamatórias, analisamos a via alternativa do EGF envolvida na formação de fibrose no curso da progressão da DRC associada a este modelo.

2. OBJETIVO

Geral:

Verificar os efeitos de um inibidor do EGFR (erlotinib) e de um bloqueador do AT1R (losartana), utilizados de forma isolada ou em associação, em ratos deficientes em vitamina D submetidos à nefrectomia 5/6 e analisar os eventos envolvidos na evolução da DRC.

Específicos:

1. Estudo da função e da hemodinâmica renal;
2. Analisar o metabolismo de cálcio, fósforo, PTH e FGF-23;
3. Estudar a ativação do SRAA e do eixo do EGF;
4. Analisar vias inflamatórias (infiltração de macrófagos/monócitos e células T);
5. Estudar a via do EGF como via alternativa de formação de fibrose renal.

3. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corpóreo entre 180-200g, obtidos do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do nosso laboratório em temperatura controlada ($23\pm1^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA – FMUSP, protocolo nº 122/16).

Os ratos foram alimentados com dieta depletada em vitamina D (0,4% Ca e 0,4% P) da marca MP Biomedicals (Irvine, CA, EUA) durante 90 dias. Os animais foram colocados em gaiolas coletivas onde receberam dieta e livre acesso à água. O balanço da ingestão de dieta e água e o peso dos animais foram verificados semanalmente.

3.1 Grupos experimentais

Foram estudados quatro grupos de animais:

- 1) **Nefrectomia 5/6 + deficiência de vitamina D (N+D):** ratos que receberam dieta depletada em vitamina D por 90 dias (n=10). No 30º dia foi feito o procedimento cirúrgico e o clearance de inulina foi realizado 60 dias após o mesmo.
- 2) **Nefrectomia 5/6 + deficiência de vitamina D + losartana (N+D+L):** ratos que receberam dieta depletada em vitamina D por 90 dias (n=8). No 30º dia foi feito o procedimento cirúrgico. Os animais receberam losartana potássica adicionada

a água (50mg/kg/dia) sete dias após a realização da nefrectomia 5/6 até o final do protocolo. O clearance de inulina foi realizado 60 dias após o insulto cirúrgico.

- 3) **Nefrectomia 5/6 + deficiência de vitamina D + erlotinib (N+D+E):** ratos que receberam dieta depletada em vitamina D por 90 dias (n=7). No 30º dia foi feito o procedimento cirúrgico. O inibidor erlotinib (Cayman Chemical, Michigan, EUA) foi administrado com uma injeção diária via intraperitoneal [6 mg/kg, diluído no solvente dimetilsulfóxido (DMSO)] sete dias após a realização da nefrectomia 5/6 até o final do protocolo. O clearance de inulina foi realizado 60 dias após o insulto cirúrgico.
- 4) **Nefrectomia 5/6 + deficiência de vitamina D + losartana + erlotinib (N+D+L+E):** ratos que receberam dieta depletada em vitamina D por 90 dias (n=10). No 30º dia foi feito o procedimento cirúrgico. Os animais receberam losartana potássica adicionada a água (50mg/kg/dia) e o inibidor erlotinib via uma injeção diária intraperitoneal (6 mg/kg) sete dias após a realização da nefrectomia 5/6 até o final do protocolo. O clearance de inulina foi realizado 60 dias após o insulto cirúrgico.

No 30º dia após o início da ingesta da dieta depletada em vitamina D, os ratos foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (250 mg/kg de peso corporal), via intraperitoneal e uma incisão abdominal foi feita para a cirurgia de ablação renal. Após a laparotomia, foram expostos os pedículos renais e realizada a nefrectomia total direita. Em seguida, foi realizada uma ligadura de duas ramificações da artéria renal esquerda (nefrectomia 5/6).

3.2 Representação Esquemática do Protocolo Experimental

3.3 Estudos de Gaiola Metabólica

Ao final dos 90 dias de acompanhamento experimental, os animais foram colocados em gaiola metabólica individual para a coleta de urina de 24 horas. O volume urinário, assim como o consumo de água foram avaliados gravimetricamente e as amostras de urina foram centrifugadas para remoção de material suspenso. A determinação da concentração urinária de proteína (U_{Prot}) foi realizada através de sistema colorimétrico usando kit comercial *Sensiprot* (LabTest, MG, Brasil).

3.4 Determinação da pressão arterial média e taxa de filtração glomerular (Clearance de Inulina)

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico 50 mg/Kg (Cristália, São Paulo, Brasil). A traqueia foi canulada com cateter PE-240 e a respiração foi mantida espontaneamente. A veia jugular foi canulada com cateter PE-60 para a infusão de

inulina e de fluidos. Para o controle da pressão arterial média (PAM) e para a coleta de amostras de sangue, a artéria carótida foi cateterizada com cateter PE-50. Para a coleta de amostras de urina, foi feita uma incisão abdominal e a bexiga do animal foi canulada com cateter PE-240. Após o procedimento cirúrgico, uma dose única de inulina (100 mg/kg diluída em 1 mL de solução salina a 0,9%) foi administrada pela veia jugular. Em seguida, uma infusão constante de inulina foi mantida (10 mg/kg em solução salina a 0,9%) em fluxo de 0,04 mL/min do início ao fim do experimento. Foram coletadas três amostras de urinas a cada 30 minutos e amostras de sangue no início e no fim do experimento. Os valores do clearance de inulina (C_{in}) representam a média de três períodos de experimento. As concentrações de inulina no sangue e na urina foram determinadas pelo método colorimétrico da Antrona. O clearance de inulina foi expresso corrigindo-se por 100 g de peso corpóreo (mL/min/100 g de peso corporal).

3.5 Análises Bioquímicas

Ao final do experimento de clearance, o sangue total dos animais foi colhido para as seguintes análises no plasma: sódio (P_{Na}) e potássio (P_K) por eletrodo de íon seletivo (ABL 800 FLEX – Radiometer, Copenhague, Dinamarca); cálcio total (P_{Ca}), fósforo (P_P) e magnésio (P_{Mg}) através de sistema colorimétrico usando kit comercial (LabTest, MG, Brasil).

Outras análises realizadas foram a concentração plasmática de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] e aldosterona, avaliadas pelo método de ELISA usando kit comercial *Rat 25OH Vitamin D* (Alpco®, NH, EUA) e *Rat Aldosterone* (Enzo Life Science®, NY, EUA), respectivamente. Os níveis de PTH intacto e FGF-23 plasmáticos também foram avaliados pelo método de ELISA usando os kits comerciais *Rat Bioactive Intact PTH* e *Mouse/Rat Bioactive Intact FGF-23* (Immutopics®, CA, EUA), respectivamente.

Após a coleta do sangue, o rim esquerdo foi perfundido com solução de tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). Um fragmento renal foi congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para análise da expressão de proteínas pela técnica de *Western blotting* ou ELISA. O fragmento restante foi fixado em solução de methacarn (60% metanol + 30% clorofórmio + 10% ácido acético) e mantido neste fixador por um período de 24 horas. Em seguida, o fixador foi substituído por álcool 70% e o tecido foi incluído em parafina e cortado em secções de 4 µm para estudos histomorfométricos e de imuno-histoquímica.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia com a infusão de uma dose letal do anestésico tiopental sódico e suas carcaças acondicionadas em embalagens plásticas próprias para congelamento e em seguida recolhidas para incineração.

3.6 Análise Histomorfométrica

As amostras de tecidos renais foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 4 µm, que foram corados pela reação de tricrômio de Masson para avaliação da área intersticial relativa e análise do comprometimento túbulo-intersticial.

3.6.1 Área Intersticial Relativa (AIR)

Cortes de 4 µm de espessura de tecido renal dos animais foram usados para análise do comprometimento túbulo-intersticial. Para o estudo de morfometria, as imagens obtidas pela microscopia óptica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (ZEN, Carl Zeiss, Munique, Alemanha). Foram analisados entre 30 campos de 0,09 mm² no córtex de cada rim.

As áreas intersticiais foram demarcadas manualmente e em seguida medidas de forma percentual em relação ao campo óptico, excluindo-se os glomérulos (1).

3.7 Análise Imuno-histoquímica

Os cortes de tecido renal foram submetidos à análise imuno-histoquímica para avaliação de macrófagos M1 e M2, células T, TGF- β 1, EGFR, TACE, TGF- α , fibronectina, α -SMA e vimentina com os seguintes anticorpos: (1/100) anti-CD68 (ED1 - AbD Serotec, Oxford, Reino Unido); (1/2000) anti-CD206 (Receptor de manose) e (1/400) anti-fibronectina-1 (Abcam, Cambridge, MA, EUA); (1/50) anti-CD3 (células T) e (1/50) anti-vimentina (Dako, Glostrup, Dinamarca); (1/500) anti-TGF- β 1, (1/30) anti-TGF- α e (1/25) anti-TACE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); (1/100) anti-EGFR (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); (1/200) anti- α -SMA (Alfa-actina do músculo liso - Millipore, Billerica, MA, EUA); por um período de 18 horas à temperatura de 4° C (*overnight*).

O produto dessa reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primário e secundário em solução de PBS contendo albumina bovina 1%. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz.

As avaliações das imunorreações foram feitas pelas proporções de volume de áreas positivas no tecido renal, determinadas pelo limite de cor. As fotomicrografias foram obtidas pelo software ZEN (Carl Zeiss, Munique, Alemanha) em um computador compatível ligado a uma câmera digital acoplada a um microscópio (Carl Zeiss Axioskop 40, Eching, Alemanha). A proporção de volume foi expressa como a área positiva (μm^2) para os diferentes marcadores e dividida pela área total do campo analisado (μm^2). Os resultados foram expressos como porcentagens (86).

3.8 Análise da expressão proteica

Para a realização da técnica de *Western blotting* e ELISA, foram utilizadas as amostras de tecido renal dos animais previamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C . A extração da proteína seguiu o protocolo descrito por Burnette (87), com pequenas modificações. As amostras dos tecidos renais foram homogeneizadas (Tissue Master TM125, Omni International, GA, EUA) em solução K-Hepes (20 mM Mannitol; 80 mM Hepes; 41 KOH, pH 7,5) com coquetel de inibidores de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 g por 15 minutos a 4°C para remover núcleo, mitocôndrias e resíduos celulares. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad, CA, EUA).

Western Blotting: As amostras foram separadas de acordo com o peso molecular em minigéis SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) em tampão de corrida (Tris/Glicina/SDS 10%, pH 8,3) e a transferência para membrana de nitrocelulose foi feita com tampão de transferência (Tris/Glicina/metanol 20%). A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em TBS-T (24,2 g Tris base, 29,2 g NaCl, 3,36 g EDTA para 1 L de água destilada) por uma hora. A incubação primária foi feita com anticorpos (1/250) anti-TGF- β 1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e (1/100) anti-EGFR fosforilado (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). A incubação secundária foi realizada com anticorpo (1/2.000) anti-coelho (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) também em solução de TBS-T com 0,1% de leite desnatado. O procedimento de detecção foi baseado em quimioluminescência (ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com anticorpo anti- β -actina (1/10.000; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). A semi-quantificação das proteínas foi feita pelo software Image J (NIH Image).

ELISA: Utilizamos os seguintes kits comerciais de ELISA para a quantificação de TGF- β , EGF e colágeno III: *Rat TGF- β 1*, *Rat EGF* e *Collagen type III (Col3)*, respectivamente (MyBioSource, San Diego, CA, EUA). O sistema de detecção e os cálculos de quantificação seguiram os protocolos descritos pelo fabricante. As leituras das absorbâncias foram obtidas utilizando-se o aparelho Epoch/2 (Biotek Instruments, Winooski, VE, EUA).

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância com comparações múltiplas *One-Way* ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas através do programa de estatística GraphPad Prism 5 e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com exceção dos dados referentes ao PTH e FGF-23 plasmáticos, os quais foram expressos como mediana. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os ratos do nosso protocolo não apresentaram diferença significativa em relação ao peso corporal (g) no decorrer dos três meses de observação (Seção anexos, tabela 1). Não houve diferença significativa nos parâmetros de ingestão de água (mL/24h) entre os grupos estudados (Seção anexos, tabela 1).

Os níveis plasmáticos da 25-hidroxivitamina D, forma circulante do hormônio, foram indetectáveis ($<0,44$ ng/mL) em todos os grupos estudados (N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E). Esses resultados confirmam a efetividade da dieta depletada em vitamina D oferecida aos animais na obtenção do modelo experimental de deficiência em vitamina D (Seção anexos, tabela 2).

A taxa de filtração glomerular (TFG), avaliada pelo clearance de inulina (mL/min/100g), mostra uma recuperação parcial da função renal nos grupos N+D+L e N+D+L+E ($0,63\pm0,04$ e $0,60\pm0,04$, respectivamente) em relação ao grupo N+D ($0,39\pm0,02$). O grupo N+D+E ($0,50\pm0,03$) demonstra uma tendência de recuperação da função renal, porém, sem significância. Esses resultados estão demonstrados na figura 4 e tabela 1 (Seção anexos).

Figura 4 - Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada pelo *clearance* de inulina de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p<0,001$ e ^b $p<0,01$ vs. N+D.

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, notou-se um decréscimo significativo na pressão arterial média (PAM) entre os grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E (108 ± 2 , 147 ± 4 e 107 ± 3 mmHg, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D (163 ± 4 mmHg). Os níveis de PAM do grupo N+D+E foram estatisticamente mais altos em relação aos grupos N+D+L e N+D+L+E. Esses dados estão demonstrados na figura 5 e tabela 1 (Seção anexos).

A dosagem de aldosterona plasmática (pg/mL) nos grupos N+D+L e N+D+L+E (1496 ± 319 e 1650 ± 252 , respectivamente) mostrou um decréscimo significativo dos níveis deste hormônio quando comparado com o grupo N+D (3692 ± 390). Tal decréscimo não foi evidenciado no grupo N+D+E (3266 ± 644). O grupo N+D+E apresentou níveis aumentados de aldosterona, de forma significativa, quando comparado aos grupos N+D+L e N+D+L+E. Os níveis de aldosterona plasmática estão representados na figura 5 e tabela 2 (Seção anexos).

Figura 5 – Pressão arterial média (A) e concentração plasmática de aldosterona (B) de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$ e ^c $p < 0,05$ vs. N+D; ^d $p < 0,001$ e ^f $p < 0,05$ vs. N+D+L; ^g $p < 0,001$ e ⁱ $p < 0,05$ vs. N+D+E.

A dosagem dos níveis séricos de eletrólitos – sódio (mEq/L); cálcio, fósforo e magnésio (mg/dL) - não evidenciou diferença estatística entre os grupos estudados. Em relação ao potássio (mEq/L), o grupo N+D+L+E apresentou níveis plasmáticos

mais elevados deste eletrólito, de forma significativa ($4,7 \pm 0,1$) quando comparado ao grupo N+D ($3,9 \pm 0,1$), porém, sem significado clínico (Seção anexos, tabela 2).

Avaliamos também as concentrações plasmáticas de PTH e FGF-23. Referente à concentração plasmática de PTH intacto, os animais do grupo N+D+L+E apresentaram um decréscimo significativo desse hormônio (365 ± 56) quando comparados ao grupo N+D (1296 ± 348). Os demais grupos N+D+L e N+D+E mostraram uma tendência de queda nos níveis do PTH (760 ± 118 e 602 ± 168 , respectivamente), porém, sem significância. Os níveis de PTH estão representados na figura 6 e tabela 2 (Seção anexos).

Figura 6 - Concentração plasmática de PTH intacto de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como mediana. ^bp<0,01 vs. N+D.

Não houve diferença dos níveis séricos de FGF-23 (pg/mL) nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($458,6 \pm 43,6$, $458,7 \pm 34,1$ e $403,7 \pm 37,5$, respectivamente) em relação ao grupo N+D ($529,8 \pm 40,2$). Os níveis de FGF-23 estão representados na figura 7 e tabela 2 (Seção anexos). Além disso, plotamos os dados da TFG (ml/min/100g) e das concentrações plasmáticas (pg/mL) de PTH e FGF-23 em um único gráfico para melhor visualização do conjunto de dados. A figura 8 ilustra essa relação entre a TFG e os hormônios PTH e FGF-23, mostrando simultaneamente

que houve uma melhora da TFG acompanhada da queda dos níveis de PTH nos grupos tratamento, principalmente no grupo N+D+L+E. Em relação à concentração plasmática do FGF-23, não observamos variações dos níveis deste hormônio entre os grupos tratamento a despeito das alterações observadas na TFG e no PTH.

Figura 7 - Concentração plasmática de FGF-23 de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como mediana.

Figura 8 – Gráfico ilustrativo da relação entre a taxa de filtração glomerular (TFG) e a concentração plasmática de PTH e FGF-23 de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Notar a melhora na TGF acompanhada do decréscimo nos níveis de PTH nos grupos N+D+L, N+D+E e principalmente no grupo N+D+L+E. Eixo y à esquerda representa a escala da TFG em mL/min/100 g de peso corporal. Eixo y à direita representa a escala da concentração plasmática (pg/mL) dos hormônios PTH e FGF-23. Valores expressos como média± EPM.

Nossos dados referentes à proteinúria (mg/24h) evidenciaram decréscimo significativo ($p < 0,001$) nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($13,8 \pm 1,3$, $15,8 \pm 1,5$ e $11,5 \pm 0,7$, respectivamente) em relação ao grupo N+D ($24,5 \pm 2,7$) (figura 9 e seção anexos, tabela 2).

Figura 9 – Proteinúria de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 vs. N+D.

Os estudos histomorfométricos foram realizados para investigar o acometimento do interstício renal com foco principalmente na formação de fibrose e presença de infiltrado inflamatório. A avaliação da AIR evidenciou, de forma significativa, prevenção das alterações morfológicas associadas a presença de infiltrado inflamatório e fibrose renal entre os grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E (13,14 $\pm$ 0,82, 14,71 $\pm$ 0,94 e 10,46 $\pm$ 0,41, respectivamente) em relação ao grupo N+D (22,56 $\pm$ 0,53). A redução da AIR no grupo N+D+L+E foi ainda mais evidente quando comparada aos grupos N+D+L e N+D+E. Os dados referentes a AIR estão representados na figura 10 e seção anexos, tabela 4.

Figura 10 – **Área intersticial relativa (%) no córtex renal.** (A) Gráfico de barras da área intersticial relativa de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a área intersticial é significativamente menor em N+D+L+E do que nos grupos N+D, N+D+L e N+D+E (400X). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$ vs. N+D; ^e $p < 0,01$ vs. N+D+L e ^g $p < 0,001$ vs. N+D+E.

Outra análise importante refere-se ao infiltrado inflamatório presente em nosso modelo. Avaliamos a expressão de células CD68+ (ou ED1+), referentes ao conjunto de macrófagos do tipo M1 e M2. Além disso, avaliamos a expressão de células CD206+, as quais são referentes somente ao subtipo de macrófago M2.

Referente a expressão de células CD68+, houve um decréscimo significativo entre os grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($0,75 \pm 0,03$, $0,69 \pm 0,04$ e $0,60 \pm 0,06$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($0,94 \pm 0,05$). A expressão de células CD206+ mostrou uma elevação significativa da expressão dos macrófagos do subtipo M2 nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($0,32 \pm 0,02$, $0,30 \pm 0,04$ e $0,41 \pm 0,05$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($0,11 \pm 0,01$). Os dados referentes as células CD68+ estão representados na tabela 4 (Seção anexos) e figuras 11 e 13 e os dados referentes as células CD206+ estão representados na tabela 4 (Seção anexos) e figuras 12 e 13.

Figura 11 – **Expressão de células CD68+ ou ED-1+ (%) no córtex renal.** (A) Gráfico de barras de células CD68+ de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de células CD68+ é menor nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E (400X). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 e ^cp<0,05 vs. N+D.

Figura 12 – **Expressão de células CD206+ (receptor de manose) (%) no córtex renal.** (A) Gráfico de barras de células CD206+ de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de células CD206+ é maior nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E (400X). Valores expressos como média± EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01 e ^cp<0,05 vs. N+D.

A figura 13 ilustra o balanço da expressão de células CD206+ em relação ao montante de células CD68+ demonstrando uma maior atividade do macrófago M2 frente à resposta inflamatória inicial promovida pelo macrófago M1 nos grupos N+D+L e N+D+E quando comparados com o grupo N+D. Além disso, observamos um predomínio da atividade do macrófago M2 no grupo N+D+L+E em relação ao grupo N+D.

Figura 13 – Gráfico ilustrativo do balanço da expressão de macrófagos M1 e M2 nos ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Notar que há um aumento da expressão do subtipo de macrófagos M2 nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E em relação ao grupo N+D. Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01 e ^cp<0,05 vs. N+D.

Prosseguindo na avaliação das células inflamatórias, a expressão de células T CD3+ foi reduzida de forma significativa entre os grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($0,50 \pm 0,06$, $0,58 \pm 0,04$ e $0,29 \pm 0,02$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($1,05 \pm 0,15$), conforme demonstrado na figura 14 e Seção anexos, tabela 4.

Figura 14 – **Expressão de células T CD3+ no córtex renal.** (A) Gráfico de barras de células T CD3+ de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de células T CD3+ é menor nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E (400X). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$ e ^b $p < 0,01$ vs. N+D.

A partir deste ponto, nossa proposta foi estudar os mediadores canônicos e alternativos envolvidos na formação da fibrose renal. Inicialmente, avaliamos a expressão de TGF- β 1, a mais importante e conhecida citocina pró-fibrótica. A expressão proteica do fator de crescimento TGF- β 1 (%), avaliada pelo método de Western blotting, estava diminuída de forma significativa nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($32,4\pm3,4$, $46,7\pm5,9$ e $32,5\pm3,6$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($100,2\pm2,8$), com uma tendência de queda maior nos grupos que receberam losartana (N+D+L e N+D+L+E). Os dados referentes a expressão proteica de TGF- β 1 encontram-se na figura 15 e Seção anexos, tabela 3.

Figura 15 – **Avaliação semiquantitativa da expressão proteica de TGF- β 1 no tecido renal.** (A) Gráfico de barras da expressão proteica de TGF- β 1 de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Foto ilustrativa da expressão proteica de TGF- β 1 e β -actina no tecido renal de ratos N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p<0,001$ vs. N+D.

Na análise imuno-histoquímica da expressão de TGF- β 1 no tecido renal, foi evidenciado um decréscimo significativo nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($1,90\pm0,29$, $1,84\pm0,45$ e $0,83\pm0,15$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($3,92\pm0,39$). O grupo N+D+L+E também apresentou redução significativa na expressão do TGF- β 1 em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 16 e Seção anexos, tabela 4).

Figura 16 – Avaliação imuno-histoquímica da expressão do TGF- β 1 no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de TGF- β 1 de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de TGF- β 1 é menor nos grupos N+D+L e N+D+E, e principalmente no grupo N+D+L+E (400X). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$ vs. N+D; ^b $p < 0,05$ vs. N+D+L; ^c $p < 0,05$ vs. N+D+E.

Por fim, realizou-se a quantificação de TGF- β 1 (pg/ μ g de prot) no tecido renal, determinada pelo método de ELISA, mostrando uma redução significativa deste fator no grupo N+D+L+E ($0,85\pm0,05$) quando comparado ao grupo N+D ($1,44\pm0,16$). Esses dados podem ser visualizados na figura 17 e Seção anexos, tabela 3.

Figura 17 – Quantificação de TGF- β 1 (ELISA) em tecido renal de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^cp<0,05 vs. N+D.

Posteriormente, avaliamos os componentes que integram a via de sinalização alternativa de formação de fibrose relacionada ao EGF. Na análise da expressão de TACE no tecido renal (% de área positiva), houve decréscimo significativo nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($2,82\pm0,29$, $2,49\pm0,23$ e $1,37\pm0,17$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($3,98\pm0,54$). O grupo N+D+L+E também apresentou redução significativa da expressão da TACE em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 18 e Seção anexos, tabela 4).

Em relação à avaliação imuno-histoquímica da expressão de TGF- α (% de área positiva), houve decréscimo significativo nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($0,84\pm0,15$, $1,62\pm0,33$ e $0,20\pm0,03$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($3,07\pm0,42$). Essa redução foi mais evidente no grupo N+D+L+E, o qual também apresentou redução significativa na expressão do TGF- α em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 19 e Seção anexos, tabela 4).

Figura 18 – **Avaliação imuno-histoquímica da expressão de TACE no córtex renal.** (A) Gráfico de barras da expressão de TACE de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de TACE é menor nos grupos N+D+L e N+D+E, e principalmente no grupo N+D+L+E (400X). Valores expressos como média± EPM. ^ap<0,001 e ^cp<0,05 vs. N+D; ^fp<0,05 vs. N+D+L; ⁱp<0,05 vs. N+D+E.

Figura 19 – **Avaliação imuno-histoquímica da expressão de TGF- α no córtex renal.** (A) Gráfico de barras da expressão de TGF- α de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de TGF- α é menor nos grupos N+D+L e N+D+E, e principalmente no grupo N+D+L+E (400X). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 vs. N+D; ^fp<0,05 vs. N+D+L; ^gp<0,001 vs. N+D+E.

Em sequência, avaliamos a quantificação do EGF e a expressão tecidual do EGFR e da forma fosforilada de seu receptor (p-EGFR). A quantificação do EGF (pg/ μ g de prot) em tecido renal mostrou uma redução significativa na concentração desse fator de crescimento no grupo N+D+L+E ($1,05\pm0,07$) quando comparado com o grupo N+D ($2,12\pm0,18$). Os grupos N+D+L e N+D+E apresentaram uma tendência de queda, não significativa ($1,44\pm0,27$ e $1,58\pm0,23$, respectivamente). Os dados referentes a quantificação do EGF estão representados na figura 20 e Seção anexos, tabela 3.

A análise imuno-histoquímica da expressão de EGFR no tecido renal demonstrou uma redução significativa na expressão deste receptor nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($1,50\pm0,17$, $1,79\pm0,09$ e $0,71\pm0,12$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($2,85\pm0,51$). Essa redução foi mais evidente no grupo N+D+L+E, o qual também apresentou redução na expressão do EGFR em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 21 e Seção anexos, tabela 4).

Figura 20 – Quantificação do EGF (ELISA) em tecido renal de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^b $p < 0,01$ vs. N+D.

Figura 21 – **Avaliação imuno-histoquímica da expressão do EGFR no córtex renal.** (A) Gráfico de barras da expressão de EGFR de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de EGFR é menor nos grupos N+D+L e N+D+E, e principalmente no grupo N+D+L+E (400X). Valores expressos como média± EPM. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$ e ^c $p < 0,05$ vs. N+D; ^f $p < 0,05$ vs. N+D+L; ⁱ $p < 0,05$ vs. N+D+E.

O último componente da via do EGF avaliado foi a expressão da forma fosforilada do receptor deste fator de crescimento. A expressão proteica do p-EGFR (%) estava diminuída de forma significativa nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($70,7 \pm 2,8$, $88,5 \pm 4,4$ e $59,2 \pm 3,1$, respectivamente) quando comparado ao grupo N+D ($100,2 \pm 2,5$). O grupo N+D+E não apresentou decréscimo na expressão do p-EGFR em comparação com o grupo N+D+L. O grupo N+D+L+E apresentou redução significativa da expressão do p-EGFR, quando comparado com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 22 e Seção anexos, tabela 3).

Figura 22 – **Avaliação semiquantitativa da expressão proteica de p-EGFR no tecido renal.** (A) Gráfico de barras da expressão proteica da p-EGFR de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Foto ilustrativa da expressão de p-EGFR e β -actina no tecido renal de ratos N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$ e ^c $p < 0,05$ vs. N+D; ^d $p < 0,001$ e ^f $p < 0,05$ vs. N+D+L; ^g $p < 0,001$ vs. N+D+E.

Figura 23 – **Avaliação imuno-histoquímica da expressão de fibronectina no córtex renal.** (A) Gráfico de barras da expressão de fibronectina de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de fibronectina é menor nos grupos N+D+L e N+D+E, e principalmente no grupo N+D+L+E (400X). Valores expressos como média± EPM. ^ap<0,001 vs. N+D; ⁱp<0,05 vs. N+D+L; ^jp<0,05 vs. N+D+E.

Na análise imuno-histoquímica da expressão de fibronectina, houve decréscimo significativo nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($3,67\pm0,31$, $3,33\pm0,15$ e $2,49\pm0,13$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($7,40\pm0,50$). O grupo N+D+L+E também apresentou redução significativa na expressão de fibronectina em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 23 e Seção anexos, tabela 4).

A quantificação de colágeno III (pg/ μ g de prot) no tecido renal dos grupos N+D+L e N+D+L+E ($4,97\pm0,40$ e $3,81\pm0,25$, respectivamente) mostrou um decréscimo significativo dos níveis deste componente da MEC quando comparado com o grupo N+D ($6,36\pm0,30$). O grupo N+D+L+E também apresentou redução significativa na expressão de colágeno III em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 24 e Seção anexos, tabela 3).

Figura 24 – Quantificação de colágeno III (ELISA) em tecido renal de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p<0,001$ e ^b $p<0,01$ vs. N+D; ^f $p<0,05$ vs. N+D+L; ^h $p<0,01$ vs. N+D+E.

Na análise imuno-histoquímica da expressão de α -SMA, houve decréscimo significativo nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E ($2,33\pm 0,15$, $2,73\pm 0,21$ e $1,19\pm 0,07$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($4,09\pm 0,29$). O grupo N+D+L+E também apresentou redução significativa na expressão deste marcador de alteração fenotípica em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 25 e Seção anexos, tabela 4).

Finalizando, avaliamos a expressão de vimentina (% de área positiva) no córtex renal dos animais. Observamos um decréscimo significativo deste marcador de alteração fenotípica nos grupos N+D+E e N+D+L+E ($2,73\pm 0,22$ e $1,94\pm 0,15$, respectivamente) quando comparados ao grupo N+D ($3,85\pm 0,29$). O grupo N+D+L+E também apresentou redução significativa na expressão de vimentina em comparação com os grupos N+D+L e N+D+E (figura 26 e Seção anexos, tabela 4).

Figura 25 –Avaliação imuno-histoquímica da expressão de α -SMA no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de α -SMA de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de α -SMA é menor nos grupos N+D+L e N+D+E, e principalmente no grupo N+D+L+E (400X). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 vs. N+D; ^dp<0,001 vs. N+D+L; ^gp<0,001 vs. N+D+E.

Figura 26 – **Avaliação imuno-histoquímica da expressão de vimentina no córtex renal.** (A) Gráfico de barras da expressão de vimentina de ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E). (B) Fotomicrografias representativas do córtex renal de um rato N+D, N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Notar que a expressão de vimentina é menor no grupo N+D+E e principalmente no grupo N+D+L+E (400X). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$ e ^b $p < 0,01$ vs. N+D; ^d $p < 0,001$ vs. N+D+L; ⁱ $p < 0,05$ vs. N+D+E.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos do erlotinib (inibidor do EGFR) e da losartana (bloqueador do AT1R), utilizados de forma isolada ou em associação, em ratos deficientes em vitamina D submetidos à ablação renal. Nosso objetivo foi avaliar os eventos envolvidos na evolução da DRC, principalmente aqueles relacionados à via alternativa de formação de fibrose do EGF. Ao final do protocolo, os resultados mostraram que os animais do grupo N+D apresentaram aumento dos níveis de pressão arterial média e aldosterona, redução no clearance de inulina, aumento na excreção de proteínas urinárias e elevação dos níveis plasmáticos de PTH e FGF-23. Além disso, foi observada expansão da área intersticial, aumento do infiltrado de macrófagos e células T e aumento da expressão de fatores relacionados à formação de fibrose, tais como TGF- β 1, TACE, TGF- α , EGF e da forma fosforilada do EGFR. Ainda neste grupo de animais, houve maior expressão de componentes da MEC, como colágeno III e fibronectina e de marcadores de alteração fenotípica, como vimentina e α -SMA. Nos grupos submetidos ao tratamento com losartana ou erlotinib, foi observada a prevenção de alterações túbulo-intersticiais crônicas importantes, como presença de fibrose renal e infiltrado inflamatório do interstício. Mais importante, nossos resultados mostraram que o tratamento duplo com losartana e erlotinib foi mais efetivo na prevenção da ativação e/ou expressão de fatores relacionados ao desenvolvimento de lesões morfológicas renais no grupo N+D+L+E.

Estudos clínicos demonstram que a deficiência de vitamina D é comum nos portadores de DRC mesmo nas fases iniciais, aumentando com a progressão da DRC (46, 47). Contudo, nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente em um modelo murino de nefrectomia 5/6, que ratos sham e nefrectomizados acompanhados por 90 dias apresentam níveis suficientes de vitamina D (4). Ou seja, as alterações morfológicas e funcionais do rim naquele período estudado não foram suficientes para o desenvolvimento de hipovitaminose D no modelo animal

proposto. Portanto, foi utilizada uma dieta livre de vitamina D para a obtenção de um grupo nefrectomizado e depletado em vitamina D, adequado para o estudo realizado em 2018 (4). Em nosso protocolo atual, optamos pelo modelo de nefrectomia 5/6 acrescido da deficiência de vitamina D, como um fator de risco adicional à progressão da DRC – o que em nosso entendimento, assemelha-se ao que encontramos na prática clínica. Portanto, seguimos o protocolo de estudo anteriormente executado pela nossa equipe (4) em um modelo de progressão da DRC após nefrectomia 5/6 e ofertamos aos ratos uma dieta depletada em vitamina D. Os resultados dos níveis plasmáticos da 25(OH)D mostram que a dieta oferecida foi efetiva na obtenção do modelo experimental de deficiência em vitamina D, evidenciado pela observação de níveis plasmáticos indetectáveis deste hormônio ao método ao final dos 90 dias. Em nosso estudo não observamos diferença significativa nos parâmetros de peso corpóreo e ingestão de água ao longo do protocolo.

Além da dosagem de vitamina D, avaliamos os níveis plasmáticos de PTH intacto e FGF-23 nos animais estudados. Referente à concentração plasmática de PTH intacto, os animais do grupo N+D+L+E apresentaram um decréscimo significativo desse hormônio quando comparados ao grupo N+D, enquanto os demais grupos N+D+L e N+D+E mostraram uma tendência de queda nos níveis do PTH, sem significância. Arcidiacono *et al* demonstraram que a hiperplasia de paratireoide no contexto da DRC contribui para níveis elevados de PTH assim como uma supressão prejudicada do hiperparatireoidismo pelo cálcio, vitamina D e FGF-23 (88). Foi demonstrado experimentalmente que a inibição medicamentosa do EGFR atenuou a hiperplasia de paratireoide e a perda do receptor de vitamina D, restaurando a resposta a este hormônio (88). Em nosso modelo, verificamos que no grupo N+D+L+E houve uma redução significativa nos níveis de PTH, que poderia estar relacionada com a restauração dos níveis de receptor de vitamina D e pela *upregulation* nos níveis de Klotho secundário ao bloqueio pela losartana (73, 88, 89). Além disso, a avaliação dos níveis séricos de FGF-23 evidenciou uma tendência de queda não significativa nos níveis deste fator nos grupos tratados. Vale salientar que em nosso protocolo, existem algumas variáveis que podem ter

interferido na dinâmica entre os principais reguladores do metabolismo mineral e ósseo, incluindo o PTH, FGF-23 e vitamina D. Inicialmente, é importante destacar que nosso modelo experimental reflete um estágio moderado de DRC, portanto, não esperávamos alterações significativas no metabolismo mineral e ósseo. Outro aspecto relevante refere-se à dieta livre de vitamina D utilizada neste protocolo. Sabe-se que a hipovitaminose D em vigência de hipocalcemia está associada a redução nos níveis de FGF-23 e pode estimular de forma direta ou indireta na produção do PTH (54, 90, 91). Os níveis de FGF-23 se elevam precocemente no curso da DRC e estão associados com perda progressiva da função renal e mortalidade (54, 56). Tal tendência de queda nos níveis de FGF-23 se justificaria como uma resposta compensatória para evitar reduções adicionais no calcitriol, exacerbando a hipocalcemia esperada pela própria evolução da DRC. Considerando-se que a dieta utilizada em nosso estudo, além de ser totalmente depletada de vitamina D, apresenta baixos teores de cálcio (0,4%) e fósforo (0,4%), acreditamos ser essa uma explicação plausível para o resultado encontrado. Outra hipótese a ser melhor investigada futuramente seria uma possível redução nos níveis de PTH secundária a uma melhora na TFG pelo bloqueio duplo com losartana e erlotinib.

Em nossos parâmetros funcionais e hemodinâmicos, observamos que os grupos tratados com losartana (N+D+L e N+D+L+E) apresentaram recuperação da TFG quando comparados ao grupo N+D. O grupo N+D+E demonstrou uma tendência de recuperação da função renal, porém, sem significância. Em um estudo anterior do nosso grupo (4), verificamos queda da TFG e elevação nos níveis plasmáticos de ureia em ratos submetidos à ablação renal, com ou sem deficiência de vitamina D. Nesse estudo, de Braganca *et al* mostraram que a hipovitaminose D isoladamente não repercutiu na TFG dos ratos analisados. Entretanto, de forma contrária aos nossos achados, Gonçalves *et al*, também utilizando um modelo murino de nefrectomia 5/6, avaliaram a renoproteção oferecida pelo tratamento isolado ou em associação com losartana e uma droga anti-inflamatória (nitroflurbiprofeno) (92). Segundo os autores, não houve melhora da TFG nos grupos tratados com monoterapia (losartana ou nitroflurbiprofeno) e uma possível

explicação teria sido o início do tratamento após 30 dias da realização da ablação renal e o seguimento mais prolongado dos animais – cerca de 4 meses após a redução cirúrgica da massa renal (92). A ausência de melhora na TFG frente ao tratamento com inibidores do SRAA foi demonstrada no estudo acima citado e em outros estudos experimentais, sugerindo que tal achado ocorra devido a uma possível maior severidade da injúria renal associado a um início tardio de tratamento (92-94). Em nosso estudo, o modelo experimental configurou-se como um estágio moderado de DRC, no qual iniciamos tratamento precoce, após uma semana do insulto cirúrgico, o que justificaria a recuperação da TFG nos ratos tratados com losartana (N+D+L e N+D+L+E). Por outro lado, *Yamamoto et al* sugeriram uma melhora significativa da função renal, baseada na dosagem sérica de creatinina, em ratos nefrectomizados e tratados somente com erlotinib (14). Uma possível explicação para esse resultado discrepante em relação ao nosso protocolo teria sido o uso de uma dose maior do erlotinib (20mg/kg), além da ausência da hipovitaminose D, um fator de risco não tradicional associado à progressão da DRC. Nossos achados reforçam o importante papel da losartana como droga renoprotetora e sugerem um benefício hemodinâmico e funcional quando utilizado em estágios mais precoces da DRC.

Outro dado importante foi a redução significativa dos níveis de PAM nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E quando comparados ao grupo N+D, com a observação de uma queda mais expressiva nos grupos tratados com losartana. Além disso, observamos redução significativa dos níveis plasmáticos de aldosterona nos grupos N+D+L e N+D+L+E. A análise conjunta desses dados é sugestiva da participação do SRAA no aumento da PAM dos animais depletados em vitamina D submetidos ao insulto cirúrgico, os quais já foram inclusive descritos pelo nosso grupo de pesquisa (1, 3, 4). Além da participação da AII no controle da pressão arterial, estudos realizados em humanos e animais mostram fortes evidências de que a suficiência de vitamina D possa estar relacionada à diminuição na atividade do SRAA através da regulação negativa do gene da renina (61, 95, 96). Em 2002, *Li et al* demonstraram que camundongos *knockout* para VDR apresentavam expressão aumentada de renina e hipertensão e que estas alterações foram

suprimidas com a utilização de um análogo de vitamina D. Os autores também demonstraram que a 1,25(OH)₂D suprime diretamente a expressão e a atividade do gene da renina em cultura de células (72). Como já publicado em estudos anteriores do nosso grupo, os ratos deficientes em vitamina D demonstraram elevação significativa da PAM, aumento na expressão plasmática de aldosterona e na expressão gênica de componentes do SRAA (renina, angiotensinogênio e ECA) corroborando uma possível participação da deficiência de vitamina D na modulação da PAM (1, 3, 4).

Outro componente de destaque nos mecanismos de indução de fibrose renal seria a participação da aldosterona através do estímulo para expressão de citocinas pró-fibróticas como o TGF- β 1 e de um possível papel na ativação do EGFR (70). Em 2012, Barrera-Chimal *et al* demonstraram que o tratamento de ratos Wistar com um antagonista da aldosterona amplamente conhecido (espironolactona), antes ou após uma injúria isquêmica, preveniu o desenvolvimento subsequente de DRC, por evitar a ativação de vias inflamatórias e fibróticas (71). Morgado-Pascual *et al* demonstraram em cultura de células epiteliais tubulares que a aldosterona aumenta a expressão de TGF- α e HB-EGF, ambos ligantes do EGFR. Porém, apenas o TGF- α esteve envolvido na transativação do EGFR induzida pela aldosterona com subsequente proliferação celular e fibrose. A pré-incubação das células tubulares com paricalcitol, um agonista do VDR, inibiu a transativação do EGFR pela aldosterona, a *upregulation* de TGF- α e TACE e a maior expressão de fatores pró-inflamatórios (66). Em nosso protocolo, o tratamento com losartana esteve associado com queda significativa nos níveis de aldosterona, TACE e TGF- α , corroborando os achados na literatura de um possível papel da aldosterona na ativação do EGFR.

Estudos clássicos e mais antigos já demonstraram o relevante papel do bloqueio do receptor AT1R da AII na preservação da função renal, independente da dose utilizada e do efeito redutor pressórico (97-99). O bloqueio do SRAA também proporciona efeito protetor na função cardiovascular, como regressão na hipertrofia ventricular e redução na disfunção endotelial (100, 101). Nossos dados demonstram a eficiência do tratamento com losartana no controle da pressão arterial, não

sugerindo, contudo, ação do erlotinib no controle da PAM nos ratos estudados. Yamamoto *et al* não evidenciaram redução significativa da PAM em ratos submetidos à nefrectomia 5/6 e que receberam erlotinib. Esse estudo sugere que os efeitos renoprotetores da droga foram independentes do controle pressórico (14), o que corrobora os achados deste nosso protocolo. Ou seja, provavelmente a melhora encontrada nos parâmetros morfológicos nos grupos tratados com erlotinib não esteve associada com fatores hemodinâmicos, e sim à interferência nas vias de sinalização indutoras de fibrose.

Há várias linhas de evidência que demonstram a participação do SRAA, principalmente da All, nas alterações morfológicas da estrutura renal. Os mecanismos pelos quais a All promove fibrose renal permanecem compreendidos de forma incompleta (74). A All estimula tanto a via de sinalização do TGF- β assim como ativa o EGFR, entretanto, a contribuição relativa de cada uma dessas vias para o processo de fibrogênese é desconhecida (9, 102, 103). Em 2012, Chen *et al* evidenciaram o papel crucial das células epiteliais tubulares para a ativação do EGFR na fibrose túbulo-intersticial dependente de TGF- β . Neste estudo, foi demonstrado de forma pioneira que a ativação persistente do receptor da All estimulou a fosforilação de Src dependente de espécies reativas de oxigênio, conduzindo simultaneamente a uma sinalização prolongada do EGFR, independente de ligante, com subsequente ativação da expressão de TGF- β via ERK (9). Os autores identificaram que a fibrose tecidual mediada pelo TGF- β depende de um mecanismo de avanço (*feed-forward*) persistente da ativação do EGFR/ERK através de uma via de sinalização inesperada, destacando o EGFR como um alvo terapêutico potencial para modular a fibrogênese tecidual (9).

Referente aos nossos achados histológicos, observamos uma evidente redução da área intersticial relativa (fibrose e infiltrado inflamatório) nos grupos submetidos aos tratamentos medicamentosos, em especial na associação de losartana com erlotinib. Corroborando esses resultados, além da recuperação parcial e significativa da TFG nos grupos N+D+L e N+D+L+E e uma tendência de melhora no grupo N+D+E, houve uma redução significativa dos níveis de proteinúria nos grupos tratamento. Já é conhecido o papel da proteinúria como marcador de

disfunção e progressão da DRC (20). Assim como no nosso protocolo, Yamamoto *et al* encontraram uma menor excreção de proteínas urinárias em ratos nefrectomizados e tratados com erlotinib (14). Nossos resultados permitem concluir que o tratamento isolado com losartana ou erlotinib preveniu a lesão renal induzida pelo insulto da nefrectomia 5/6 associado à deficiência de vitamina D, com melhora significativa nos parâmetros morfológicos e funcionais. A associação entre os tratamentos com losartana e erlotinib foi ainda mais eficaz na melhora dos parâmetros analisados.

A citocina TGF- β é reconhecida como mediadora chave da fibrogênese (via canônica), estimulando diretamente a expressão das proteínas da MEC e promovendo transição epitélio-mesenquimal no rim(25). Em nosso trabalho, um importante resultado foi a redução significativa na expressão de TGF- β 1, que reforça a atenuação das modificações morfológicas presentes nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Além disso, observamos uma redução da expressão das proteínas da MEC (colágeno III e fibronectina), assim como a redução dos marcadores de alteração fenotípica mesenquimal (α -SMA e vimentina) no córtex renal dos ratos tratados. Entretanto, o foco principal deste nosso trabalho foi o de estudar uma outra via na qual a All está associada com a lesão renal. Neste caso, a via de interesse envolve a ativação da TACE e a liberação do TGF- α com subsequente ativação do EGFR e indução do processo fibrótico independente dos níveis pressóricos (10, 104).

A sinalização via receptor do EGF está envolvida na regulação de múltiplos processos biológicos, incluindo proliferação celular, metabolismo e diferenciação, tendo sido reconhecida como alvo terapêutico na terapia anti-câncer em virtude de sua expressão aberrante em vários tumores malignos (105). Nas duas últimas décadas, surgiram vários trabalhos que avaliaram o papel do EGFR na doença renal. Mais recentemente, vem-se acumulando evidências em estudos experimentais da participação deste mesmo receptor no desenvolvimento e progressão da DRC (103, 105). Os primeiros estudos demonstraram uma ação crítica e importante na regeneração renal e recuperação funcional após injúria renal aguda (105-107). Contudo, estudos mais atuais revelam que a ativação do EGFR

contribui para a patogênese da fibrose renal intersticial, de doenças glomerulares incluindo nefropatia diabética, nefropatia hipertensiva, glomerulonefrite e doenças tubulares como a doença renal policística (103, 105). Em 2012, Liu *et al* demonstraram que a inibição farmacológica ou queda da expressão gênica da atividade do EGFR reduziram significativamente a expressão da α -SMA e a deposição de proteínas da MEC como fibronectina e colágeno I no tecido renal (11).

Os ligantes do EGFR também têm sido associados à promoção de fibrose e deterioração renal. Neste nosso protocolo, investigamos os efeitos do erlotinib e da losartana na expressão de marcadores relacionados à via alternativa de formação de fibrose do EGF, ativada principalmente pela AII. Nossos estudos mostraram a princípio um aumento significativo da expressão de TACE e TGF- α no tecido renal dos animais do grupo N+D em relação aos demais grupos estudados. Essas alterações foram atenuadas pelos tratamentos com losartana e erlotinib isoladamente e prevenidas no grupo submetido ao duplo bloqueio. De maneira semelhante, Lautrette *et al* avaliaram a conexão entre o EGFR e a AII em um modelo murino transgênico expressando uma isoforma negativa de EGFR no qual os animais foram submetidos à nefrectomia unilateral. Os autores utilizaram um inibidor de metaloprotease específico para TACE (WTACE2) e fizeram bloqueio do receptor AT1 com uso de losartana. Eles demonstraram que a expressão de TGF- α e da sua *shedase* (TACE) foram aumentadas durante a infusão crônica com AII, o que resultou em glomeruloesclerose, atrofia tubular e dilatação com formação de microcistos e fibrose intersticial acompanhada de proteinúria grave nos animais selvagens. Porém, os camundongos que expressavam uma isoforma negativa para EGFR apresentaram proteção quanto a lesão renal durante infusão crônica de AII. Além disso, a inibição farmacológica com WTACE2 em camundongos selvagens também preveniu o acúmulo de TGF- α e TACE, evitando comprometimento do interstício renal após a realização da nefrectomia unilateral (10). Ou seja, nesse modelo de fibrose renal induzida por AII, observou-se um aumento do TGF- α e da sua *shedase* TACE, respectivamente. A deleção específica do TGF- α ou a inibição da clivagem do TGF- α através do uso de um inibidor específico de TACE reduziu de forma significativa o dano renal, sugerindo um papel da proteína TGF- α como

fator chave entre a sinalização da AII e a transativação do EGFR durante a nefropatia induzida pela AII, independente dos níveis pressóricos (10). Em nosso protocolo, também quantificamos o EGF, o EGFR e o p-EGFR no tecido renal dos diferentes grupos estudados. Foi demonstrado um aumento significativo na quantificação do EGF e da expressão do EGFR e do p-EGFR nos animais do grupo N+D. Os tratamentos isolados com losartana ou erlotinib atenuaram a expressão desses marcadores nos respectivos grupos estudados. Mais importante, o bloqueio duplo losartana+erlotinib preveniu de forma mais efetiva a expressão de EGF, EGFR e do p-EGFR. Ou seja, de forma concordante com os estudos experimentais já realizados por outros grupos, observamos uma redução significativa na expressão do TGF- α , da sua *shedase* TACE, do EGF, do EGFR e do p-EGFR no tecido renal dos animais tratados, porém, de forma mais expressiva e significativa no grupo tratado com bloqueio duplo. Tais resultados são compatíveis com os achados morfológicos e funcionais do nosso estudo, sugerindo que a redução na expressão destes marcadores está associada a um efeito protetor quanto ao aparecimento de alterações túbulo-intersticiais crônicas importantes, como a fibrose renal descrita anteriormente.

Aliado a redução na expressão de TGF- β 1, TGF- α , TACE, EGF, EGFR, p-EGFR, colágeno III, fibronectina, α -SMA e vimentina, nosso estudo demonstrou ainda uma redução de células inflamatórias no córtex renal dos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E. Avaliamos a expressão de células CD68+ (macrófagos do tipo M1 e M2), a expressão de células CD206+ (subtipo de macrófago M2) e a expressão de células CD3+ (células T), o que trouxe informações relevantes ao trabalho. Em nosso estudo, observamos um decréscimo significativo das células CD3+ nos grupos tratamento em relação ao grupo N+D. Além disso, o duplo bloqueio losartana+erlotinib revelou ser mais eficiente em reduzir a expressão dessas células no tecido renal. As células CD3+ são importantes agentes da resposta imunológica e são caracterizadas por expressarem em sua superfície o complexo TCR (*T cell receptor*)/CD3. Sabe-se que esse complexo está envolvido na transdução de sinal e na ativação de células T. Após a sua ativação por antígenos e sinais co-estimuladores, as células CD3+ orquestram respostas imunes através da

diferenciação em vários subconjuntos de células T com diferentes padrões de resposta, como, por exemplo, estímulo a resposta celular imune, via ativação macrofágica ou através da produção de anticorpos (108). Vários estudos tem demonstrado o importante papel das células T na injúria renal isquêmica e em outras doenças renais não imunológicas como a hipertensão arterial e o diabetes (109, 110). Foi relatado o rápido deslocamento de células T até os rins, de forma precoce e em cerca de uma hora após o estabelecimento da injúria renal aguda (111). Embora inúmeros estudos tenham avaliado os efeitos dos linfócitos T e B na disfunção renal precoce induzida pela injúria por isquemia/reperfusão, seu papel no processo de reparo renal permanece ainda sob estudo. Sabe-se, contudo, que o recrutamento dos linfócitos T e B ao sítio de injúria facilita a secreção de citocinas pró-fibróticas (25, 38). Corroborando essas informações, nossos resultados mostram que a redução na expressão das células CD3+ estava associada à queda da expressão das citocinas pró-fibróticas TGF- β 1, do TGF- α e do EGF. Mais importante ainda, podemos destacar que a queda da expressão de células CD3+ e das citocinas pró-fibróticas supracitadas refletiram em menor comprometimento do compartimento túbulo-intersticial nos animais dos grupos N+D+L, N+D+E e principalmente naqueles submetidos ao duplo tratamento losartana+erlotinib.

Os macrófagos desempenham um papel crucial na homeostase tecidual e resposta imune no tecido renal sadio ou submetido a injúria aguda ou crônica (36). É sabido que a infiltração por macrófagos no tecido renal é um achado comum na DRC progressiva e há uma correlação entre esse grau de infiltração e a severidade da lesão renal (25, 36). Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e compreendem uma população heterogênea de células que possuem a capacidade de executar uma ampla gama de funções. Em resposta à lesão tecidual, os macrófagos são ativados com base em sinais específicos do microambiente danificado. A ativação e o estado funcional dos macrófagos dependem do estágio de lesão e reparo tecidual, refletindo um espectro dinâmico e diversificado de fenótipos de macrófagos (36, 37). Em ratos submetidos a nefrectomia 5/6, a infiltração macrofágica já se inicia após uma semana da ablação e aumenta conforme o tempo (112, 113). De uma maneira geral, os macrófagos

podem ser amplamente classificados em dois subtipos: macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos alternativamente ativados (M2) (36, 37). De fato, usando um marcador amplo para macrófagos (M1+M2), nossos dados evidenciaram uma redução significativa na expressão de células CD68+ (população geral de macrófagos) nos grupos tratamento, principalmente no grupo N+D+L+E, em relação ao grupo N+D, indicando um quadro inflamatório mais grave neste último grupo. Os macrófagos M1 são considerados pró-inflamatórios devido a capacidade de liberar citocinas como interleucinas 1 e 6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e são produzidos após exposição a interferon-gama (INF- γ) ou lipopolissacáride (LPS). Por outro lado, os macrófagos M2 possuem função anti-inflamatória e expressam arginase, receptor de manose e interleucina-10, dentre outros. Além de citocinas inflamatórias, os macrófagos M2 também secretam componentes da MEC, o que confere a essas células a função de reparo e remodelamento tecidual (36).

Ao avaliarmos a subpopulação de macrófagos M2 pela marcação do receptor de manose (CD206+), observamos que os tratamentos com losartana ou erlotinib não só reduziram a expressão geral de macrófagos (M1+M2) mas também contribuíram para o aumento da expressão de macrófagos do subtipo M2. Além disso, o duplo bloqueio foi ainda mais efetivo em reduzir a infiltração de macrófagos como um todo, além de proporcionar o aumento da expressão dos macrófagos M2 no tecido renal dos animais do grupo N+D+L+E. Esse resultado mostra que, apesar do menor número de macrófagos como um todo (M1+M2) observado nos grupos N+D+L, N+D+E e N+D+L+E, provavelmente há um aumento da atividade dos macrófagos do subtipo M2 nesses grupos tratados. Ou seja, após a resposta inflamatória inicial desencadeada pelo macrófago M1, possivelmente há um aumento na atividade anti-inflamatória e remodeladora tecidual exercida pelos macrófagos M2, conferindo um provável papel regenerativo destas células no tecido renal (36). Entretanto, o mecanismo pelo qual os macrófagos M1 se convertem para o fenótipo M2 é ainda desconhecido. Sabe-se, porém, que é um processo que ocorre durante a fase de recuperação, conferindo um papel reparador e de proteção tecidual aos macrófagos M2 (36). Referente a análise conjunta da expressão de células inflamatórias (CD3+, CD68+ e CD206+), nossos resultados mostram que a

redução na expressão total de macrófagos (M1+M2) e células T CD3+ associada ao aumento da expressão de macrófagos M2 nos animais dos grupos N+D+L, N+D+E e principalmente nos animais do grupo N+D+L+E, contribuíram para o menor comprometimento do compartimento túbulo-intersticial e consequente formação de fibrose renal.

Em resumo, nossos resultados mostram que o tratamento duplo L+E foi mais eficaz na atenuação das alterações relacionadas à formação de fibrose renal observadas no modelo de ablação renal em ratos deficientes em vitamina D. De forma geral, observamos nos grupos tratados com losartan e/ou erlotinib prevenção da expansão da área intersticial, redução do infiltrado de macrófagos e células T e redução da expressão de fatores relacionados à formação de fibrose, tais como TGF- β 1, TACE, TGF- α , EGF e EGFR. Ainda nesses grupos de animais, houve menor expressão de componentes da MEC e de marcadores de alteração fenotípica. Importante ressaltar que tais achados foram mais expressivos e significativos no grupo de animais submetidos ao tratamento duplo (N+D+L+E).

Portanto, nosso modelo identifica um papel chave da ativação/transativação do EGFR durante a progressão da DRC e demonstra a importância de estudos adicionais visando o desenvolvimento de terapias anti-fibróticas alternativas que auxiliem nesse processo de retardo da progressão da DRC.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente protocolo mostram a prevenção de alterações túbulo-intersticiais crônicas importantes, como presença de fibrose renal e infiltrado inflamatório do interstício nos grupos nefrectomizados e deficientes em vitamina D que foram submetidos ao tratamento com losartana ou erlotinib. Além disso, o tratamento duplo com losartana e erlotinib foi mais efetivo na prevenção das lesões morfológicas e funcionais dos ratos analisados.

7. ANEXOS

Tabela 1 – Peso corporal, ingestão de água, volume urinário e parâmetros funcionais/hemodinâmicos avaliados ao final dos 90 dias de acompanhamento dos ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E)

	N+D	N+D+L	N+D+E	N+D+L+E
PC	382±16	381±5	374±10	373±12
Ingestão de água	30,7±0,7	46,2±3,7	47,2±0,2	44,1±5,7
C _{in}	0,39±0,02	0,63±0,04 ^a	0,50±0,03	0,60±0,04 ^b
PAM	163±4	108±2 ^a	147±4 ^{cd}	107±3 ^{ag}

PC, peso corpóreo (g); Ingestão de água (mL/24h); C_{in}, clearance de inulina (mL/min/100g); PAM, pressão arterial média (mmHg). Valores expressos como média ± EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01 e ^cp<0,05 vs. N+D; ^dp<0,001 vs. N+D+L; ^gp<0,001 vs. N+D+E.

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos avaliados ao final dos 90 dias de acompanhamento dos ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E)

	N+D	N+D+L	N+D+E	N+D+L+E
25(OH)D	<0,44±0	<0,44±0	<0,44±0	<0,44±0
Aldosterona	3692±390	1496±319 ^a	3266±644 ^f	1650±252 ^{bi}
P _{Na}	133,9±0,8	134,3±0,8	131,4±0,5	133,9±0,5
P _K	3,9±0,1	4,4±0,1	4,3±0,2	4,7±0,1 ^b
P _{Ca total}	7,50±0,14	7,49±0,11	7,77±0,11	7,78±0,18
P _P	5,4±0,9	5,0±0,2	4,2±0,3	4,8±0,1
P _{Mg}	2,07±0,10	2,05±0,09	2,23±0,12	2,21±0,06
PTH intacto	1296±348	760±118	602±168	365±56 ^b
FGF-23	529,8±40,2	458,6±43,6	458,7±34,1	403,7±37,5
Proteinúria	24,5±2,7	13,8±1,3 ^a	15,8±1,5 ^a	11,5±0,7 ^a

25(OH)D, 25-hidroxivitamina D (ng/mL); Aldosterona plasmática (pg/mL); P_{Na}, concentração plasmática de sódio (mEq/L); P_K, concentração plasmática de potássio (mEq/L); P_{Ca total}, concentração plasmática de cálcio (mg/dL); P_P, concentração plasmática de fósforo (mg/dL), P_{Mg}, concentração plasmática de magnésio (mg/dL); PTH intacto plasmático (pg/mL); FGF-23 (pg/mL); Proteinúria (mL/24h). Valores expressos como média ± EPM. ^ap<0,001 e ^bp<0,01 vs. N+D; ⁱp<0,05 vs. N+D+L; ^fp<0,05 vs. N+D+E.

Tabela 3 – Avaliação da expressão proteica pelos métodos de *Western blot* e ELISA ao final dos 90 dias de acompanhamento dos ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E)

	N+D	N+D+L	N+D+E	N+D+L+E
TGF- β 1 _{WB}	100,2 $\pm$ 2,8	32,4 $\pm$ 3,4 ^a	46,7 $\pm$ 5,9 ^a	32,5 $\pm$ 3,6 ^a
TGF- β 1 _{ELISA}	1,44 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,16	1,14 $\pm$ 0,10	0,85 $\pm$ 0,05 ^c
EGF _{ELISA}	2,12 $\pm$ 0,18	1,44 $\pm$ 0,27	1,58 $\pm$ 0,23	1,05 $\pm$ 0,07 ^b
p-EGFR _{WB}	100,2 $\pm$ 2,5	70,7 $\pm$ 2,8 ^a	88,5 $\pm$ 4,4 ^{cd}	59,2 $\pm$ 3,1 ^{afg}
Col III _{ELISA}	6,36 $\pm$ 0,30	4,97 $\pm$ 0,40 ^b	5,62 $\pm$ 0,21	3,81 $\pm$ 0,25 ^{afh}

TGF- β 1_{WB}, expressão proteica do fator de crescimento transformador β 1 no tecido renal (%); TGF- β 1_{ELISA}, quantificação do TGF- β 1 no tecido renal (pg/ μ g de prot); EGF_{ELISA}, quantificação do fator de crescimento epidérmico no tecido renal (pg/ μ g de prot); p-EGFR_{WB}, expressão proteica da forma fosforilada do receptor do fator de crescimento epidérmico no tecido renal (%); Col III_{ELISA}, quantificação de colágeno III no tecido renal (pg/ μ g de prot). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01 e ^cp<0,05 vs. N+D; ^dp<0,001 e ^fp<0,05 vs. N+D+L; ^gp<0,001 e ^hp<0,001 vs. N+D+E.

Tabela 4 – Análise histomorfológica e avaliação imuno-histoquímica em tecido renal ao final dos 90 dias de acompanhamento dos ratos deficientes em vitamina D (D) submetidos ao insulto da nefrectomia 5/6 (N) tratados com losartana (L), erlotinib (E) ou associação losartana+erlotinib (L+E)

	N+D	N+D+L	N+D+E	N+D+L+E
AIR	22,56±0,53	13,14±0,82 ^a	14,71±0,94 ^a	10,46±0,41 ^{aeg}
CD206+	0,11±0,01	0,32±0,02 ^c	0,30±0,04 ^b	0,41±0,05 ^a
CD68+	0,94±0,05	0,75±0,03 ^c	0,69±0,04 ^c	0,60±0,06 ^a
CD3+	1,05±0,15	0,50±0,06 ^a	0,58±0,04 ^b	0,29±0,02 ^a
TGF-β1	3,92±0,39	1,90±0,29 ^a	1,84±0,45 ^a	0,83±0,15 ^{afi}
TACE	3,98±0,54	2,82±0,29 ^c	2,49±0,23 ^c	1,37±0,17 ^{afi}
TGF- α	3,07±0,42	0,84±0,15 ^a	1,62±0,33 ^{af}	0,20±0,03 ^{afg}
EGFR	2,85±0,51	1,50±0,17 ^b	1,79±0,09 ^c	0,71±0,12 ^{afi}
Fibronectina	7,40±0,50	3,67±0,31 ^a	3,33±0,15 ^a	2,49±0,13 ^{afi}
α-SMA	4,09±0,29	2,33±0,15 ^a	2,73±0,21 ^a	1,19±0,07 ^{adg}
Vimentina	3,85±0,29	3,25±0,23	2,73±0,22 ^b	1,94±0,15 ^{adi}

AIR, área intersticial relativa (%); células CD206+ (% de área positiva); células CD68+ (% de área positiva); células T CD3+ (% de área positiva); TGF-β1, expressão do fator de crescimento transformador β1 (% de área positiva); TACE, expressão da enzima conversora do fator de necrose tumoral-α (% de área positiva); TGF-α, expressão do fator de crescimento transformador α (% de área positiva); EGFR, expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (% área positiva); fibronectina (% área positiva); α-SMA, expressão da α-actina de músculo liso (% área positiva) e vimentina (% de área positiva). Valores expressos como média ± EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01 e ^cp<0,05 vs. N+D; ^dp<0,001, ^ep<0,01 e ^fp<0,05 vs. N+D+L; ^gp<0,001 e ⁱp<0,05 vs. N+D+E.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gonçalves JG, de Braganca AC, Canale D, Shimizu MH, Sanches TR, Moyses RM, et al. Vitamin D deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury. *PLoS One*. 2014;9(9):e107228.
2. de Braganca AC, Volpini RA, Canale D, Gonçalves JG, Shimizu MH, Sanches TR, et al. Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats. *Physiol Rep*. 2015;3(3).
3. Canale D, de Braganca AC, Gonçalves JG, Shimizu MH, Sanches TR, Andrade L, et al. Vitamin D deficiency aggravates nephrotoxicity, hypertension and dyslipidemia caused by tenofovir: role of oxidative stress and renin-angiotensin system. *PLoS One*. 2014;9(7):e103055.
4. de Braganca AC, Canale D, Gonçalves JG, Shimizu MH, Seguro AC, Volpini RA. Vitamin D Deficiency Aggravates the Renal Features of Moderate Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Rats. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:282.
5. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005;12(4):353-65.
6. Lambers Heerspink HJ, de Borst MH, Bakker SJ, Navis GJ. Improving the efficacy of RAAS blockade in patients with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(2):112-21.
7. Investigators O, Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *The New England journal of medicine*. 2008;358(15):1547-59.
8. Chen J, Chen JK, Harris RC. Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2012;32(5):981-91.
9. Chen J, Chen JK, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee TC, et al. EGFR signaling promotes TGFbeta-dependent renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(2):215-24.
10. Lautrette A, Li S, Alili R, Sunnarborg SW, Burtin M, Lee DC, et al. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med*. 2005;11(8):867-74.
11. Liu N, Guo JK, Pang M, Tolbert E, Ponnusamy M, Gong R, et al. Genetic or pharmacologic blockade of EGFR inhibits renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(5):854-67.
12. Tang J, Liu N, Tolbert E, Ponnusamy M, Ma L, Gong R, et al. Sustained activation of EGFR triggers renal fibrogenesis after acute kidney injury. *Am J Pathol*. 2013;183(1):160-72.
13. Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Federici P, Grimber G, Briand P, et al. Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest*. 2000;106(2):225-34.

14. Yamamoto Y, Iyoda M, Tachibana S, Matsumoto K, Wada Y, Suzuki T, et al. Erlotinib attenuates the progression of chronic kidney disease in rats with remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(4):598-606.
15. Minna JD, Dowell J. Erlotinib hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;Suppl:S14-5.
16. Jha V, Wang AY, Wang H. The impact of CKD identification in large countries: the burden of illness. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27 Suppl 3:iii32-8.
17. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
18. Zhong J, Yang HC, Fogo AB. A perspective on chronic kidney disease progression. *American journal of physiology Renal physiology*. 2017;312(3):F375-F84.
19. Campbell RC, Remuzzi G. Halting the progression of renal disease: where we stand? *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2002;22(4):303-5.
20. Cozzolino M, Gentile G, Mazzaferro S, Brancaccio D, Ruggerenti P, Remuzzi G. Blood pressure, proteinuria, and phosphate as risk factors for progressive kidney disease: a hypothesis. *Am J Kidney Dis*. 2013;62(5):984-92.
21. Yuste C, Barraca D, Aragoncillo-Sauco I, Vega-Martinez A, Abad S, Verdalles-Guzman U, et al. Factors related with the progression of chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2013;33(5):685-91.
22. Shroff R, Wan M, Rees L. Can vitamin D slow down the progression of chronic kidney disease? *Pediatr Nephrol*. 2012;27(12):2167-73.
23. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med*. 2014;371(1):58-66.
24. Chou YH, Chu TS, Lin SL. Role of renin-angiotensin system in acute kidney injury-chronic kidney disease transition. *Nephrology (Carlton)*. 2018;23 Suppl 4:121-5.
25. Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(2):109-22.
26. Vanhove T, Goldschmeding R, Kuypers D. Kidney Fibrosis: Origins and Interventions. *Transplantation*. 2017;101(4):713-26.
27. Schnaper HW. The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2017;24(2):107-16.
28. Huynh P, Chai Z. Transforming growth factor beta (TGFbeta) and related molecules in chronic kidney disease (CKD). *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(2):287-313.
29. Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):966-73.
30. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease--are interventions possible? *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(3):363-8.
31. Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*. 2000;15(3-4):290-301.

32. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(6):325-38.
33. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, et al. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2000;58(6):2301-13.
34. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes.* 1996;45(4):522-30.
35. Takakura K, Mizukami K, Mitori H, Noto T, Tomura Y. Antiproteinuric effect of pirfenidone in a rat model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Eur J Pharmacol.* 2014;737:106-16.
36. Guiteras R, Flaquer M, Cruzado JM. Macrophage in chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2016;9(6):765-71.
37. Huen SC, Cantley LG. Macrophages in Renal Injury and Repair. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:449-69.
38. Kumar S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury. *Kidney Int.* 2018;93(1):27-40.
39. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1765-76.
40. Dong Y, Zhang Q, Wen J, Chen T, He L, Wang Y, et al. Ischemic Duration and Frequency Determines AKI-to-CKD Progression Monitored by Dynamic Changes of Tubular Biomarkers in IRI Mice. *Front Physiol.* 2019;10:153.
41. Liu J, Kumar S, Dolzhenko E, Alvarado GF, Guo J, Lu C, et al. Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. *JCI Insight.* 2017;2(18).
42. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzell JD, Weiss NS. 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis.* 2007;50(1):69-77.
43. Lee DR, Kong JM, Cho KI, Chan L. Impact of vitamin D on proteinuria, insulin resistance, and cardiovascular parameters in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2011;43(10):3723-9.
44. Lanske B, Razzaque MS. Vitamin D and aging: old concepts and new insights. *J Nutr Biochem.* 2007;18(12):771-7.
45. Zehnder D, Hewison M. The renal function of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;151(1-2):213-20.
46. Kim CS, Kim SW. Vitamin D and chronic kidney disease. *Korean J Intern Med.* 2014;29(4):416-27.
47. Dusso A, Gonzalez EA, Martin KJ. Vitamin D in chronic kidney disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):647-55.
48. Patel TV, Singh AK. Role of vitamin D in chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2009;29(2):113-21.
49. Lucisano S, Buemi M, Passantino A, Aloisi C, Cernaro V, Santoro D. New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37(6):667-78.

50. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F8-28.
51. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
52. Hewison M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;321(2):103-11.
53. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):491S-9S.
54. Seiler S, Heine GH, Fliser D. Clinical relevance of FGF-23 in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2009(114):S34-42.
55. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(7):2205-15.
56. Kuro-o M. Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(4):583-90.
57. Quarles LD. Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):1040-8.
58. Schiavi SC. Fibroblast growth factor 23: the making of a hormone. *Kidney Int*. 2006;69(3):425-7.
59. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev*. 2015;36(2):174-93.
60. John GB, Cheng CY, Kuro-o M. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis*. 2011;58(1):127-34.
61. de Borst MH, Vervloet MG, ter Wee PM, Navis G. Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1603-9.
62. Campbell RC, Ruggenenti P, Remuzzi G. Halting the progression of chronic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13 Suppl 3:S190-5.
63. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006;69(12):2131-47.
64. Turban S, Beutler KT, Morris RG, Masilamani S, Fenton RA, Knepper MA, et al. Long-term regulation of proximal tubule acid-base transporter abundance by angiotensin II. *Kidney Int*. 2006;70(4):660-8.
65. Wolf G, Wenzel UO. Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension*. 2004;43(4):693-8.
66. Morgado-Pascual JL, Rayego-Mateos S, Valdivielso JM, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. Paricalcitol Inhibits Aldosterone-Induced Proinflammatory Factors by Modulating Epidermal Growth Factor Receptor Pathway in Cultured Tubular Epithelial Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:783538.
67. de Brito Galvao JF, Nagode LA, Schenck PA, Chew DJ. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2013;23(2):134-62.
68. Santoro D, Caccamo D, Lucisano S, Buemi M, Sebekova K, Teta D, et al. Interplay of vitamin D, erythropoiesis, and the renin-angiotensin system. *BioMed research international*. 2015;2015:145828.
69. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100(5):481-92.

70. Brown NJ. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(8):459-69.
71. Barrera-Chimal J, Perez-Villalva R, Rodriguez-Romo R, Reyna J, Uribe N, Gamba G, et al. Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. 2013;83(1):93-103.
72. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;110(2):229-38.
73. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol*. 2013;180:47-63.
74. Qian Y, Peng K, Qiu C, Skibba M, Huang Y, Xu Z, et al. Novel Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Attenuates Angiotensin II-Induced Kidney Fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;356(1):32-42.
75. Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(1):32-43.
76. Dreytmueller D, Pruessmeyer J, Groth E, Ludwig A. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(6-7):472-85.
77. Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S. ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(1):C1-10.
78. Le Gall SM, Bobe P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, et al. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell*. 2009;20(6):1785-94.
79. Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JH. Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa). *Oncologist*. 2005;10(8):579-89.
80. Rintala JM, Savikko J, Palin N, Rintala SE, Koskinen PK, von Willebrand E. Epidermal growth factor inhibition, a novel pathway to prevent chronic allograft injury. *Transplantation*. 2014;98(8):821-7.
81. Liu N, He S, Tolbert E, Gong R, Bayliss G, Zhuang S. Suramin alleviates glomerular injury and inflammation in the remnant kidney. *PLoS One*. 2012;7(4):e36194.
82. van Goor H, van der Horst ML, Fidler V, Grond J. Glomerular macrophage modulation affects mesangial expansion in the rat after renal ablation. *Lab Invest*. 1992;66(5):564-71.
83. Fogo A, Ichikawa I. Evidence for the central role of glomerular growth promoters in the development of sclerosis. *Semin Nephrol*. 1989;9(4):329-42.
84. Waldherr R, Gretz N. Natural course of the development of histological lesions after 5/6 nephrectomy. *Contrib Nephrol*. 1988;60:64-72.
85. Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC. The role of macrophages in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 5:3-7.
86. Lancas T, Kasahara DI, Gross JL, Pires-Neto RC, Deheinzelin D, Mauad T, et al. Cholinergic hyperresponsiveness of peripheral lung parenchyma in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2011;82(2):177-84.

87. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
88. Arcidiacono MV, Sato T, Alvarez-Hernandez D, Yang J, Tokumoto M, Gonzalez-Suarez I, et al. EGFR activation increases parathyroid hyperplasia and calcitriol resistance in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2008;19(2):310-20.
89. Arcidiacono MV, Yang J, Fernandez E, Dusso A. Parathyroid-specific epidermal growth factor-receptor inactivation prevents uremia-induced parathyroid hyperplasia in mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2015;30(3):434-40.
90. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol.* 2016;6(2):561-601.
91. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:503-33.
92. Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, et al. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(5):F945-54.
93. Fujihara CK, Noronha IL, Malheiros, Antunes GR, de Oliveira IB, Zatz R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(2):283-90.
94. Ikoma M, Kawamura T, Kakinuma Y, Fogo A, Ichikawa I. Cause of variable therapeutic efficiency of angiotensin converting enzyme inhibitor on glomerular lesions. *Kidney Int.* 1991;40(2):195-202.
95. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *Journal of cellular biochemistry.* 2003;88(2):327-31.
96. Tamez H, Kalim S, Thadhani RI. Does vitamin D modulate blood pressure? Current opinion in nephrology and hypertension. 2013;22(2):204-9.
97. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345(12):861-9.
98. Ibsen H, Wachtell K, Olsen MH, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, et al. Does albuminuria predict cardiovascular outcome on treatment with losartan versus atenolol in hypertension with left ventricular hypertrophy? A LIFE substudy. *J Hypertens.* 2004;22(9):1805-11.
99. Tarif N, Bakris GL. Angiotensin II receptor blockade and progression of nondiabetic-mediated renal disease. *Kidney Int Suppl.* 1997;63:S67-70.
100. Demirci B, McKeown PP, Bayraktutan U. Blockade of angiotensin II provides additional benefits in hypertension- and ageing-related cardiac and vascular dysfunctions beyond its blood pressure-lowering effects. *J Hypertens.* 2005;23(12):2219-27.

101. Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;30(1):75-83.
102. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney international Supplement.* 2005(99):S57-65.
103. Tang J, Liu N, Zhuang S. Role of epidermal growth factor receptor in acute and chronic kidney injury. *Kidney Int.* 2013;83(5):804-10.
104. Shah BH, Catt KJ. TACE-dependent EGF receptor activation in angiotensin-II-induced kidney disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(5):235-7.
105. Zhuang S, Liu N. EGFR signaling in renal fibrosis. *Kidney Int Suppl* (2011). 2014;4(1):70-4.
106. Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest.* 1989;84(6):1757-61.
107. Wang Z, Chen JK, Wang SW, Moeckel G, Harris RC. Importance of functional EGF receptors in recovery from acute nephrotoxic injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(12):3147-54.
108. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101(5):455-8.
109. De Miguel C, Guo C, Lund H, Feng D, Mattson DL. Infiltrating T lymphocytes in the kidney increase oxidative stress and participate in the development of hypertension and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300(3):F734-42.
110. Kim SY, Park KH, Gul R, Jang KY, Kim UH. Role of kidney ADP-ribosyl cyclase in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(2):F291-7.
111. Noiri E, Doi K, Inagi R, Nangaku M, Fujita T. Contribution of T lymphocytes to rat renal ischemia/reperfusion injury. *Clin Exp Nephrol.* 2009;13(1):25-32.
112. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1998;54(5):1510-9.
113. Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int.* 1996;49(3):666-78.