JANAÍNA GARCIA GONÇALVES

**Avaliação dos eventos envolvidos na evolução crônica da lesão
renal aguda pós isquêmica em ratos com deficiência de
vitamina D**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Dr. Rildo Aparecido Volpini

SÃO PAULO

2014

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

Avaliação dos eventos envolvidos na evolução crônica da lesão renal aguda pós isquêmica em ratos com deficiência de vitamina D / Janaína Garcia Gonçalves. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Nefrologia.

Orientador: Rildo Aparecido Volpini.

Descritores: 1.Fibrose 2.Doença renal crônica 3.Lesão renal aguda 4.Progressão da doença 5.Deficiência de vitamina D 6.Sistema renina-angiotensina 7.Fator de crescimento transformador beta 1 8.Isquemia/patologia 9.Inflamação 10.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-197/14

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 do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de estudos (Proc.: 146012/2011-9) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio à pesquisa (Proc.: nº 2010/52294-0).

Dedicatória

À minha mãe, Marlice Garcia Lopes Gonçalves (*in memorian*) que sempre me inspirou nos melhores e piores momentos da vida... essa vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me presentear com uma vida repleta de desafios e bons momentos...

A minha família, em especial ao meu pai **Joaquim**, exemplo de integridade e boa índole. Obrigada por sempre respeitar e incentivar o caminho que eu escolhi. Aos meus irmãos **Juliano e Jaciara**, por fazerem parte dessa trajetória.

Ao meu orientador e grande amigo, **Dr. Rildo Aparecido Volpini**, exemplo de profissionalismo e amor à pesquisa. Graças a sua dedicação e suporte contínuo, a caminhada foi bem menos árdua e com certeza muito divertida. Só tenho agradecer pelo carinho, paciência, tranquilidade e por todo aprendizado ao longo desses anos.

Às minhas amigas de ‘bancada’ e de linha de pesquisa, **Ms. Ana Carolina de Bragança Viciania e Dra. Daniele Canale**. Com vocês aprendi que a pesquisa é muito gratificante quando trabalhamos em conjunto, dividindo angústias e torcendo uma pelo sucesso da outra. Muito obrigada pelo auxílio durante esses anos. Levarei a amizade e o carinho de vocês por toda a vida.

À querida **Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu**, fonte inesgotável de conhecimentos técnicos e de vida.... agradeço também à **Leticia Urbano Cardoso de Castro e Dra. Talita Rojas Cunha Sanches**, que me proporcionaram vários momentos hilários e de muita leveza no dia a dia do laboratório. Agradeço também às amigas de laboratório, **Ms. Monique Silva Martines e Ms. Daniela Ferreira**, com quem dividi bons momentos.

Aos **Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro e Prof. Dr. Antonio José de Barros Magaldi**, por terem me recebido em seu laboratório e por todo o incentivo. À **Profa. Dra. Claudia Maria de Barros Helou**, pelo conhecimento compartilhado.

A **Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade, Profa. Dra Rosa Maria Affonso Moyses e Profa. Dra. Vanda Jorgetti**, exemplos de competência profissional, dedicação e aprimoramento contínuo. Agradeço o suporte, incentivo e oportunidade de convívio.

A toda equipe do LIM-12 (**Eloá Neves, Nivaldo Francisco da Silva e Denise Ariane de Jesus**) pela solicitude e suporte administrativo. O carinho de vocês foi crucial ao longo dessa caminhada.

Aos meus grandes exemplos de vida e profissionalismo, **Dr. Pedro Alejandro Gordan e Dra. Eliana Pires de Oliveira Dias**... amados mestres. Agradecimento em especial ao **Dr. Waldir Eduardo Garcia** (*in memorian*), exemplo inquestionável de ser humano e a quem serei eternamente grata por ter me doado uma pequena parcela do seu amor à Nefrologia.

Aos meus colegas de trabalho, enfermeiras queridas e técnicos de enfermagem, por fazerem meu dia mais leve e produtivo. Em especial aos meus queridos amigos do Hospital Brigadeiro e da Clínica INEDI.

A querida **Miriam Pellegrini**, minha professora de inglês, com quem compartilhei as angústias do processo de criação dessa dissertação. Obrigada por todo o auxílio.

Por fim e não menos importante, a todos meus amigos... mesmo aqueles que não puderam estar mais presentes nessa fase. Sinto-me extremamente abençoada por contar com grandes e fiéis amigos. Em especial, agradeço a **Ana Paula Calheiros de Lima, Carolina Sarmiento Duarte, Camila Souza Guatelli, Giselle de Barros Silva e Lidiane Soares Campos**, por me 'suportarem' nos momentos mais difíceis.

*“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós”.*

Chico Xavier

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Vitamina D	2
1.2. Deficiência de Vitamina D	4
1.3. Deficiência de Vitamina D na Doença Renal Crônica	5
1.4. FGF-23 e Klotho	6
1.5. Mecanismos de fibrose e progressão de lesão renal	7
1.6. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, DRC e vitamina D	9
2. OBJETIVO	11
3. METODOLOGIA	12
3.1. Grupos experimentais	12
3.2. Representação Esquemática do Protocolo Experimental	13
3.3. Estudos de Gaiola Metabólica	14
3.4. Determinação da pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular (Clearance de Inulina)	14
3.5. Análise Histomorfométrica	16

3.5.1. Avaliação da área glomerular	16
3.5.2. Área Intersticial Relativa (AIR)	16
3.6. Análise Imuno-histoquímica	17
3.7. Análise da expressão proteica: <i>Western Blotting</i>	18
3.8. Análise da expressão gênica: reação em cadeia da polimerase quantitativa	19
3.8.1. Extração de RNA	19
3.8.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativa - qPCR	19
3.9. Análise Estatística	20
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

25(OH)D	Calcidiol ou 25-hidroxivitamina D
1,25(OH) ₂ D	Calcitriol ou 1,25-diidroxivitamina D
α -kl	Gene α -klotho
α -SMA	Alfa-actina de músculo liso
AGT	Angiotensinogênio
AIR	Área intersticial relativa
Ang II	Angiotensina II
AGTR1a	Receptor AT1 da angiotensina II tipo a
AGTR1b	Receptor AT1 da angiotensina II tipo b
C	Grupo controle
cDNA	DNA complementar
C _{In}	<i>Clearance</i> de Inulina
Ct	Ciclo limiar
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
dVD	Grupo deficiente em vitamina D
dVD+Isq	Grupo deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ED-1	Marcador para macrófagos e monócitos
EPM	Erro Padrão Médio
ET-1	Endotelina-1
FECa	Fração de excreção de cálcio
FENa	Fração de excreção de sódio
FEP	Fração de excreção de fósforo
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos-23

FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
FSP-1	Proteína específica de fibroblastos-1
FSR	Fluxo sanguíneo renal
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-1	Interleucina-1
IRA	Injúria Renal Aguda
Isq	Grupo submetido ao insulto de isquemia/reperfusão.
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MEC	Matriz extracelular
NaPi-2a	Cotransportador sódio/fosfato subtipo 2-a
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PAM	Pressão arterial média
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PC	Peso Corpóreo
P _{Ca}	Concentração plasmática de cálcio
P _K	Concentração plasmática de potássio
P _{Na}	Concentração plasmática de sódio
P _P	Concentração plasmática de fósforo
PPAR- α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
PR/PC	Relação peso renal / peso corpóreo
PTH	Paratormônio
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
REN	Renina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RVR	Resistência vascular renal
RXR	Receptor retinóide X
SDS-Page	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TFG	Taxa de filtração glomerular

TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRPV5	Canal epitelial de cálcio 1
U _{Prot}	Excreção urinária de proteínas
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	<i>Vitamin D Responsive Elements</i>
Vitamina D ₂	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	Colecalciferol
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Relação entre peso renal/peso corpóreo	21
Figura 2.	Taxa de filtração glomerular (TFG)	22
Figura 3.	Pressão arterial média (PAM)	23
Figura 4.	Concentração plasmática de aldosterona	25
Figura 5.	Expressão gênica dos componentes do SRAA	26
Figura 6.	Níveis plasmáticos de colesterol total e de triglicerídeos	27
Figura 7.	Proteinúria	28
Figura 8.	Concentração plasmática de PTH intacto	29
Figura 9.	Concentração plasmática de FGF-23	29
Figura 10.	Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína Klotho	31
Figura 11.	Expressão gênica de klotho	31
Figura 12.	Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína VDR	32
Figura 13.	Expressão gênica de VDR e TRPV5	33
Figura 14.	Área intersticial relativa	35
Figura 15.	Fotomicrografias do córtex renal	35
Figura 16.	Área glomerular	36
Figura 17.	Número de células ED-1 positivas por campo	36
Figura 18.	Imunolocalização de células ED-1 positivas no córtex renal	37
Figura 19.	Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína TGF- β 1	38
Figura 20.	Proporção do volume de áreas positivas para colágeno IV	39
Figura 21.	Imunolocalização de colágeno IV no córtex renal	40
Figura 22.	Proporção do volume de áreas positivas para fibronectina	41
Figura 23.	Imunolocalização de fibronectina no córtex renal	41
Figura 24.	Proporção do volume de áreas positivas para vimentina	42
Figura 25.	Imunolocalização de vimentina no córtex renal	43
Figura 26.	Proporção do volume de áreas positivas para α -SMA	44
Figura 27.	Imunolocalização de α -actina no córtex renal	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Peso renal, parâmetros funcionais e hemodinâmicos.....	24
Tabela 2.	Avaliação da expressão gênica dos componentes do SRAA	26
Tabela 3.	Parâmetros bioquímicos	30
Tabela 4.	Avaliação da expressão proteica no tecido renal	33
Tabela 5.	Avaliação da expressão gênica no tecido renal	34

RESUMO

GONÇALVES, JG. **Avaliação dos eventos envolvidos na evolução crônica da lesão renal aguda pós isquêmica em ratos com deficiência de vitamina D.** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

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, 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 o fator *Transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1). Tem sido demonstrado que a mortalidade de pacientes com DRC está diretamente relacionada à função renal e está associada a riscos tradicionais como cardiovasculares e infecções. Entretanto, esses riscos tradicionais explicam apenas metade das causas de mortalidade nesses pacientes. Evidências crescentes mostram que o status de vitamina D pode ser um fator de risco não tradicional para a evolução da DRC. Tendo em vista o importante papel da vitamina D na manutenção das funções fisiológicas essenciais e a observação da queda dos níveis deste hormônio na DRC, torna-se relevante o estudo da deficiência de vitamina D nos eventos envolvidos na evolução crônica da lesão renal aguda em modelo experimental de isquemia/reperfusão renal. Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: controle, animais que receberam dieta padrão; dVD, animais que receberam dieta depletada em vitamina D; Isq, animais que receberam dieta padrão e foram submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal bilateral no 28º dia; Isq+dVD, animais que receberam dieta depletada em vitamina D e foram submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão bilateral no 28º dia. Ao final dos 90 dias do protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia, amostras de sangue, urina e o tecido renal foram coletados para a análise dos mecanismos de lesão renal. Os animais submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal apresentaram hipertrofia renal, aumento dos níveis de pressão arterial média, colesterol e de PTH plasmático. Além disso, foi observada

expansão da área intersticial, aumento do infiltrado de macrófagos/monócitos, da expressão de colágeno IV, fibronectina, vimentina e α -actina e redução da expressão da proteína Klotho. A deficiência de vitamina D contribuiu para a elevação dos níveis plasmáticos de PTH e aumento da proteinúria assim como para as alterações túbulo-intersticiais crônicas importantes (fibrose e infiltrado inflamatório do interstício, dilatação e atrofia tubular), aumento da expressão da citocina TGF- β 1 e queda da expressão do receptor de vitamina D (VDR) e da proteína Klotho, observados nos animais deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal. Portanto, através de vias inflamatórias e com participação do fator de crescimento TGF- β 1, a deficiência de vitamina D poderia ser considerada um fator agravante para o dano túbulo-intersticial e formação de fibrose intersticial nesse modelo experimental de isquemia/reperfusão renal.

Descritores: Fibrose, doença renal crônica, lesão renal aguda, progressão da doença, deficiência de vitamina D, sistema renina-angiotensina, fator de crescimento transformador beta 1, isquemia/patologia, inflamação, ratos Wistar.

SUMMARY

GONÇALVES, JG. **Assessment of the events involved in chronic evolution of acute kidney injury in a murine ischemia/reperfusion model after vitamin D deficiency** [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

In most countries, the incidence and prevalence of chronic kidney disease (CKD) has been increasing over the years. Although there was a significant improvement in the management of CKD with renin-angiotensin-system inhibitors, the disease is still progressive, leading to the need of emergence of new protective strategies. The progressive renal fibrosis is present in CKD and involves the participation of several cytokines, especially the Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). It has been shown that the mortality of patients with CKD is directly related to renal function, which is associated to traditional risk factors such as cardiovascular diseases and infections. However, these traditional risk factors explain only half of the causes of mortality in these patients. Growing evidence shows that vitamin D status may be a non-traditional risk factor for the progression of CKD. Considering the important role of vitamin D in the maintenance of essential physiological functions and the observation of low levels of this hormone in CKD, the study of vitamin D deficiency in the events involved in chronic evolution of acute kidney injury in an experimental model of ischemia/reperfusion becomes relevant. Wistar rats were divided into four groups : control, animals received a standard diet ; dVD, animals received a vitamin D-depleted diet ; Isq, animals received a standard diet and were subjected to bilateral renal ischemia/reperfusion injury on day 28; Isq +dVD, animals received a vitamin D-depleted diet and were subjected to bilateral renal ischemia/reperfusion injury on day 28 . At the end of the 90 days of the protocol, the animals were euthanized and samples of blood, urine and kidney tissue were collected for analysis of the mechanisms of renal injury. The animals subjected to the insult of ischemia/reperfusion showed renal hypertrophy, increased levels of mean blood pressure, cholesterol and plasma PTH. Furthermore, expansion of the interstitial area, increased

infiltration of macrophages/monocytes, increased expression of collagen IV, fibronectin, vimentin and α -actin, and reduced expression of Klotho protein were observed. The vitamin D deficiency contributed to the elevation of plasma PTH levels and increased proteinuria as well as for important chronic tubulo-interstitial changes (fibrosis and inflammatory infiltration of the interstitium, tubular dilation and atrophy), increased expression of cytokine TGF- β 1 and decreased expression of vitamin D receptor (VDR) and Klotho protein observed in vitamin D-deficient animals subjected to the insult of renal ischemia/reperfusion. Therefore, through inflammatory pathways and involvement of TGF- β 1 growth factor, vitamin D deficiency could be considered an aggravating factor in tubulointerstitial damage and formation of interstitial fibrosis in this experimental model of renal ischemia/reperfusion.

Descriptors: Fibrosis, chronic renal disease, acute kidney injury, disease progression, vitamin D deficiency, renin-angiotensin system, transforming growth factor beta 1, ischemia/pathology, inflammation, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

Na maioria dos países, a incidência e prevalência da doença renal crônica (DRC) vem aumentando ao longo dos anos. Isso é devido principalmente ao envelhecimento da população que leva ao maior desenvolvimento de nefroangioesclerose e nefropatia diabética. Embora tenha havido uma melhora significativa no manejo da DRC com o advento de terapias como os inibidores de enzima conversora de angiotensina e bloqueadores de receptor de angiotensina, a doença ainda é progressiva, levando a necessidade do surgimento de novas estratégias protetoras [1,2].

Uma recente metanálise sobre incidência mundial na injúria renal aguda (IRA) mostrou que a taxa de mortalidade associada a IRA declinou ao longo do tempo e teve esse resultado inversamente relacionado com a renda dos países e porcentagem do produto interno bruto gasto nas despesas de saúde. Apesar desse resultado, a IRA ainda é uma patologia de grande interesse para a saúde pública, visto afetar um em cada cinco pacientes adultos internados no mundo [3].

Sabe-se que a lesão renal aguda pós isquemia/reperfusão é uma das grandes causas da IRA [4]. Sua fisiopatologia envolve uma interação complexa entre fatores vasculares, tubulares e inflamatórios seguidos por um processo de reparação que pode restaurar a função e a diferenciação epitelial ou resultar em DRC com aparecimento progressivo de fibrose [5,6].

Tem sido demonstrado que a mortalidade de pacientes com DRC está diretamente relacionada à função renal. A alta mortalidade desta população é devida principalmente a doenças cardiovasculares e infecções. Entretanto, esses riscos tradicionais explicam apenas metade das causas de mortalidade nesses pacientes. Atualmente, vários estudos estão sendo direcionados a fatores de riscos não tradicionais, como, por exemplo, a vitamina D [7].

Várias linhas de evidência têm demonstrado que com o agravamento da função renal há um declínio progressivo na atividade da 1- α -hidroxilase, a enzima que converte a 25-hidroxivitamina D em 1,25 diidroxivitamina D. Tal alteração promove o surgimento do hiperparatireoidismo secundário, influenciando na mortalidade de pacientes com DRC. É sabido que a vitamina D desempenha importante papel regulatório no organismo com seus efeitos pleiotrópicos e ação em diferentes órgãos e sistemas do organismo, tais como: sistema vascular, função cardíaca, sistema imunológico, homeostase da coagulação e na regulação da paratireóide [7].

1.1. Vitamina D

A vitamina D é um hormônio circulante no organismo e está envolvida na 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 diidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] [8,9].

A expressão “vitamina D” é empregada para designar vários compostos, entre eles, o colecalciferol (vitamina D3) e o ergocalciferol (vitamina D2). O colecalciferol é produzido pelas células da pele chamadas queratinócitos a partir de um produto residual do colesterol, o 7-deidrocolesterol, em resposta aos raios solares UVB. O ergocalciferol (vitamina D2) é derivado de um esteróide vegetal e a molécula resultante apresenta pequenas diferenças estruturais em relação à vitamina D3. No entanto, nenhuma dessas moléculas tem qualquer atividade no organismo. Assim, cada molécula precisa ser modificada por uma série de enzimas através de um processo denominado hidroxilação, a fim de gerar 25-hidroxivitamina D, conhecida como 25(OH)D [10].

O primeiro passo da hidroxilação ocorre no fígado, e a 25(OH)D é a forma circulante no organismo. A produção da 25(OH)D no fígado, além de rápida, sofre

pouca regulação. Deste modo, seus níveis plasmáticos refletem a reserva corporal de vitamina D. A conversão final, ou seja, a geração da forma biologicamente ativa ocorre nos rins, nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais do rim, onde a 25(OH)D é novamente hidroxilada pela ação da enzima 1- α -hidroxilase, presente também em outros tecidos, se transformando em 1,25 diidroxivitamina D [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) [10]. O FGF-23 é um hormônio secretado pelos osteócitos que suprime a transcrição da enzima 1- α -hidroxilase, e estimula a fosfatúria, reduzindo a síntese de 1,25(OH)₂D [11].

A elevação plasmática do PTH e a diminuição do fosfato estimulam a atividade da 1- α -hidroxilase. A 1,25(OH)₂D retro-regula sua produção, inibindo a atividade da 1- α -hidroxilase, o mesmo ocorrendo com a redução do PTH e a elevação do fosfato. A síntese renal é responsável por gerar boa parte do estoque de 1,25(OH)₂D circulante no organismo [7,10]. A molécula 1,25(OH)₂D atua ligando-se a uma proteína conhecida como receptor de vitamina D (VDR) no interior do núcleo celular. Uma vez capturada pela 1,25(OH)₂D, a proteína VDR busca uma proteína companheira, o receptor do retinóide-x (RXR), e o complexo que se forma se conecta a uma região específica do DNA que induz o mecanismo celular a iniciar a transcrição gênica [12].

O receptor ou proteína VDR é encontrado em vários tecidos do organismo, assim como em células imunológicas circulantes, indicando que a forma ativa da vitamina D tem a função de regular a atividade gênica de vários tecidos, como do cérebro, ossos, intestino, rins, fígado, pâncreas, entre outros [8].

A vitamina D vem recebendo atenção cada vez maior do meio científico nas últimas décadas. Além do seu conhecido papel na homeostase do cálcio e do fósforo e na mineralização óssea, sabe-se que a 1,25(OH)₂D atua em vários sistemas biológicos do organismo e recentemente tem sido avaliada quanto a um possível papel na progressão da doença renal [13]. Em 2007, um estudo avaliou o papel da monoterapia

com inibidores de enzima de conversão de angiotensina *versus* associação com um análogo de vitamina D, o paricalcitol. Foi verificado que o paricalcitol pôde suprimir a progressão da doença renal via mediação da citocina pró-fibrótica *Transforming growth factor-β1* (TGF-β1), sendo esse efeito amplificado quando houve o controle pressórico através do bloqueio do sistema renina-angiotensina [14].

1.2. Deficiência de Vitamina D

A deficiência de vitamina D é atualmente reconhecida como pandemia. A maior causa para sua deficiência é a falta de apreciação de que a exposição solar moderada é ainda a maior fonte de vitamina D para os humanos. Na Europa, ela é maior nos países mais ensolarados da região do mediterrâneo do que nos países escandinavos. Assim, habitantes de países ensolarados como o Brasil também apresentam deficiência dessa vitamina [15,16].

Contudo, existem outros fatores que interferem na produção de vitamina D₃ pela pele, tais como, estações do ano, latitude, hora do dia, idade, pigmentação da pele e uso de protetores solares. Na ausência de exposição ao sol, recomenda-se a ingestão de vitamina D através de fontes exógenas, como peixes gordurosos (arenque, cavala, salmão, sardinha, atum), óleo de fígado de peixes, como o de bacalhau, fígado, ovos, carne de vitela, cogumelos, manteiga, alimentos fortificados (leite de vaca, leite de soja, suco de laranja e cereais) e suplementações [16,17]. A suplementação dessa vitamina cresceu consideravelmente nos últimos anos e vem sendo cada vez mais recomendada, em particular durante os meses de inverno em que a exposição ao sol é reduzida [16].

Os principais indicadores das reservas corporais de vitamina D são os níveis plasmáticos de 25(OH)D, entretanto, as concentrações plasmáticas ideais desse hormônio para a manutenção das funções fisiológicas normais ainda são motivo de discussão na literatura. Holick *et al* discutem que apesar de não existir consenso sobre

nível ótimo de 25(OH)D, a maioria dos especialistas define deficiência como níveis plasmáticos menores que 20 ng/mL ; insuficiência como níveis plasmáticos entre 21-29 ng/mL e suficiência de 25(OH)D como níveis plasmáticos maiores que 30 ng/mL [10]. Estes valores são baseados na observação de que a absorção intestinal de cálcio é maximizada com níveis de 25(OH)D acima de 32 ng/mL em mulheres pós-menopausadas e que a concentração de PTH atinge o ponto mais baixo com concentrações de 25(OH)D entre 30-40 ng/mL. Em geral, a intoxicação ocorre com níveis de 25(OH)D superiores a 150 ng/mL [10,15].

1.3. Deficiência de Vitamina D na Doença Renal Crônica

As doenças renais, mesmo nas fases iniciais, são acompanhadas pela diminuição dos níveis de 25(OH)D e de 1,25(OH)₂D. A 1,25(OH)₂D diminui devido a redução da atividade da 1- α -hidroxilase e coincide com o aumento da concentração de PTH. A progressão da doença acarreta no acúmulo de fosfato e na elevação do FGF-23, levando a um declínio ainda maior nos níveis séricos de 1,25(OH)₂D. O FGF-23, produzido pelos osteócitos, promove excreção renal de fosfato, suprimindo a produção de 1,25(OH)₂D via inibição da 1- α -hidroxilase e estimulação da 24-hidroxilase [18-21].

Outro fator que contribui para a redução da 25(OH)D e de 1,25(OH)₂D é a proteinúria, especialmente em pacientes com nefropatia diabética, devido a perda do complexo *vitamin-D binding protein*-calcidiol [DBP-25(OH)D] pela urina, reduzindo, portanto, sua captura no túbulo proximal pela megalina – proteína associada a endocitose. A ausência de recaptção do complexo DBP-25(OH)D prejudica a formação de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D, levando a redução dos níveis séricos de vitamina D. É importante lembrar que os metabólitos de vitamina D são moléculas lipofílicas com pouca solubilidade aquosa devendo ser transportados na circulação ligados através de proteínas plasmáticas. O mais importante destes carreadores é a proteína DBP [12,19,22].

A prevalência da deficiência da vitamina D aumenta com a progressão da DRC e acomete 80% dos pacientes classificados em estágio 5 da doença. A deficiência de vitamina D também tem sido relacionada ao aumento da prevalência da hipertensão, síndrome metabólica, resistência à insulina, obesidade, doença cardiovascular e albuminúria [7]. Tal achado implica em aumento de morbidade e gera preocupação nos dias atuais.

1.4. FGF-23 e Klotho

Originalmente, o nome Klotho foi dado a um gene descoberto fortuitamente em 1997. Camundongos mutantes (*knock-out*) para α -klotho (α -kl) foram descritos como modelos de curta existência que exibiam uma variedade de fenótipos prematuros relacionados ao envelhecimento, tais como arterioesclerose, calcificação vascular em vários tecidos moles, redução da densidade mineral óssea, enfisema, hipertrofia cardíaca, surdez, hipogonadismo hipogonadotrófico, incoordenação de movimentos, atrofia da pele, bem como hiperfosfatemia severa em associação com redução nos níveis de vitamina D (1,25(OH)₂D) [23].

Desde a sua descoberta, muitos estudos foram realizados e a ideia corrente é de que o gene α -klotho codifica uma proteína transmembrana de passagem única altamente expressa no tecido renal e uma forma solúvel - proteína pleiotrópica com efeitos renais e extra-renais [24,25]. O gene α -klotho é expresso predominantemente no túbulo distal renal assim como nas células da glândula paratireoide e no plexo coroide. Sua proteína forma complexos binários com os receptores de FGF (FGFR), aumentando sua afinidade e seletividade pelo fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) [26].

O FGF-23 pertence à família dos FGF, nesse caso específico à subfamília FGF-19, com composição de 251 aminoácidos. Ele é produzido principalmente no tecido ósseo pelos osteócitos e osteoblastos, frente a elevação nos níveis séricos de fósforo sendo

também produzido por tecidos como fígado e rim. A atividade fosfatúrica do FGF-23 deve-se a sua propriedade em reduzir o número de cotransportadores sódio-fósforo do tipo 2 (NaPi-2a) na borda em escova dos túbulos proximais, promovendo a excreção renal de fósforo. 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 [24,27,28].

Durante os estágios iniciais da DRC, o FGF-23 evita o desenvolvimento de hiperfosfatemia e do hiperparatireoidismo secundário devido a sua capacidade de aumentar excreção de fósforo e inibir diretamente a produção do PTH. 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 [27].

1.5. Mecanismos de fibrose e progressão de lesão renal

A fibrose intersticial é característica da lesão renal crônica e está intimamente correlacionada com a deterioração da função renal [6]. A fibrose renal progressiva é a manifestação mais comum presente nos variados tipos de DRC resultando em perda irreversível do parênquima renal e conseqüentemente em doença renal terminal [6]. Representa uma resposta fisiopatológica comum de muitos tecidos a inflamação e injúria crônica. Esse processo inclui uma série de eventos, tais como:

- 1) Dano a barreira epitelial/endotelial;
- 2) Liberação de TGF- β 1 (*Transforming growth factor- β 1*), a principal citocina fibrogênica;
- 3) Recrutamento de células inflamatórias;
- 4) Indução de espécies reativas de oxigênio (ROS);

- 5) Ativação de células produtoras de colágeno;
- 6) Ativação de miofibroblastos [29].

A fibrose intersticial caracteriza-se, de modo geral, pelo acúmulo de proteínas de matriz extracelular (MEC), como o colágeno (tipos I, III, V, VI), fibronectina, condroitina e heparan sulfato, dentre outros. O aumento da matriz não se relaciona apenas com aumento na síntese dessas proteínas, mas também pela diminuição na degradação das mesmas. 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). A secreção das metaloproteinases é induzida por fatores de crescimento (PDGF, FGF), citocinas (IL-1, TNF- α), fagocitose e estresse físico. Por outro lado, é inibida pelo TGF- β 1 e esteroides [29,30].

Várias citocinas parecem estar envolvidas na gênese e progressão do processo fibrótico, tais como o TGF- β 1 (*Transforming growth factor- β 1*), PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), angiotensina II, e outras interleucinas. Contudo, o TGF- β 1 vem sendo apontado, em vários estudos, como a principal citocina indutora de fibrose. Tal fato justifica-se por estar associado ao aumento na síntese de proteínas de matriz, diminuição na produção de metaloproteinases, além de uma possível participação com a indução da transição epitélio-mesenquimal (TEM) [30].

Inicialmente descrita apenas no desenvolvimento embrionário e na metástase tumoral, a TEM caracteriza-se por ser um processo através do qual células epiteliais diferenciadas adultas sofrem conversão fenotípica para células do tipo miofibroblasto e fibroblasto produtor de matriz. Aparentemente, é precedida de inflamação intersticial crônica e poderia ser uma resposta adaptativa das células epiteliais a um microambiente hostil [31].

A TEM encontrada na fibrogênese renal caracteriza-se pela perda das junções célula-célula e consequente perda da polaridade celular, acompanhados de mudanças fenotípicas das células epiteliais que adquirem morfologia de fibroblastos. As células em transição podem permanecer no túbulo renal, porém, não apresentam mais a capacidade de transporte. Em uma etapa posterior, elas podem migrar para o interstício e contribuir para os processos inflamatórios e pró-fibróticos. A TEM é identificada pela diminuição dos marcadores epiteliais como E-caderina, *zonula occludens-1* (ZO-1), citoqueratina e por um aumento na expressão de marcadores de células mesenquimais, tais como, vimentina, alfa actina de músculo liso (α -SMA) e proteína específica de fibroblasto 1 (FSP1). Além disso, os miofibroblastos e fibroblastos ativos apresentam expressão elevada de TGF- β 1 e também marcadores de matriz extracelular, como colágenos tipo 1 e 4 e fibronectina. Contudo, o grau de contribuição da TEM na fibrose renal ainda permanece sob debate [31,32].

Outro ponto de destaque seria o papel dos macrófagos como mediadores fundamentais na inflamação e como fonte de TGF- β 1 no rim. Fechando um ciclo vicioso, encontramos o TGF- β 1 que é um potente quimioatrativo para macrófagos e demais células inflamatórias, perpetuando o processo [29].

1.6. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, DRC e vitamina D

Já é sabido que o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desempenha importante função para a progressão da doença renal e suas complicações associadas. Estudos tem demonstrado uma regulação negativa do gene da renina pela vitamina D. Em 2002, Li e cols demonstraram que 1,25(OH) $_2$ D suprime diretamente a expressão e a atividade do gene da renina em cultura de células [33,34].

Na DRC, os baixos níveis de calcitriol aumentariam a produção de renina e a ativação subsequente do SRAA, por outro lado, reduziria a expressão da proteína Klotho, co-fator do FGF-23. Além disso, o aumento nos níveis de FGF-23 levaria a supressão da 1- α -hidroxilase e consequente redução na geração do calcitriol. Existem

evidências crescentes na literatura de que o desequilíbrio na interação entre vitamina D, FGF-23, Klotho e SRAA contribuiriam para progressão da lesão renal [33].

Outro modulador humoral envolvido seria a aldosterona. Muito se discute atualmente quanto a sua participação nos mecanismos de fibrose renal e miocárdica. Dentre os vários mecanismos citados na literatura, há relato de que a aldosterona pode induzir disfunção mitocondrial culminando na TEM de células tubulares epiteliais através do estímulo para a expressão de citocinas pró-fibróticas como o TGF- β 1, PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio-1), ET-1 (endotelina-1), osteopontina, dentre outros [35].

Em suma, tendo em vista o importante papel da vitamina D na manutenção das funções fisiológicas essenciais e homeostase mineral e a observação da queda dos níveis deste hormônio na doença renal crônica, torna-se relevante o estudo da deficiência de vitamina D nos eventos envolvidos na evolução crônica da lesão renal aguda em modelo experimental de isquemia/reperfusão renal.

2. OBJETIVO

Verificar o efeito da deficiência de vitamina D em ratos submetidos à isquemia/reperfusão renal e os eventos envolvidos na evolução crônica da lesão renal aguda, tais como:

- 1) Vias inflamatórias (infiltração de macrófagos e monócitos),
- 2) Ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona,
- 3) Metabolismo de cálcio e fósforo,
- 4) Vias de fibrose,
- 5) Avaliação de modificações fenotípicas das células renais.

3. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corpóreo em torno de 180-200 g, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório em temperatura ambiente ($23\pm1^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, processo nº 088/12).

Utilizamos 38 ratos machos que receberam dieta padrão ou depletada em vitamina D (0,4% Ca e 0,4% P) da marca MP *Biomedicals* (Irvine, CA, EUA) durante 90 dias. Para avaliarmos se a quantidade de dieta consumida foi equivalente, os grupos de animais foram colocados em gaiolas coletivas onde receberam dieta, com livre acesso à água. Efetuou-se, diariamente, o balanço da ingesta de dieta e água. O peso dos animais foi verificado semanalmente.

3.1. Grupos experimentais

Foram estudados quatro grupos de animais:

- 1) **Controle (C):** ratos que receberam dieta padrão por 90 dias ($n=11$). No 28º dia foi feita a cirurgia controle e o clearance de inulina foi realizado 62 dias após o insulto cirúrgico.
- 2) **Isquemia (Isq):** ratos que receberam dieta padrão por 90 dias ($n=10$). No 28º dia foi feita a isquemia renal e o clearance de inulina foi realizado 62 dias após o insulto cirúrgico.

- 3) **Deficiência de vitamina D (dVD):** ratos que receberam dieta depletada em vitamina D por 90 dias (n=8). No 28º dia foi feita a cirurgia controle e o clearance de inulina foi realizado 62 dias após o insulto cirúrgico.
- 4) **Deficiência de vitamina D e Isquemia (dVD+Isq):** ratos que receberam dieta depletada em vitamina D por 90 dias (n=9). No 28º dia foi feita a isquemia renal e o clearance de inulina foi realizado 62 dias após o insulto cirúrgico.

No 28º dia após o início dos tratamentos, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1 mL/100g de rato) e uma incisão abdominal foi feita para a cirurgia controle (sham) ou isquemia/reperfusão. A isquemia renal foi realizada clampeando-se as artérias de ambos os rins por 45 minutos, seguida de uma reperfusão.

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 para a coleta de urina de 24 horas e posterior determinação das concentrações urinárias de sódio e cálcio por eletrodo específico (ABL800 Flex Analyzer - Radiometer, Brønshøj, Dinamarca), e da concentração urinária de fósforo por sistema colorimétrico (COBAS C111 Analyzer - Roche®, EUA). O cálculo das frações de excreção de sódio (FENa), cálcio (FECa) e fósforo (FEP) foi realizado. A concentração urinária de proteína (U_{Prot}) foi determinada por sistema colorimétrico usando kit comercial *Sensiprot* (LabTest, MG, Brasil). Ao final do experimento, verificou-se o volume urinário e a ingesta de água.

3.4. Determinação da pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal 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 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.

Para a avaliação do fluxo sanguíneo renal (FSR) foi feita uma incisão mediana abdominal, o pedículo renal esquerdo foi dissecado e a artéria renal isolada. Cuidadosamente, uma sonda de fluxo ultrassônico foi acoplada na artéria renal e obteve-se a mensuração do fluxo sanguíneo renal em mL/min (T110; Transonic Systems, Bethesda, MD, EUA). A resistência vascular renal foi calculada dividindo-se a PAM pelo FSR e o resultado foi expresso em mmHg/mL/min.

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 sensível (ABL800 Flex Analyzer - Radiometer, Brønshøj, Dinamarca); cálcio total (P_{Ca}), fósforo (P_P), colesterol total e triglicérides por sistema colorimétrico (COBAS C111 Analyzer - Roche®, EUA).

Outras análises realizadas foram a concentração plasmática de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) e aldosterona, avaliadas pelo método de radioimunoensaio usando kit comercial *25-Hydroxyvitamin D* ^{125}I RIA (DiaSorin®, Vercelli, Itália) e *Aldosterone* (Immunotech®, Marselha, França), respectivamente. Os níveis de PTH intacto e FGF-23 plasmáticos foram avaliados pelo método de ELISA usando kit comercial *Rat Bioactive Intact PTH* (Immutopics®, CA, EUA) e FGF-23 ELISA Kit (Kainos Laboratories®, Tóquio, Japão), respectivamente.

Após a coleta do sangue, os rins foram perfundidos com solução de tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). Em seguida, o rim direito foi removido, congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para análise da expressão de proteínas pela técnica de *Western blotting* ou da expressão gênica por q-PCR. O rim esquerdo foi pesado e em seguida fixado em formalina tamponada 10% ou solução de methacarn e mantido nestes mesmos fixadores por um período de 24 horas. Após esse período, os fixadores foram substituídos 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.

3.5. Análise Histomorfométrica

As amostras de tecidos renais foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Após inclusão em parafina, obtiveram-se cortes de 4 μm , que foram corados pela reação de hematoxilina-eosina (HE) e/ou tricrômio de Masson para avaliação da área glomerular e da área intersticial relativa (AIR).

3.5.1. Avaliação da área glomerular

Cortes de 4 μm de espessura de tecido renal dos animais foram usados para análise da área glomerular. As imagens foram obtidas pela microscopia óptica por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (Axiovision, Carl Zeiss, Eching, Alemanha). Foram analisados 80 glomérulos no córtex de cada rim. A área glomerular (μm^2) foi circulado manualmente e calculada automaticamente através do software. Após obtenção dos dados foi feita a média aritmética da área dos glomérulos medidos.

3.5.2. 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 (Axiovision, Carl Zeiss, Eching, Alemanha). Foram analisados 30 campos de $0,087 \text{ mm}^2$ 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.

3.6. Análise Imuno-histoquímica

Os cortes de tecido renal foram incubados com os seguintes anticorpos: anti-ED1 (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) na diluição 1/500; anti-colágeno tipo IV (Abcam, Cambridge, Reino Unido) na diluição 1/200; anti-fibronectina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) na diluição 1/400; anti- α -SMA (Millipore, Billerica, MA, EUA) na diluição 1/1000 e anti-vimentina (Dako, Glostrup, Dinamarca) na diluição 1/50, 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.

Para avaliação da imunorreação para colágeno tipo IV, fibronectina, α -SMA e vimentina, as proporções de volume de áreas positivas no tecido renal, determinadas pelo limite de cor, foram obtidas pela análise de imagem usando o software Image-Pro® Plus 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) em um computador compatível ligado a uma câmera digital acoplada a um microscópio (Carl Zeiss Axioskop 40, Eching, Alemanha). A proporção de volume é expressa como a área positiva (μm^2) para os marcadores (colágeno tipo IV, fibronectina, α -SMA e vimentina) depois de feita a divisão pela área total do campo analisado (μm^2). Os resultados foram expressos como porcentagens [36].

A avaliação dos resultados da imunorreação para ED-1 (monócitos/macrófagos) foi realizada contando-se o número de células ED-1 positivas por área de 0,087 mm² de córtex renal e em seguida foi determinado o número médio de células por campo para cada animal [37].

3.7. Análise da expressão protéica: *Western Blotting*

Para a realização da técnica de *Western blotting* foram utilizadas as amostras de tecido renal dos animais tratados com dieta padrão e dos animais tratados com dieta depletada em vitamina D, previamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

A extração da proteína seguiu o protocolo descrito por Burnette [38], com pequenas modificações. As amostras dos tecidos renais foram homogeneizadas (Polytron PT 10-35) 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 (Bioagency Laboratórios, São Paulo/SP, Brasil). 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 1 hora. A incubação primária foi feita com anticorpos anti-Klotho (1/500), anti-VDR (1/500) e anti-TGF- β (1/200) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). A incubação secundária foi realizada com anticorpo anti-coelho (1/2.000) ou anti-cabra (1/10.000) (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). A normatização

foi feita com uma nova hibridização das membranas com anticorpo anti- α -actina (Santa Cruz, Biotechnology, CA, EUA). A semi-quantificação das proteínas foi feita pelo software Scion Image for Windows (Scion Corporation – NIH Image).

3.8. Análise da expressão gênica: reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

3.8.1. Extração de RNA

Em tubos plásticos de 50 ml, foram adicionados 50 mg de tecido renal para 1 ml de reagente TRIzol[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) que foram homogeneizados com auxílio de um Polytron. Em seguida, foi adicionado 200 μ l de clorofórmio ao homogenato. Após centrifugação e separação das fases, o RNA foi transferido para tubos plásticos de 2 ml para precipitação, lavagem e ressuspensão. As concentrações de RNA de cada amostra foram determinadas por Nanodrop[®].

3.8.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativa - qPCR

Fitas únicas de cDNA foram sintetizadas a partir das amostras de RNA isolado utilizando-se o reagente SuperScript[®] VILO™ MasterMix (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), na proporção de 4 μ l do reagente para até 2,5 μ g de RNA. A reação em cadeia da polimerase (qPCR) foi feita por TaqMan (Applied Biosystem, EUA) para as seguintes moléculas: renina (REN) sonda Rn00561847_m1, angiotensinogênio (AGT) sonda Rn00593114_m1, enzima conversora de angiotensina (ECA) sonda Rn00561094_m1, receptor AT1 da angiotensina II tipo a (AGTR1a) sonda Rn02758772_s1, receptor AT1 da angiotensina II tipo b (AGTR1b) sonda Rn02132799_s1, receptor de vitamina D (VDR) sonda Rn00690616_m1, klotho (KLO) sonda Rn00580123_m1 e canal epitelial de cálcio-1 (TRPV5) sonda Rn00587268_m1. A sonda Rn01775763_g1 para GAPDH foi utilizada como controle. Todas as reações de

qPCR foram conduzidas em duplicata, utilizando-se o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, CA, EUA). Controles negativos sem amostras de cDNA foram feitos para cada sonda. As condições de ciclagem foram as seguintes: 2 min a 50°C seguidos de 10 min a 95°C; posteriormente, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguido de 1 minuto a 60°C. Os valores de Ct (ciclo limiar) do gene alvo foram normalizados pelos valores de Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}$). Pelo fato do Ct do gene de referência permanecer constante, a alteração no valor de ΔCt corresponde a uma variação na expressão do gene alvo. Pela comparação do valor de ΔCt de amostras desconhecidas com o ΔCt de uma amostra controle, o valor de $\Delta \Delta Ct$ é obtido. Assim, a expressão gênica relativa é calculada aplicando-se a equação $2^{-\Delta \Delta Ct}$ para quantificar a expressão de genes [39].

3.9. Análise Estatística

Os resultados da expressão proteica de TGF- β 1 e VDR foram analisados pelo test t Student seguido pelo teste de Mann-Whitney. Os demais 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 foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os níveis plasmáticos da 25-hidroxivitamina D, forma circulante do hormônio, foram indetectáveis ($<1,5$ ng/mL) nos grupos dVD e dVD+Isq, enquanto os demais grupos ($C=15,4\pm1,0$ e $Isq=15,0\pm0,6$) apresentaram dosagens séricas semelhantes de 25(OH)D. Esses resultados demonstram que a dieta depletada em vitamina D oferecida aos animais foi efetiva na obtenção do modelo experimental de deficiência em vitamina D.

Em relação ao peso corporal, não houve diferença significativa entre os grupos estudados quando comparados ao grupo controle no decorrer dos 3 meses de observação. Porém, o grupo Isq apresentou menor peso ($479,8\pm13,61$ g) comparativamente ao grupo dVD ($551,4\pm19,82$ g), de forma significativa (tabela 1). Os dados da relação peso renal/peso corpóreo mostraram aumento significativo nos grupos Isq e dVD+Isq ($0,42\pm0,02$ e $0,44\pm0,01$) em relação aos grupos dVD e C ($0,35\pm0,01$ e $0,36\pm0,01$), sugerindo hipertrofia renal (figura 1, tabela 1).

Figura 1 – Relação entre peso renal/peso corpóreo de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média ± EPM. ^c $p<0,05$ vs. C ; ^e $p<0,01$ vs. dVD e ^f $p<0,05$ vs. dVD.

Não houve diferença significativa nos parâmetros de ingestão de água e volume urinário (mL/24h) entre os grupos estudados nesse protocolo, com volume urinário médio para os grupos C ($14,23 \pm 0,93$), dVD ($13,40 \pm 1,03$), Isq ($14,42 \pm 1,71$) e dVD+Isq ($11,13 \pm 1,77$) (tabela 1).

A taxa de filtração glomerular, avaliada pelo clearance de inulina (mL/min/100g), não apresentou diferença significativa entre os grupos, apresentando os seguintes valores: C ($0,62 \pm 0,02$), dVD ($0,56 \pm 0,04$), Isq ($0,57 \pm 0,04$) e dVD+Isq ($0,57 \pm 0,02$), conforme demonstrado na tabela 1, figura 2.

Figura 2 - Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada pelo *clearance* de inulina de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM.

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, notou-se um aumento significativo na pressão arterial média (PAM) entre os grupos estudados neste protocolo. Os níveis de PAM (mmHg) dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq ($135,2 \pm 3,4$, $137,3 \pm 3,6$ e $134,5 \pm 5,2$, respectivamente) foram estatisticamente maiores quando comparados ao grupo C ($119,4 \pm 2,29$), (figura 3 e tabela 1). Essa alteração sugere uma possível interação da hipovitaminose D com o controle da pressão arterial, provavelmente envolvendo o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O fluxo sanguíneo renal (FSR) (mL/min) dos grupos C, dVD, Isq e dVD+Isq ($5,6 \pm 0,02$, $5,8 \pm 0,06$, $5,6 \pm 0,08$ e $5,8 \pm 0,07$, respectivamente), assim como a resistência vascular renal (RVR) (mmHg/mL/min) dos grupos C, dVD, Isq e dVD+Isq ($22,02 \pm 0,52$, $24,82 \pm 1,09$, $24,72 \pm 0,67$ e $23,40 \pm 0,91$, respectivamente) não mostraram diferenças significativas entre os grupos (tabela 1).

Figura 3 – Pressão arterial média (PAM) de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^c $p < 0,05$ vs. C.

Tabela 1. Peso renal, parâmetros funcionais e hemodinâmicos ao final dos 90 dias de acompanhamento dos animais dos grupos controle, deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq).

Parâmetros	Controle	dVD	Isq	dVD+Isq
C _{in} (ml/min/100 g)	0,62 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,57 ± 0,02
Peso (g)	519,4±11,63	551,4±19,82	479,8±13,61 ^e	510,1±14,08
PR/PC	0,36±0,01	0,35±0,01	0,42±0,02 ^{c,f}	0,44±0,01 ^{c,e}
PAM (mmHg)	119,4±2,29	135,2±3,4 ^c	137,3±3,6 ^c	134,5±5,2 ^c
RVR (mmHg/ml/min)	22,02±0,52	24,82±1,09	24,72±0,67	23,4±0,91
FSR (mL/min)	5,6±0,02	5,8±0,06	5,6±0,08	5,8±0,07
Volume Urinário (mL)	14,23±0,93	13,40±1,03	14,42±1,71	11,13±1,77

Os dados são expressos como média±EPM. ^cp < 0,05 vs C, ^ep < 0,01 vs dVD, ^fp < 0,05 vs dVD. C_{in}, clearance de inulina; PR/PC, relação peso renal/peso corpóreo; PAM, pressão arterial média; RVR, resistência vascular renal; FSR, fluxo sanguíneo renal.

A dosagem de aldosterona plasmática nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq ($455,8 \pm 68,95$, $416,0 \pm 89,18$ e $502,5 \pm 134,2$, respectivamente) evidenciou aumento significativo nos grupos estudados quando comparados com o grupo C ($165,7 \pm 17,25$). Os níveis de aldosterona plasmática estão representados na figura 4.

Figura 4 – Concentração plasmática de aldosterona de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquêmicos (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^c $p < 0,05$ vs. C.

A análise do qPCR dos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) revelou um aumento significativo da expressão gênica da renina, angiotensinogênio e enzima conversora de angiotensina (ECA) em todos os grupos de animais experimentais quando comparados ao grupo C. Com relação à renina, as expressões gênicas encontradas para os grupos C, dVD, Isq e dVD+Isq foram respectivamente $0,67 \pm 0,48$, $2,28 \pm 0,28$, $2,51 \pm 0,30$ e $2,34 \pm 0,28$. As expressões gênicas de angiotensinogênio para os grupos C, dVD, Isq e dVD+Isq foram respectivamente $0,95 \pm 0,44$, $2,94 \pm 0,68$, $4,02 \pm 0,59$ e $4,53 \pm 0,63$. Em relação à ECA, as expressões gênicas para os grupos C, dVD, Isq e dVD+Isq, foram respectivamente $1,10 \pm 0,62$, $3,93 \pm 0,82$, $5,27 \pm 0,94$ e $5,89 \pm 1,27$. Não observamos alterações na expressão gênica para os receptores de angiotensina do tipo 1a e 1b entre os grupos estudados. Os dados

referentes à expressão gênica dos componentes do SRAA estão representados na figura 5 e na tabela 2.

Figura 5 – Expressão gênica dos componentes do SRAA realizada pela técnica de qPCR de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média $\pm$ EPM. ^bp<0,01 vs. C e ^cp<0,05 vs. C.

Tabela 2 – Avaliação da expressão gênica dos componentes do SRAA no tecido renal ao final dos 90 dias de acompanhamento dos animais dos grupos controle, deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq).

Parâmetros	Controle	dVD	Isq	dVD+Isq
Renina	0,68 $\pm$ 0,49	2,28 $\pm$ 0,28 ^b	1,85 $\pm$ 0,47 ^c	2,34 $\pm$ 0,28 ^c
Angiotensinogênio	0,95 $\pm$ 0,45	2,95 $\pm$ 0,69 ^c	4,02 $\pm$ 0,60 ^b	4,53 $\pm$ 0,63 ^b
ECA	1,10 $\pm$ 0,63	3,94 $\pm$ 0,82 ^c	5,28 $\pm$ 0,94 ^c	5,90 $\pm$ 1,28 ^c
AGTR1a	1,07 $\pm$ 0,21	1,24 $\pm$ 0,18	1,50 $\pm$ 0,20	1,38 $\pm$ 0,18
AGTR1b	1,20 $\pm$ 0,49	1,26 $\pm$ 0,53	1,83 $\pm$ 1,04	1,96 $\pm$ 0,55

Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. Os cálculos foram feitos a partir da expressão gênica do gene alvo após comparação com o gene de referência (GAPDH), ou seja, GENE ALVO/GAPDH ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). ECA, enzima conversora de angiotensina; AGTR1a, receptor de angiotensina tipo 1a; AGTR1b, receptor de angiotensina tipo 1b. ^bp < 0,01 vs C; ^cp < 0,05 vs C.

A análise conjunta dos dados referentes a PAM, aldosterona e expressão gênica dos componentes do SRAA é corroborativa e sugere a participação do SRAA no aumento da PAM dos animais depletados em vitamina D.

A dosagem dos níveis séricos de eletrólitos – sódio e potássio (mEq/L) ; cálcio, fósforo (mg/dL) - não evidenciou diferença estatística entre os grupos, assim como as frações de excreção dos íons sódio, fósforo e cálcio também não demonstraram diferença entre os grupos estudados (tabela 3).

O estudo do perfil lipídico acrescentou informações importantes ao trabalho. Os animais do grupo dVD, Isq e dVD+Isq apresentaram aumento significativo dos níveis de colesterol total ($66,74 \pm 4,62$, $60,05 \pm 3,47$ e $61,73 \pm 4,56$ mg/dL, respectivamente) quando comparados com o grupo C ($42,66 \pm 2,77$ mg/dL), (tabela 3, figura 6). Os níveis de triglicerídeos (mg/dL) estavam elevados principalmente nos grupos submetidos a dieta depletada em vitamina D, com níveis médios de $171,5 \pm 32,6$ para o grupo dVD enquanto os grupos C, Isq e dVD+Isq apresentaram $42,69 \pm 16,88$, $47,54 \pm 7,46$ e $87,20 \pm 18,16$ mg/dL, respectivamente (tabela 3 e na figura 6).

Figura 6 – Níveis plasmáticos de colesterol total (A) e de triglicerídeos (B) de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 vs. C; ^bp<0,01 vs. C; ^dp<0,001 vs. dVD; ^ep<0,01 vs. dVD.

Nossos dados referentes à proteinúria evidenciaram aumento significativo ($p<0,01$) da excreção urinária de proteínas (mg/24h) no grupo dVD+Isq ($33,28\pm1,05$) em relação aos demais grupos estudados (tabela 3 e figura 7).

Figura 7 – Proteinúria de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média ± EPM. ^b $p<0,01$ vs. C; ^e $p<0,01$ vs. dVD; ^h $p<0,01$ vs. Isq.

Com relação ao eixo PTH – Klotho – FGF-23 e o receptor de vitamina D (VDR), encontramos alguns resultados interessantes.

Referente à concentração plasmática de PTH intacto (pg/mL), os animais do grupo dVD+Isq apresentaram uma elevação significativa desse hormônio ($2187\pm336,3$) quando comparados aos grupos C e Isq ($318,8\pm59,28$ e $453,2\pm95,92$). O grupo dVD também apresentou uma tendência de elevação nos níveis do PTH ($1470\pm628,3$), porém, não significativa. Os níveis de PTH estão representados na figura 8 (mediana) e tabela 3.

Figura 8 – Concentração plasmática de PTH intacto de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). A linha horizontal corresponde a mediana. ^bp<0,01 vs C; ^gp<0,001 vs. Isq.

A dosagem dos níveis séricos de FGF-23 (pg/mL) evidenciou um decréscimo nos níveis desse hormônio nos grupos dVD e dVD+Isq ($41,85 \pm 14,67$ e $77,41 \pm 18,50$ mg/dL, respectivamente) quando comparados aos grupos C e Isq ($293,1 \pm 33,81$ e $225,4 \pm 24,04$). Os níveis de FGF-23 estão representados na figura 9 e tabela 3.

Figura 9 – Concentração plasmática de FGF-23 de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 vs C; ^gp<0,001 vs. Isq.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos avaliados ao final dos 90 dias de acompanhamento dos animais dos grupos controle, deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq).

Parâmetros	Controle	dVD	Isq	dVD+Isq
PTH plasmático (pg/mL)	318,8±59,28	1470±628,3	453,2±95,92	2187 ± 336,3 ^{bg}
FGF-23 (pg/mL)	293,1±33,81	41,85±14,6 ^{ag}	225,4±24,04	77,41±18,50 ^{ag}
P _{Na} (mEq/L)	139,5 ± 1,2	136 ± 0,6	137,4 ± 2,2	137,7 ± 0,6
P _K (mEq/L)	4,6 ± 0,09	4,0 ± 0,19	4,5 ± 0,10	4,3 ± 0,17
P _{Ca} (mg/dL)	9,48 ± 0,50	8,81 ± 0,41	9,28 ± 0,15	8,17± 0,40
P _P (mg/dL)	4,8 ± 0,20	5,2 ± 0,24	5,5 ± 0,21	5,3 ± 0,28
FENa (%)	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01
FE _{Ca} (%)	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,21 ± 0,05	0,15 ± 0,01
FEP (%)	8,27 ± 1,24	6,84 ± 0,56	10,06 ± 1,49	11,17 ± 2,25
Colesterol total	42,66±2,77	66,74±4,62 ^a	60,05±3,47 ^b	61,73±4,56 ^b
Triglicerídeos	42,69±16,88	171,5±32,6 ^a	47,54±7,46 ^d	87,2±18,16 ^e
Proteinúria (mg/24h)	25,19 ± 1,44	22,80 ± 2,67	26,11 ± 2,46	33,28± 1,05 ^{b,e,h}

Os dados são expressos como média±EPM. ^ap < 0,001 vs C; ^bp < 0,01 vs C; ^dp < 0,001 vs dVD; ^ep < 0,01 vs dVD; ^gp < 0,001 vs Isq; ^hp < 0,01 vs Isq. PTH, paratormônio; FGF-23, fator de crescimento de fibroblasto-23; P_{Na}, sódio plasmático; P_K, potássio plasmático; P_{Ca}, cálcio total plasmático; P_P, fósforo plasmático; FENA: fração de excreção de sódio; FE_{Ca}, fração de excreção de cálcio; FEP, fração de excreção de fósforo urinário.

A expressão da proteína Klotho (%) apresentou diminuição significativa nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (47,5±6,02, 53,33±7,60 e 46,67±2,47, respectivamente) quando comparada ao grupo C (98,75±0,75). A figura 10 e a tabela 4 demonstram a expressão da proteína Klotho. Resultados semelhantes foram encontrados na expressão gênica de α -Klotho para os grupos Controle (3,27±1,15), dVD (2,07±0,41), Isq(2,39±0,38) e dVD+Isq (1,74±0,46). Apesar de não observarmos diferença estatística, houve uma evidente tendência de queda na expressão gênica deste fator (figura 11 e tabela 5).

Figura 10 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína Klotho no tecido renal de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$ vs. C.

Figura 11 – Expressão gênica de klotho realizada pela técnica de qPCR de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

A avaliação da expressão da proteína VDR (%) mostrou uma diminuição significativa deste parâmetro no grupo dVD+Isq ($44,33 \pm 7,55$) quando comparado ao grupo Isq ($100 \pm 21,99$) (figura 12).

Figura 12 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína VDR de ratos submetidos a isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^h $p < 0,01$ vs Isq.

Além disso, foram realizados experimentos de expressão gênica do receptor de vitamina D (VDR) e do canal epitelial de cálcio-1 (TRPV5). A expressão gênica de VDR estava diminuída nos grupos dVD ($0,63 \pm 0,14$) e dVD+Isq ($0,50 \pm 0,16$) em relação aos grupos Controle ($1,15 \pm 0,35$) e Isq ($1,17 \pm 0,20$), embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos (figura 13 e tabela 5).

Por fim, realizamos a expressão gênica do canal epitelial de cálcio-1 (TRPV5), onde observamos uma expressão bastante diminuída e significativa desse transportador em todos os grupos estudados - Isq ($0,042 \pm 0,020$), dVD ($0,017 \pm 0,002$) e

dVD+Isq ($0,027 \pm 0,014$) quando comparados ao grupo C ($5,14 \pm 1,72$). Esses dados estão representados na figura 13 e tabela 5.

Tabela 4 – Avaliação da expressão proteica no tecido renal ao final dos 90 dias de acompanhamento dos animais dos grupos controle, deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq).

	C	dVD	Isq	dVD+Isq
Klotho	$98,75 \pm 0,75$	$47,5 \pm 6,02^a$	$53,33 \pm 7,60^a$	$46,67 \pm 2,47^a$
TGF- β 1	N/A	N/A	$100,1 \pm 14,87$	$196,3 \pm 41,91^i$
VDR	N/A	N/A	$100,0 \pm 21,99$	$44,33 \pm 7,55^h$

N/A, não se aplica; VDR, receptor de vitamina D; TGF- β (Transforming Growth factor- β) (%). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 vs. C; ^hp<0,01 vs. Isq; ⁱp<0,05 vs. Isq.

Figura 13 – Expressão gênica de VDR e TRPV5 realizada pela técnica de qPCR de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média $\pm$ EPM. ^ap<0,001 vs. C.

Tabela 5 – Avaliação da expressão gênica no tecido renal ao final dos 90 dias de acompanhamento dos animais dos grupos controle, deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq).

Parâmetros	Controle	dVD	Isq	dVD+Isq
VDR	1,15±0,35	0,63±0,14	1,17±0,20	0,50±0,16
Klotho	3,27±1,15	2,07±0,41	2,39±0,38	1,75±0,46
TRPV5	5,14±1,73	0,018±0,002 ^a	0,042±0,02 ^a	0,028±0,014 ^a

Os dados são expressos como média±EPM. Os cálculos foram feitos a partir da expressão gênica do gene alvo após comparação com o gene de referência (GAPDH), ou seja, GENE ALVO/GAPDH ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). VDR, receptor de vitamina D; TRPV5, canal epitelial de cálcio-1. ^ap < 0,001 vs C.

Os estudos histomorfométricos foram realizados para investigar o acometimento do interstício renal, envolvendo principalmente fibrose e infiltrado inflamatório. A avaliação da área intersticial relativa (AIR - %) evidenciou um comprometimento progressivo e crescente, de forma significativa, entre os grupos dVD, Isq e dVD+Isq (17,23±0,79, 24,41±2,87 e 34,87±0,55, respectivamente) quando comparados ao grupo C (7,35±0,47), mostrando expansão do espaço intersticial e fibrose renal. É interessante ressaltar que tal achado mostrou aumento da AIR no grupo dVD, não submetido a injúria isquêmica prévia que justificasse a presença de áreas de fibrose/infiltrado inflamatório, sugerindo um papel da vitamina D na vias de proliferação e fibrose. Os dados referentes a área intersticial relativa estão representados nas figuras 14 e 15.

Efetuamos também a análise da área glomerular (μm^2), não observando diferença estatística entre os grupos estudados. Os valores encontrados para os grupos C, dVD, Isq e dVD+Isq foram respectivamente 8160±290,6; 8189±243,2; 8516±307,2 e 8346±146,5 e estão representados na figura 16.

Figura 14 – Área intersticial relativa de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^a $p < 0,001$ vs. C; ^d $p < 0,001$ vs. dVD; ^e $p < 0,01$ vs. dVD; ^g $p < 0,001$ vs. Isq.

Figura 15 – Fotomicrografias do córtex renal de um rato controle - C (A), de um rato deficiente em vitamina D - dVD (B), de um rato submetido à isquemia/reperfusão - Isq (C) e de um rato deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal - dVD+Isq (D) coradas com tricrômio de Masson. Notar que a área intersticial é progressivamente maior em B, C e D do que em A (40X).

Figura 16 – Área glomerular de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM.

Em relação ao número de células ED-1 positivas, o grupo Isq apresentou aumento significativo ($10,92 \pm 1,89$) quando comparado aos grupos C e dVD ($1,14 \pm 0,19$ e $2,18 \pm 0,14$). A deficiência de vitamina D promoveu aumento do número de células ED-1 positivas no córtex renal dos animais do grupo dVD+Isq, onde foi verificada diferença significativa na contagem destas células ($16,93 \pm 2,49$) quando comparado aos grupos C, dVD e Isq (figuras 17 e 18).

Figura 17 – Número de células ED-1 positivas por campo ($0,087 \text{ mm}^2$) no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap < 0,001 vs C; ^bp < 0,01 vs C; ^dp < 0,001 vs dVD; ^ep < 0,01 vs dVD; ⁱp < 0,05 vs. Isq.

Figura 18– Imunolocalização de células ED-1 positivas no córtex renal de um rato controle - C (A), de um rato deficiente em vitamina D - dVD (B), de um rato submetido ao insulto de isquemia/reperfusão - Isq (C) e de um rato deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal - dVD+Isq (D). Notar que a expressão de células ED-1 positivas é maior em C e D quando comparada com A e B (40X).

A expressão proteica do fator de crescimento TGF- β 1 (%) estava aumentada de forma significativa no grupo dVD+Isq ($196,3 \pm 41,91$) quando comparada ao grupo Isq ($100,1 \pm 14,87$), compatível com o achado de expansão intersticial proeminente nesse grupo (dVD+Isq), avaliado pelos estudos da AIR (figura 19).

Figura 19 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína TGF- β 1 de ratos submetidos a isquemia/reperfusão renal (Isq) e ratos deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ⁱ $p < 0,05$ vs. Isq.

Na análise da expressão de colágeno IV (% de área positiva), os grupos dVD, Isq e dVD+Isq apresentaram aumento significativo ($7,75 \pm 0,93$; $10,46 \pm 0,67$ e $11,02 \pm 0,31$, respectivamente) quando comparados ao grupo C ($4,64 \pm 0,80$). Os grupos Isq e dVD+Isq também apresentaram aumento significativo na expressão de colágeno IV quando comparados com o grupo dVD (figura 20 e 21).

Em relação à expressão de fibronectina (% de área positiva), os grupos estudados dVD, Isq e dVD+Isq apresentaram aumento significativo ($1,83 \pm 0,16$; $3,20 \pm 0,37$ e $4,11 \pm 0,27$, respectivamente) quando comparados ao grupo C ($0,65 \pm 0,12$). O grupo Isq também apresentou aumento significativo na expressão de fibronectina quando comparado com o grupo dVD, assim como o grupo dVD+Isq apresentou aumento significativo da expressão dessa proteína quando comparado aos grupos dVD e Isq (figura 22 e 23).

Figura 20 – Proporção do volume de áreas positivas para colágeno IV no tecido renal de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001 vs C; ^bp < 0,01 vs C; ^fp < 0,05 vs dVD.

Figura 21– Imunolocalização de colágeno IV no córtex renal de um rato controle - C (A), de um rato deficiente em vitamina D - dVD (B), de um rato submetido ao insulto de isquemia/reperfusão - Isq (C) e de um rato deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal - dVD+Isq (D). Notar que a expressão de colágeno IV é progressivamente mais intensa em B, C e D do que em A (40X).

Figura 22 – Proporção do volume de áreas positivas para fibronectina no córtex renal de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001 vs C; ^bp < 0,01 vs C; ^dp < 0,001 vs. dVD; ^ep < 0,01 vs. dVD; ⁱp < 0,05 vs. Isq.

Figura 23– Imunolocalização de fibronectina no córtex renal de um rato controle - C (A), de um rato deficiente em vitamina D - dVD (B), de um rato submetido ao insulto de isquemia/reperfusão - Isq (C) e de um rato deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal - dVD+Isq (D). Notar que a expressão de fibronectina é progressivamente mais intensa em B, C e D do que em A (40X).

Na análise da expressão de vimentina (% de área positiva), o grupo Isq apresentou aumento significativo ($5,08 \pm 0,69$) quando comparado aos grupos C e dVD ($1,50 \pm 0,24$ e $2,04 \pm 0,31$). Verificamos também aumento na expressão de vimentina no córtex renal dos animais do grupo dVD+Isq ($7,48 \pm 0,62$), com diferença significativa quando comparado aos grupos C, dVD e Isq (figuras 24 e 25).

Figura 24 – Proporção do volume de áreas positivas para vimentina no tecido renal de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média ± EPM. ^ap < 0,001 vs C; ^dp < 0,001 vs dVD; ^hp < 0,01 vs Isq.

Figura 25– Imunolocalização de vimentina no córtex renal de um rato controle - C (A), de um rato deficiente em vitamina D - dVD (B), de um rato submetido ao insulto de isquemia/reperfusão - Isq (C) e de um rato deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal - dVD+Isq (D). Notar que a expressão de vimentina é progressivamente mais intensa em C e D do que em A e B (40X).

Em relação a análise da expressão de α -SMA (% de área positiva), o grupo Isq apresentou aumento significativo ($1,48 \pm 0,08$) quando comparado aos grupos C e dVD ($0,28 \pm 0,03$ e $0,52 \pm 0,05$). Verificamos também aumento na expressão de α -SMA nos animais do grupo dVD+Isq ($1,64 \pm 0,14$), com diferença significativa quando comparado aos grupos C e dVD (figuras 26 e 27).

Figura 26 – Proporção do volume de áreas positivas para α -SMA no tecido renal de ratos controle (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^ap < 0,001 vs C; ^dp < 0,001 vs dVD.

Figura 27– Imunolocalização de α -actina no córtex renal de um rato controle - C (A), de um rato deficiente em vitamina D - dVD (B), de um rato submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal - Isq (C) e de um rato deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal - dVD+Isq (D). Notar que a expressão de α -SMA é progressivamente mais intensa em C e D do que em A e B (40X).

5. DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostram que os animais submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal apresentaram hipertrofia renal, aumento dos níveis de pressão arterial média, colesterol e de PTH plasmático. Além disso, foi observada expansão da área intersticial, aumento do infiltrado de macrófagos/monócitos, da expressão de colágeno IV, fibronectina, vimentina e α -actina e redução da expressão da proteína Klotho. A deficiência de vitamina D contribuiu para a elevação dos níveis plasmáticos de PTH e aumento da proteinúria assim como para as alterações túbulo-intersticiais crônicas importantes (fibrose e infiltrado inflamatório do interstício, dilatação e atrofia tubular), aumento da expressão da citocina TGF- β 1 e queda da expressão do receptor VDR e da proteína Klotho, observados nos animais deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal.

Os resultados dos níveis plasmáticos da 25(OH)D mostram que a dieta depletada em vitamina D oferecida aos animais neste experimento foi efetiva na obtenção do modelo experimental de deficiência em vitamina D, evidenciado pela observação de níveis sanguíneos indetectáveis ao método ao final dos 90 dias. O nível sérico da 25(OH)D nada mais é que o reflexo da ingestão dos alimentos, suplementos e da produção cutânea realizada diariamente após exposição solar [40]. Nossos animais foram mantidos sem a presença de luz solar.

A relação peso renal/peso corpóreo, como já mencionado anteriormente, é uma medida indireta da hipertrofia e proliferação celular e mostrou aumento significativo, evidenciando hipertrofia renal nos grupos Isq e dVD+Isq em relação aos grupos C e dVD. A hipertrofia renal é uma alteração clássica observada nos modelos de isquemia/reperfusão renal [41,42].

Neste protocolo não observamos diferença significativa nos parâmetros de ingestão de água e volume urinário assim como não houve diferença significativa na taxa de filtração glomerular (TFG), avaliada pelo clearance de inulina. Contudo, apesar de não haver repercussão na TFG, verificamos um comprometimento progressivo e crescente, de forma significativa, avaliado pela expansão da área intersticial do córtex renal. Essas alterações túbulo-intersticiais crônicas foram caracterizadas pela presença de fibrose e infiltrado inflamatório do interstício, dilatação e atrofia tubular. Além dos grupos Isq e dVD+Isq, esse achado também se confirmou no grupo dVD, não submetido a injúria isquêmica prévia. Esses resultados permitem concluir que a lesão renal induzida pelo insulto de isquemia/reperfusão renal associado à deficiência de vitamina D é intensa e essas alterações podem evoluir para modificações persistentes da estrutura renal com fibrose e acometimento dos túbulos-renais, apesar da recuperação da função renal.

Corroborando esses resultados, foi verificado aumento da expressão do fator de crescimento TGF- β 1, considerado como a principal citocina pró-fibrótica, no córtex renal dos animais do grupo dVD+Isq. Em consequência desta alteração, foi observado aumento da expressão de marcadores de matriz extracelular, como colágeno tipo IV e fibronectina além de aumento da expressão de marcadores de alteração fenotípica, como vimentina e α -actina no córtex renal dos animais isquêmicos e também dos deficientes em vitamina D.

Estudos diversos tem demonstrado que os fatores de injúria inicial para célula renal levam a: (a) dano vascular (agregação plaquetária, formação de coágulo, liberação de citocinas, aumento de permeabilidade vascular); (b) ativação de resposta inflamatória com recrutamento de neutrófilos e monócitos que se diferenciam em variados fenótipos conforme ambiente tecidual local [43], fagocitose de corpos apoptóticos, infiltração de linfócitos B e T, liberação de citocinas pró-inflamatórias; (c) processo fibrótico (liberação de citocinas pró-fibrogênicas – TGF- β 1 e CTGF (fator de crescimento de tecido conectivo) pelos macrófagos e células apoptóticas do parênquima, ativação de células produtoras de colágeno, ativação de produção de

espécies reativas de oxigênio, dentre outros) [29]. Em um modelo de nefropatia obstrutiva, o paricalcitol foi capaz de suprimir a citocina TGF- β 1 e seu receptor, restaurar a expressão do receptor VDR, bloquear a transição epitélio-mesenquimal e inibir a proliferação celular e apoptose [44], mostrando que a vitamina D exerce um papel protetor na preservação da integridade celular frente ao processo de desencadeamento da injúria celular.

Aliado ao aumento da expressão de TGF- β 1, colágeno IV, fibronectina, vimentina e α -actina foi observado aumento significativo do número de células ED-1 positivas nos rins dos animais dos grupos Isq e dVD+Isq. A presença de infiltrado de macrófagos no córtex renal tem sido constatada na maioria das doenças renais progressivas [45,46]. Os macrófagos podem estar envolvidos na progressão da lesão renal devido a propriedade destas células de liberarem peptídeos fibrogênicos, tais como TGF- β 1, endotelina, Ang II e IL-1, contribuindo para maior produção de colágenos e outros componentes da matriz extracelular [45,46]. Esse aumento das células ED-1 positivas mostra que a vitamina D tem participação no controle do processo inflamatório.

Xiong *et al* (2012) em um estudo elegante mostraram que a deficiência de receptor de vitamina D na DRC seria um potencial mecanismo conectando inflamação ao processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM). É sabido que o efeito pró-fibrótico da inflamação depende parcialmente do desencadeamento da TEM, que, em alguns estudos, foi possível pelo estímulo sustentado com citocinas inflamatórias (TNF- α ou IL-1) em células epiteliais. A citocina TNF- α suprime a expressão de VDR em vários tipos celulares, além de sensibilizar as células para o processo de TEM induzido pelo TGF- β 1 [47]. Em nosso estudo, a expressão proteica de VDR no grupo dVD+Isq está reduzida assim como encontramos aumento na expressão proteica da citocina TGF- β 1 neste grupo, corroborando a ideia corrente de que a deficiência de vitamina D está associada ao dano túbulo-intersticial e fibrose intersticial. Possivelmente tal alteração pode-se dar por uma associação com vias inflamatórias, sugerindo que a redução na expressão de VDR pode estar associada ao aumento da expressão de TGF- β 1 nos animais submetidos a injúria isquêmica.

Foi observado aumento significativo dos níveis de pressão arterial média (PAM) dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq quando comparados ao grupo C. As demais variáveis hemodinâmicas – fluxo sanguíneo renal (FSR) e resistência vascular renal (RVR) não apresentaram alteração significativa entre os grupos. A pressão arterial é um parâmetro controlado de forma bastante complexa. Envolve vários mecanismos atuando em paralelo, cada um em seu tempo esperado. Há circuitos de ação rápida, como barorreceptores / centro vasomotor / coração / arteríolas / veias, com respostas imediatas (em segundos) a alterações da hemodinâmica cardiovascular (p. ex, mudança de decúbito); circuitos emergenciais, como resposta isquêmica do sistema nervoso central (p. ex, hemorragia); circuitos de médio prazo (horas ou dias), dos quais se destacam a capacidade adaptativa das paredes vasculares a situações de estiramento prolongamento e a reabsorção de fluidos para o interior de capilares (p.ex, hipotensão prolongada); circuitos de longo prazo (dias ou semanas) dos quais entra em cena a capacidade dos rins no controle da excreção do sal e água [48].

É sabido que estudos realizados em humanos e animais mostram fortes evidências de que a vitamina D pode estar relacionada à diminuição na atividade do sistema renina-angiotensina [49,50]. Um estudo clássico realizado por Li *et al* demonstrou que camundongos *knockout* para VDR apresentavam expressão aumentada de renina e hipertensão e que estas alterações foram suprimidas utilizando um análogo de vitamina D [51]. Em nosso estudo, a elevação da pressão arterial nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq foi associada ao aumento nos níveis de aldosterona assim como na expressão gênica de alguns componentes do SRAA (renina, angiotensinogênio e ECA), corroborando os dados da literatura de que a ativação desse sistema pode estar associada ao aumento da PAM dos animais depletados em vitamina D. Além disso, é importante ressaltar a possível participação da aldosterona nos mecanismos de fibrose renal, através do estímulo para expressão de citocinas pró-fibróticas como o TGF- β 1 [35].

Com relação à proteinúria, os ratos submetidos ao insulto da isquemia/reperfusão (Isq) mostraram tendência de aumento da excreção urinária de proteínas quando comparados aos ratos deficientes em vitamina D. Além disso, a proteinúria foi potencializada no grupo dVD+Isq em relação aos demais grupos estudados. Estudos têm demonstrado que a hipovitaminose D está associada ao aumento da prevalência da proteinúria na população adulta em geral [52,53]. Entretanto, os mecanismos pelos quais a proteinúria leva à redução dos níveis de vitamina D no organismo ou vice-versa não estão totalmente esclarecidos [53].

É sabido que níveis baixos de vitamina D podem desencadear proteinúria por fatores diretos e indiretos. Diretamente, baixos níveis de vitamina D induzem a perda de podócitos e desenvolvimento de glomeruloesclerose através de efeitos celulares diretos, prejudicando a integridade da membrana de filtração glomerular [54]. Indiretamente, a vitamina D suprime a transcrição de renina contribuindo para a redução da proteinúria através de efeitos hemodinâmicos [55]. Em 2008, Dusso e Brown descreveram que o receptor de vitamina D (VDR) está envolvido na regulação do sistema renina-angiotensina, desempenhando a função de *downregulator* desse sistema [56]. Em nosso estudo, observamos uma redução significativa do VDR nos animais do grupo dVD+Isq, o que pode explicar, pelo menos em parte, o aumento da proteinúria observado nesses animais.

Em relação à concentração de PTH plasmático, os animais dos grupos dVD e dVD+Isq apresentaram elevação significativa desse hormônio quando comparados aos grupos C e Isq. Achados recentes da literatura suportam um papel cada vez mais importante do FGF-23 como evento inicial no desenvolvimento da DRC, com a elevação de seus níveis precedendo as alterações de cálcio, fósforo, PTH, ou mesmo calcitriol [57]. Inicialmente o FGF-23 é responsável pela manutenção do balanço adequado de fósforo (ingesta e excreção), inibindo diretamente a produção de PTH nos estágios precoces da DRC. Entretanto, com a progressão da doença renal, persiste a redução nos níveis da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ além de aumentos secundários no PTH, culminando com o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário [28].

Atualmente, sabe-se que a síntese e secreção do FGF-23 é controlada por vários fatores regulatórios, dentre estes, encontram-se: PTH, metabólitos da vitamina D e cálcio. O PTH é sem dúvida um estímulo importante para a expressão de FGF-23. Silver e cols verificaram que “em células osteoblasto-like *in vitro*” o aumento dessa fosfatonina se dava pela ativação das vias de sinalização da proteína kinase A e Wnt. Ainda, os autores mostraram que o calcitriol regulava a transcrição do FGF-23 através de via direta – ativação mediada pelo VDRE (*Vitamin D responsive elements*) e indiretamente por vias de sinalização extracelular mediadas pela leptina e interleucina-6 (IL-6), aumentando os níveis de FGF-23. Já a deficiência de cálcio reduziu a expressão de FGF-23 em ratos submetidos à dieta pobre em cálcio, independente de altos níveis de fósforo e PTH. Além disso, eles relataram que a acidose metabólica da doença renal crônica, o Klotho solúvel e a terapia com ferro injetável também estavam associados com aumento nos níveis do FGF-23 [58].

Em nosso estudo, verificamos níveis reduzidos de FGF-23 nos grupos dVD e dVD+Isq, compatível com resultado descrito por Rodriguez-Ortiz e cols em um trabalho que avaliou os fatores envolvidos na regulação do FGF-23 [59]. Tal decréscimo dos níveis de FGF-23 se justificaria como resposta compensatória para evitar reduções adicionais no calcitriol, exacerbando a hipocalcemia já esperada pela própria evolução da DRC [59]. Considerando-se que a dieta utilizada em nosso estudo, além de ser totalmente depletada de vitamina D, apresentava baixos teores de cálcio e fósforo, acreditamos ser essa uma explicação plausível para o resultado encontrado.

Sabe-se também que com a progressão da doença renal, há uma redução na expressão de Klotho [60], achado também confirmado em nosso estudo, em que encontramos redução significativa na expressão desta proteína nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq quando comparados ao grupo C. Além disso, observamos perfil semelhante na expressão gênica de α -Klotho. Ming-Chang Hu *et al*, utilizando um modelo murino, mostraram que a injúria renal aguda isquêmica foi capaz de induzir um estado agudo e transitório de deficiência de Klotho, com recuperação de seus níveis após sete dias do insulto [61].

Estudos epidemiológicos tem mostrado que níveis aumentados de FGF-23, PTH e diminuição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ são achados que precedem a hiperfosfatemia durante a progressão para DRC. Já é reconhecido o papel da hiperfosfatemia como importante fator de risco de mortalidade em pacientes portadores de DRC [24]. Hu *et al* mostraram que ocorre diminuição progressiva na proteína Klotho secretada na urina de pacientes durante a progressão para DRC [62]. Aparentemente a proteína Klotho secretada ativaria os canais TRPV5 com inibição do NaPi-2a, inibindo a reabsorção de fósforo. Com a diminuição da expressão do TRPV5 na DRC, haveria uma maior reabsorção de fósforo por esse mecanismo [60]. Em nosso estudo, realizamos a expressão gênica do TRPV5 e encontramos valores bastante reduzidos nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq, sugerindo, portanto, uma interferência no mecanismo de excreção do fósforo.

Outro dado interessante do nosso trabalho foi o estudo do perfil lipídico que evidenciou um aumento significativo nos níveis do colesterol total entre os grupos dVD, Isq e dVD+Isq quando comparados com o grupo C. Os níveis de triglicerídeos também se elevaram principalmente nos grupos submetidos a dieta depletada em vitamina D. Fahrleitner *et al* demonstraram que deficiência de vitamina D poderia induzir dislipidemia [63]. De acordo com outro estudo realizado em camundongos com *diabetes mellitus* tipos 1 e 2 tratados com doxercalciferol, foi verificado que o tratamento com o análogo da vitamina D aumentou a expressão gênica renal de VDR e a ativação desse receptor levou a redução no acúmulo de triglicérides e colesterol [64]. A redução de triglicerídeos é mediada pela vitamina D e acontece por meio de diferentes mecanismos: (1) diminuição da síntese de ácidos graxos; (2) aumento da oxidação de ácidos graxos como resultado do aumento de *Peroxisome proliferator-activated receptor- α* (PPAR- α); e (3) diminuição da captação de ácidos graxos. A redução nos níveis de colesterol pode ser atribuída à diminuição da síntese e captação de colesterol e a redução do receptor LDL [64].

Resumindo, no presente estudo observamos alterações túbulo-intersticiais crônicas importantes, caracterizadas principalmente pela presença de fibrose renal e infiltrado inflamatório do interstício. Apesar das alterações morfológicas encontradas, não observamos alterações na taxa de filtração glomerular nos animais dos grupos isquêmicos e deficientes em vitamina D. A deficiência de vitamina D induziu a queda da expressão do receptor de vitamina D (VDR) e intensificou as modificações da estrutura renal.

Provavelmente, a deficiência de vitamina D e a consequente redução da expressão do receptor VDR seriam um potencial mecanismo de início do processo inflamatório observado nos animais deficientes em vitamina D. Desta maneira, através de vias inflamatórias e com participação do fator de crescimento TGF- β 1, a deficiência de vitamina D poderia ser considerada fator agravante para o dano túbulo-intersticial e formação de fibrose intersticial nesse modelo experimental de isquemia/reperfusão renal.

6. CONCLUSÃO

A partir das alterações renovasculares e morfológicas encontradas nos rins dos animais, podemos concluir que a deficiência de vitamina D agrava a evolução da lesão renal aguda pós isquêmica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Francois H, Jacquet A, Beaudreuil S, Seidowsky A, Hebibi H, et al. (2011) Emerging strategies to preserve renal function. *J Nephrol* 24: 133-141.
2. Hagiwara S, Kantharidis P, Cooper ME (2012) What are new avenues for renal protection, in addition to RAAS inhibition? *Curr Hypertens Rep* 14: 100-110.
3. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, et al. (2013) World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 8: 1482-1493.
4. de Araujo M, Andrade L, Coimbra TM, Rodrigues AC, Jr., Seguro AC (2005) Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16: 3339-3349.
5. Bonventre JV (2010) Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. *Contrib Nephrol* 165: 9-17.
6. Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC (2010) Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 21: 966-973.
7. Patel TV, Singh AK (2009) Role of vitamin D in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* 29: 113-121.
8. Lanske B, Razzaque MS (2007) Vitamin D and aging: old concepts and new insights. *J Nutr Biochem* 18: 771-777.
9. Zehnder D, Hewison M (1999) The renal function of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol* 151: 213-220.
10. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357: 266-281.
11. Schiavi SC (2006) Fibroblast growth factor 23: the making of a hormone. *Kidney Int* 69: 425-427.
12. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F8-28.
13. Lucisano S, Buemi M, Passantino A, Aloisi C, Cernaro V, et al. (2013) New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage. *Kidney Blood Press Res* 37: 667-678.

14. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, et al. (2007) Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 18: 1796-1806.
15. Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87: 1080S-1086S.
16. Unger MD (2009) Determinação dos níveis séricos de vitamina D em amostra de indivíduos saudáveis da população brasileira. São Paulo: Universidade de São Paulo. 101 p.
17. Tsiaras WG, Weinstock MA (2011) Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 91: 115-124.
18. Andress DL (2006) Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int* 69: 33-43.
19. Li YC (2011) Podocytes as target of vitamin D. *Curr Diabetes Rev* 7: 35-40.
20. Perwad F, Azam N, Zhang MY, Yamashita T, Tenenhouse HS, et al. (2005) Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology* 146: 5358-5364.
21. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, et al. (2004) FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19: 429-435.
22. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ (2010) Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39: 243-253, table of contents.
23. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, et al. (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45-51.
24. Kuro-o M (2010) Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol* 25: 583-590.
25. Wang Y, Sun Z (2009) Current understanding of *klotho*. *Ageing Res Rev* 8: 43-51.
26. Kuro-o M (2013) *Klotho*, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol* 9: 650-660.

27. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, et al. (2005) Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16: 2205-2215.
28. Quarles LD (2012) Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Exp Cell Res* 318: 1040-1048.
29. Kisseleva T, Brenner DA (2008) Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood) 233: 109-122.
30. Eddy AA (2000) Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15: 290-301.
31. Liu Y (2010) New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21: 212-222.
32. Liu Y (2004) Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15: 1-12.
33. de Borst MH, Vervloet MG, ter Wee PM, Navis G (2011) Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 1603-1609.
34. Gunta SS, Thadhani RI, Mak RH (2013) The effect of vitamin D status on risk factors for cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol* 9: 337-347.
35. Brown NJ (2013) Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 9: 459-469.
36. Lancas T, Kasahara DI, Gross JL, Pires-Neto RC, Deheinzelin D, et al. (2011) Cholinergic hyperresponsiveness of peripheral lung parenchyma in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 82: 177-184.
37. Volpini RA, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM (2004) Inhibition of nuclear factor-kappaB activation attenuates tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *Nephron Physiol* 98: p97-106.
38. Burnette WN (1981) "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* 112: 195-203.

39. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. *Methods* 25: 402-408.
40. Powers JG, Gilchrest BA (2012) What you and your patients need to know about vitamin D. *Semin Cutan Med Surg* 31: 2-10.
41. Bonventre JV (2007) Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol* 156: 39-46.
42. Hussein AA, El-Dken ZH, Barakat N, Abol-Enein H (2012) Renal ischaemia/reperfusion injury: possible role of aquaporins. *Acta Physiol (Oxf)* 204: 308-316.
43. Anders HJ, Ryu M (2011) Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 80: 915-925.
44. Tan X, Li Y, Liu Y (2006) Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17: 3382-3393.
45. Eddy AA (2005) Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 12: 353-365.
46. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA (2008) Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 118: 3522-3530.
47. Xiong M, Gong J, Liu Y, Xiang R, Tan X (2012) Loss of vitamin D receptor in chronic kidney disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F1107-1115.
48. Zatz R (2011) *Bases Fisiológicas da Nefrologia*. São Paulo: Editora Atheneu. 394 p.
49. Li YC (2003) Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 88: 327-331.
50. Tamez H, Kalim S, Thadhani RI (2013) Does vitamin D modulate blood pressure? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22: 204-209.
51. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, et al. (2002) 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110: 229-238.

52. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzell JD, Weiss NS (2007) 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis* 50: 69-77.
53. Lee DR, Kong JM, Cho KI, Chan L (2011) Impact of vitamin D on proteinuria, insulin resistance, and cardiovascular parameters in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 43: 3723-3729.
54. Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, Reulbach U, Holzinger M, et al. (2004) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F526-533.
55. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, et al. (2008) Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 74: 1394-1402.
56. Dusso AS, Brown AJ (1998) Mechanism of vitamin D action and its regulation. *Am J Kidney Dis* 32: S13-24.
57. Isakova T, Wolf MS (2010) FGF23 or PTH: which comes first in CKD ? *Kidney Int* 78: 947-949.
58. Silver J, Naveh-Many T (2013) FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 9: 641-649.
59. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Munoz-Castaneda JR, Martinez-Moreno JM, Ramirez AP, et al. (2012) Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol* 23: 1190-1197.
60. John GB, Cheng CY, Kuro-o M (2011) Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis* 58: 127-134.
61. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Kuro-o M, et al. (2010) Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int* 78: 1240-1251.
62. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, et al. (2011) Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 124-136.
63. Fahrleitner A, Dobnig H, Obernosterer A, Pilger E, Leb G, et al. (2002) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism are common complications in patients with peripheral arterial disease. *J Gen Intern Med* 17: 663-669.

64. Wang XX, Jiang T, Shen Y, Santamaria H, Solis N, et al. (2011) Vitamin D receptor agonist doxercalciferol modulates dietary fat-induced renal disease and renal lipid metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F801-810.