



**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo  
Programa de Pós-graduação em Fisiologia**



**Laboratório de Fisiologia Renal**

**Influência da deficiência de vitamina D na evolução da nefropatia diabética**

Ribeirão Preto, São Paulo  
2023

CLÁUDIA SILVA SOUZA

**Influência da deficiência de vitamina D na evolução da nefropatia diabética**

**Versão corrigida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra

Ribeirão Preto, São Paulo  
2023

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

Souza, Cláudia Silva

Influência da deficiência de vitamina D na evolução da nefropatia diabética. Ribeirão Preto, 2023.

99 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado em Ciências, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Coimbra, Terezila Machado.

1. Inflamação. 2. Transição Epitélio-Mesenquimal. 3. Disfunção Endotelial. 4. Nefropatia Diabética. 5. Vitamina D.

SOUZA, Cláudia Silva

Influência da deficiência de vitamina D na evolução da nefropatia diabética

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (área de concentração: Fisiologia) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Versão Final.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a).: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Luzia Caires, por não ter medido esforços para ver o meu sonho ser realizado.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado força, sabedoria e conforto em todos os momentos durante o período do doutorado.

À minha mãe, por todo incentivo e suporte.

À Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, pela orientação impecável, paciência, e apoio pleno para a realização de todos os meus experimentos. Agradeço também por nos proporcionar uma excelente formação em fisiopatologia renal, por todas as oportunidades, aprendizados e desafios que nos impunha. Uma profissional que nos inspira e é admirável pelo prazer que tem de nos passar todos os seus conhecimentos. Por fim, é impossível medir meu respeito e gratidão à Profa. Terezila.

À Dra. Heloísa Della Coletta Franscscato pela paciência, acompanhamento da realização dos meus experimentos, ensinamentos, incentivo e apoio.

À Cleonice Geovanini, pela ajuda nos experimentos, por no momento mais difícil do doutorado me fazer perceber a importância do que tinha alcançado, pelo carinho, amizade e por todos os momentos divertidos no laboratório e fora dele.

À Amanda, Ana Lívia, Beatriz e Lucas pela amizade, companheirismo, respeito mútuo, pelas trocas de conhecimentos, pelas risadas infinitas e toda ajuda quando necessária.

Aos queridos colegas do Departamento de Fisiologia, pela amizade, troca de conhecimento, incentivo e momentos de descontração.

Aos professores, pela preocupação com a qualidade do nosso aprendizado e excelência com que os assuntos de Fisiologia são ensinados.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa, pela ajuda nas análises histopatológicas.

Ao Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, pelas análises dos níveis séricos de vitamina D.

À Profa. Dra. Patrícia Aline Boer, por permitir que eu realizasse os experimentos de PCR em tempo real e todos os outros procedimentos relacionados, e pelo suporte para a realização destes.

À Marta Nakao, pela ajuda na dosagem da vitamina D.

À Ize Penhas de Lima, pelo apoio na realização de todos os experimentos relacionados a PCR em tempo real.

A Guilherme de Paula Lemos e a Flávio Henrique Leite, pelo processamento dos tecidos e realização dos cortes histológicos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, pela convivência harmoniosa e todo auxílio prestado durante a realização desse trabalho.

### **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela estrutura e equipamentos indispensáveis para a realização dos experimentos.

Ao Departamento de Fisiologia, pela oportunidade de ingressar no doutorado e apoio irrestrito para realização deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, pela concessão da Bolsa de Estudo.

“Não conhecerá a alegria se não souber o que é a tristeza. Os que conseguem alcançar as maiores alturas são também os que mergulham nas profundezas. É um equilíbrio!”

## RESUMO

Souza, C.S. **Influência da deficiência de vitamina D na evolução da nefropatia diabética.** 2023 Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

A nefropatia diabética (ND) é caracterizada por alterações renais que podem ser exacerbadas pela deficiência de vitamina D (VitD). Embora a VitD seja uma importante ferramenta para o controle glicêmico e da pressão arterial, os efeitos da sua deficiência sobre a angiogênese, inflamação e fenótipo das células no rim de ratos com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) ainda não são totalmente conhecidos. Este estudo avaliou a influência da deficiência de vitamina D (VitD) na angiogênese, inflamação e no processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) durante a evolução da ND. Ratos *Wistar Hannover* foram alimentados com dieta contendo ou não VitD iniciadas seis semanas antes da administração de estreptozotocina para indução do DM1. Após a indução do diabetes, os ratos permaneceram por mais 12 e 24 semanas alimentados com as dietas contendo ou não VitD. Ao final da décima segunda e da vigésima quarta semana os animais foram eutanasiados sendo os rins e amostras de sangue e urina coletadas para estudos de função e estrutura renal. Foram realizadas avaliações da pressão arterial, glicemia, estrutura e função renal, níveis séricos de VitD e PTH, expressão proteica do receptor de VitD, níveis plasmáticos e urinários de cálcio e fósforo, níveis urinários e teciduais de TGF- $\beta$ 1, marcadores da inflamação e angiogênese e de proteínas da matriz extracelular (MEC). Os resultados obtidos mostraram que ratos diabéticos deficientes em VitD apresentaram aumento das lesões histológicas e comprometimento da função renal quando comparado com os ratos diabéticos suficientes VitD. Essas alterações estavam associadas à disfunção endotelial, inflamação e ao aumento da expressão de marcadores de TEM induzidos pela deficiência de VitD nesses animais com 12 e com 24 semanas após a indução do diabetes. Portanto, nossos dados sugerem que a deficiência de VitD acelera a progressão da ND em ratos diabéticos.

**Palavras-chave:** Inflamação, Transição Epitélio-Mesenquimal, Disfunção Endotelial, Nefropatia Diabética, Vitamina D.

## ABSTRACT

Souza, C.S. **Influence of the vitamin D deficiency on the evolution of diabetic nephropathy.** 2023 Thesis of Doctorate in Sciences (area of concentration: Physiology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 2023.

Diabetic nephropathy (DN) is characterized by renal changes that can be exacerbated by vitamin D (VitD) deficiency. Although VitD is an important factor for glycemic and blood pressure control, the effects of its deficiency on angiogenesis, inflammation and cell phenotype in the kidney of rats with type 1 diabetes mellitus (T1DM) are still not fully known. This study evaluated the influence of vitamin D (VitD) deficiency on angiogenesis, inflammation and on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process during the evolution of DN. Wistar Hannover rats fed a VitD-containing diet or VitD-free diet before administration of streptozotocin for T1DM induction. After the induction of diabetes, the rats remained for another 12 and 24 weeks fed a VitD-containing or VitD-free diet. At the end of the twelfth and twenty-fourth week, the animals were euthanized and the kidneys, blood and urine were collected for studies of renal function and structure. Blood pressure, glycemia, serum VitD and PTH levels, VitD receptor protein expression, plasmatic and urinary levels of calcium and phosphorus, urinary and tissue levels of TGF- $\beta$ 1, inflammation markers, angiogenesis and extracellular matrix (ECM) proteins were evaluated. Our results showed that diabetic VitD-deficient rats presented an increase in the structural lesions and impaired renal function when compared to diabetic rats that received VitD-containing diet. These changes were associated with endothelial dysfunction, inflammation, as well as too increased expression of EMT markers induced by VitD deficiency in these animals with 12 and 24 weeks after diabetes induction. Therefore, our data suggest that VitD deficiency leads to faster progression of DN in diabetic rats.

**Keywords:** Inflammation, Epithelial-Mesenchymal Transition, Endothelial Dysfunction, Diabetic Nephropathy, Vitamin D.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – porcentagem

μg – micrograma

1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> – 1α,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>/calcitriol

25(OH)D – 25-hidroxitamina D

3'UTRs – *Untranslated region*

Angpt-1 – Angipietina 1

Angpt-2 – Angipietina 2

Ca<sup>+</sup> – Cálcio

DAB – 3,3-diaminobenzidina

DM – Diabetes *mellitus*

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 – Diabetes *mellitus* tipo 2

DRC – Doença renal crônica

DRT – Doença renal em estágio terminal

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

IDF – Federação internacional de diabetes

IL-1β – Interleucina 1 beta

M – molar

MEC – Matriz extracelular

ND – Nefropatia Diabética

miR- microRNA

miR-200 – microRNAs da família 200

mL – mililitro

mm<sup>2</sup> – milímetro quadrado

mRNA – RNA mensageiro

mVDR – VDR de membrana

ND – Nefropatia diabética

nVDR – VDR nuclear

P<sup>+</sup> – Fósforo

PAM – Pressão arterial média

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

PAMS – Ácido Periódico Metenamina de Prata

PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen* RNA – Ácido Ribonucleico

pg – picograma

pH - potencial Hidrogeniônico

PTH – Paratormônio

RNA – Ácido ribonucleico

RT – Transcrição reversa

RTq-PCR – *Real-time quantitative polymerase chain reaction*

RXR – Receptor de retinoide-X

STZ – Estreptozotocina

TEM – Transição epitélio-mesenquimal

TFG – Taxa de filtração glomerular

TGF-β1 – Fator de crescimento transformante beta 1

TGF-βR – Receptor de membrana para o TGF-β

Tie-2 – Receptor de tirosina quinase 2

TM – Tricrômico de Masson

TNF- $\alpha$  – Fator de crescimento tumoral alfa

VDBP – Proteína de ligação a VitD

VDR – Receptor para a vitamina D

VEGF-A – Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR – receptor de membrana para o VEGF

VitD – Vitamina D

VitDD – Deficiente em Vitamina D

ZEB1 – *Zinc finger E-box binding homeobox 1*

ZEB2 – *Zinc finger E-box binding homeobox 2*

ZO-1 – *Zona occludens 1*

$\alpha$  – Alfa

$\alpha$ -SMA – Alfa-actina do músculo liso

$\beta$  – Beta

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Características estruturais da progressão da nefropatia diabética.

**Figura 2.** Participação do rim na síntese de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e suas ações.

**Figura 3.** Estrutura proteica de ZEB1 e ZEB2.

**Figura 4.** Modelo de regulação da TEM pela família miR-200.

**Figura 5.** Esquema mostrando expressão/secreção de VEGF-A e Angiopietinas 1/2 e seus respectivos alvos glomerulares.

**Figura 6.** Imagem representativa do protocolo experimental.

**Figura 7.** Níveis Séricos de 25-Hidroxivitamina D de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 8.** Glicemia de jejum a cada 4 semanas ao longo de todo o protocolo experimental de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 9. A,** Níveis séricos de paratormônio (PTH); **B e C,** níveis plasmáticos dos íons  $\text{Ca}^+$  e  $\text{P}^+$ , respectivamente, de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 10.** Pressão Arterial Média (PAM) a cada 4 semanas ao longo de todo o protocolo experimental de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 11.** Expressão proteica do receptor da VitD (VDR) de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 12. A,** Taxa de Filtração Glomerular (TFG); **B,** Albuminúria; **C,** Fração de excreção de cálcio ( $\text{FECa}^+$ ); **D,** Fração de excreção de fósforo ( $\text{FEP}^+$ ) de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) no tempo 0, 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 13.** Fotomicrografias representativas do tufo glomerular e da área mesangial coradas com Ácido Periódico Metanamina de Prata (PAMS) de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 14.** Fotomicrografias representativas da área intersticial relativa coradas com Tricrômio de Masson (TM) de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 15.** Imunolocalização para desmina e quantificação da área marcada para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 16.** Imunolocalização para vimentina e quantificação da área marcada para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 17.** Imunolocalização cortical para  $\alpha$ -SMA e quantificação da área marcada para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 18.** Imunolocalização medular para  $\alpha$ -SMA e quantificação da área marcada para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 19.** **A**, expressão relativa do mRNA para zona occludens 1 (ZO-1); **B**, expressão relativa do mRNA para fibronectina; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 20.** **A**, expressão relativa do mRNA para ZEB1; **B**, expressão relativa do mRNA para ZEB2; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 21.** Imagem representativa e quantificação da expressão proteica de ZEB2. O resultado é expresso como razão densitométrica entre ZEB2 e GAPDH.

**Figura 22.** **A e B**, expressão relativa do mRNA para miR-200a; **C e D**, expressão relativa do mRNA para miR-200b; **C**, expressão relativa do mRNA para miR-200c; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 23.** **A e B**, níveis teciduais de TGF- $\beta$ 1 corrigidos pela concentração total de proteína do lisado de tecido renal; **C e D**, níveis urinários de TGF- $\beta$ 1 corrigidos pelos níveis urinários de creatinina; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 24.** Imagem representativa e quantificação da expressão proteica de Smad2/3. O resultado é expresso como razão densitométrica entre Smad2/3 e GAPDH.

**Figura 25.** Imunolocalização cortical e medular para células ED-1 positivas e quantificação expressa como número (nº) de células marcadas para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 26.** (A) níveis teciduais de TNF- $\alpha$  e (B) níveis teciduais de IL-1 $\beta$ , corrigidos pela concentração total de proteína do lisado de tecido renal de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 27.** Imunolocalização cortical e medular para células PCNA positivas e quantificação expressa como número (nº) de células marcadas para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 28.** Imunolocalização cortical e medular para células JG12 positivas e quantificação expressa como porcentagem da área (glomérulo) e número (nº) de células (córtex e medula) marcadas para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.

**Figura 29.** A, Imagem representativa das expressões proteicas de CD34, Tie-2, Angiopoietina-2, VEGFA e VEGFR2. B, C, D, E, F representam as razões densitométricas entre CD34, Tie-2, Angiopoietina-2, VEGFA e VEGFR2 e GAPDH.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composições das dietas.

**Tabela 2.** Dados da histologia renal de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD).

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	21
1.1 Diabetes mellitus tipo 1 e nefropatia diabética .....	22
1.2 Influência da vitamina D na estrutura e na função renal .....	24
1.3 Transição epitélio-mesenquimal durante a nefropatia diabética.....	26
1.4 Angiogênese durante a nefropatia diabética .....	29
1.5 Inflamação durante a nefropatia diabética .....	32
<b>2. Hipótese</b> .....	35
<b>3. Objetivos</b> .....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
<b>4. Material e Métodos</b> .....	39
4.1 Animais e Dieta.....	39
4.2 Determinação da 25-hidroxivitamina D, glicemia, paratormônio, íons Ca <sup>+</sup> e P <sup>+</sup> e pressão arterial média .....	41
4.3 Avaliação da Função Renal .....	42
4.4 Estudos histológicos e morfométricos .....	42
4.5 Estudos Imuno-histoquímicos.....	42
4.6 Avaliações por Western blotting.....	43
4.7 Quantificações por ELISA .....	44
4.8 Estudos de expressão gênica .....	44
4.9 Análise estatística .....	45
<b>5. Resultados</b> .....	47
5.1 Caracterização do modelo experimental .....	47
5.2 Influência da deficiência de VitD na função renal durante a progressão da ND...50	

5.3 Influência da deficiência de VitD na estrutura renal durante a progressão da ND..	51
5.4 Influência da deficiência de VitD na transição epitélio-mesenquimal durante a progressão da ND.....	55
5.5 Influência da deficiência de VitD nas células endoteliais e inflamação durante a progressão da ND.....	68
<b>6. Discussão .....</b>	<b>77</b>
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>84</b>
<b>8. Referências .....</b>	<b>86</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>97</b>

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

A nefropatia diabética (ND) é uma das complicações crônicas mais frequentes e graves do diabetes *mellitus* (DM) e considerada uma das principais causas de doença renal em estágio terminal (DRT) no mundo (Papadopoulou-Marketou, Chrousos, Kanaka-Gantenbein, 2017; Fouli, Gnudi, 2019; Furuya F, Ishii T, Kitamura, 2019). A DRT continua como causa primordial de morbidade e mortalidade prematura em pacientes com DM tipo 1 (DM1) (Krolewski, 2015; Xu et al., 2020). Funcionalmente, a ND se caracteriza pela presença de hiperfiltração glomerular e albuminúria (Hu et al., 2019). Morfologicamente, é caracterizada por hipertrofia glomerular, espessamento das membranas basais glomerulares e tubulares, expansão mesangial e fibrose túbulo-intersticial (Wei et al., 2014; Hu et al., 2019).

A patogênese da ND é complexa e multifatorial e envolve tanto as células endoteliais quanto epiteliais renais. A desestabilização endotelial, a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e a inflamação são considerados eventos críticos para o desenvolvimento e progressão da ND (Srivastava, Koya, Kanasaki, 2013; Gnudi et al., 2016; Barutta, Bellini, Gruden, 2022).

A manutenção da integridade do endotélio renal depende de um equilíbrio entre fatores anti e pró-angiogênicos relacionados entre si (Cas, Gnudi, 2012; Gnudi et al., 2016). Dentre os fatores pró-angiogênicos, a superexpressão do VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A) foi amplamente relatada como um dos principais contribuintes da disfunção endotelial, desenvolvimento de albuminúria, hiperfiltração e alterações estruturais renais nos estágios iniciais da ND (Cas, Gnudi, 2012; Fu et al., 2015; Jeong, Ojha, Lee, 2021; Jiang et al., 2022). O processo de TEM é caracterizado pela perda de marcadores celulares com perfis epiteliais e aquisição de um fenótipo mesenquimal (Xu et al., 2020). Estudos demonstraram que a via de sinalização ZEB1/2 (*Zinc finger E-box binding homeobox 1/2*), dependente ou independente da ativação pelo TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento transformante beta 1) contribui para o aumento da TEM e fibrogênese em glomérulos (Sene et al., 2014) e no compartimento túbulo-intersticial *in vivo* e *in vitro* (Xiong et al., 2012; Wei et al., 2014; Pu, Zhang, Zhou, 2016) em diferentes modelos de doença renal. A inflamação está estreitamente ligada à resposta endotelial (Jourde-Chiche et al., 2019) e ao processo de TEM no rim diabético (Chen et al., 2020). Durante esses processos são liberadas várias citocinas pró-inflamatórias, que além de

contribuírem para a infiltração de células da resposta imune, auxiliam na ativação excessiva dessas vias de sinalização por retroalimentação positiva podendo levar a destruição do órgão (Chen et al., 2020; Caja, Tan, 2020).

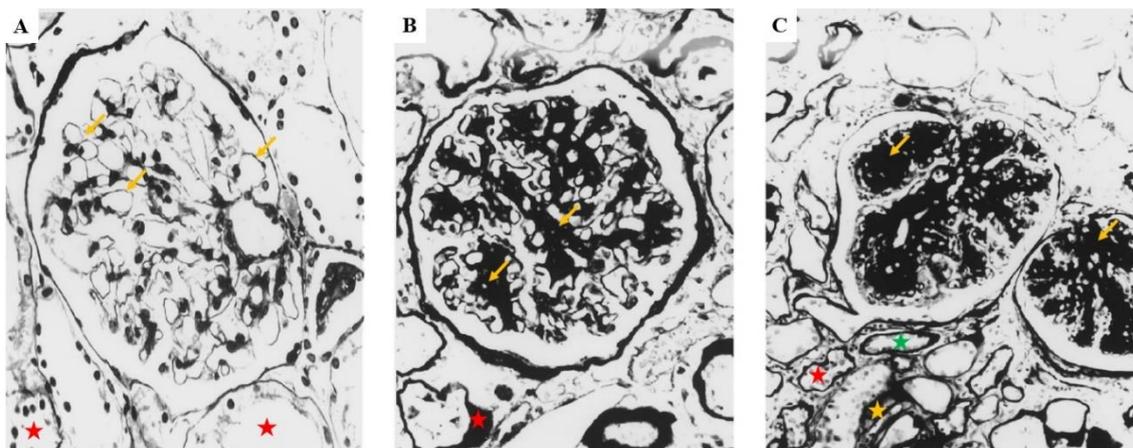
As expressões do VEGF-A e dos co-repressores da transcrição ZEB1/2 são reguladas epigeneticamente pelo microRNA-200b (miR-200b) (Brabletz, Brabletz, 2010; Choi et al., 2011). Estudos demonstraram que a regulação negativa da expressão do miR-200b foi associada ao aumento da permeabilidade vascular em células endoteliais de retina submetidas a alta glicose (McArthur et al., 2011) e em células cardíacas de camundongos diabéticos (Feng et al., 2016), e relacionada ao aumento da TEM em diferentes modelos de doença renal (Sene et al., 2010; Xiong et al., 2012). Além disso, estudos clínicos e experimentais demonstraram que a deficiência de vitamina D (VitD) é fator de risco importante para a progressão da doença renal crônica (DRC) associada ou não ao diabetes *mellitus* (DM) (Joergensen et al., 2011; Forouhi et al., 2012; Rossing et al., 2015; Song et al., 2013; Thethi et al., 2015).

### **1.1 Diabetes *mellitus* tipo 1 e nefropatia diabética**

Estudos da Federação Internacional de Diabetes (IDF) demonstraram que o número de crianças, adolescentes e adultos que possuem DM1 no mundo é superior a um milhão, tendo o Brasil classificado como o terceiro país com o maior número de casos, possuindo 92.300 pessoas acometidas com essa enfermidade (IDF, Diabetes Atlas 10<sup>a</sup> edição, 2021). O DM1 é uma doença crônica caracterizada pela incapacidade do organismo em produzir insulina (Arneth, Arneth, Shams, 2019) e se desenvolve como resultado da destruição autoimune seletiva das células  $\beta$ -pancreáticas, que são as células produtoras de insulina (Pathak et al., 2019). A patogênese do DM1 é considerada multifatorial e envolve tanto fatores genéticos quanto de riscos ambientais (Haris et al., 2021).

A hiperglicemia causada pelo diabetes provoca alterações macro e microvasculares (Silva et al., 2019). A ND é considerada uma das complicações microvasculares crônicas mais frequentes e graves do DM1, visto que está frequentemente relacionada à progressão para a perda da função renal e consequente risco de morte prematura nesses pacientes (Tuttle et al., 2014; Papadopoulou-Marketou, Chrousos, Kanaka-Gantenbein, 2017; Furuya, Ishii, Kitamura, 2019; Ishii et al., 2019). A

ND pode ser descrita em cinco estágios: estágio 1 ou de hiperfiltração, em que há um aumento da taxa de filtração glomerular (TFG); estágio 2, em que a TFG retorna a níveis normais e há presença de microalbuminúria (albuminúria de 20 a 200 µg/min ou 30 a 300 mg/24h); estágio 3 ou de macroalbuminúria, fase caracterizada por uma excreção urinária de albumina acima de 300 mg/24h e que geralmente está associada com hipertensão arterial; estágio 4 ou de síndrome nefrótica, com excreção urinária de albumina acima de 3000 mg/24h; e o estágio 5 ou de falência renal, que é a fase em que há acúmulo de substâncias nitrogenadas na circulação devido queda brusca da TFG bem como intensa lesão do parênquima renal e pode haver ou não albuminúria (Hakim, Pflueger, 2010; Tervaert et al., 2010; Krolewski, 2015; Magee et al., 2017; Papadopoulou-Marketou, Chrousos, Kanaka-Gantenbein, 2017; Keri, Samji, Blumenthal, 2018; Lin et al., 2018). Características morfológicas como alargamento das alças dos capilares, hipertrofia glomerular, espessamento da membrana basal glomerular e acúmulo de matriz mesangial também são observadas nos estágios iniciais (Vriese et al., 2001; Maclsaac et al., 2014), enquanto a glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial são observadas nos estágios finais da progressão da ND (Lucisano et al., 2013; Sun et al., 2017) (Figura 1).



**Figura 1.** Características estruturais da progressão da nefropatia diabética. **A**, glomérulo e túbulos normais, alças capilares evidentes (setas laranjas) e células tubulares íntegras (estrela vermelha). **B**, nefropatia diabética estabelecida, deposição de matriz extracelular glomerular e capilares estreitados (setas laranjas) e início da deposição intersticial (estrela vermelha). **C**, nefropatia diabética avançada, atrofia glomerular, expansão mesangial e redução do número de alças capilares (setas laranjas), fibrose túbulo-intersticial (estrela laranja), túbulo atrofiado (estrela vermelha), túbulo necrosado (estrela verde). Adaptado: Sharma et al., 2000.

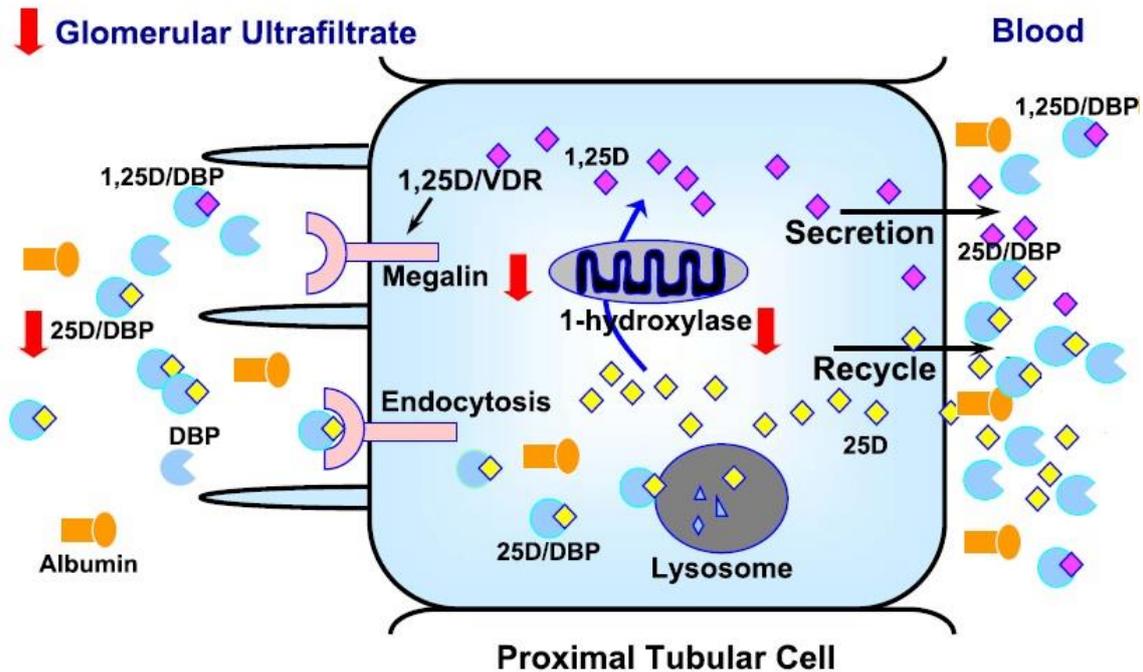
A DRC afeta de 5 a 15% da população mundial (Kaludjerovic et al., 2019), com mais de 2 milhões de pacientes em tratamento para a DRT (Furuya, Ishii, Kitamura,

2019). O aparecimento de doenças ósseas e cardiovasculares são frequentemente vistas nesses pacientes e estão associadas principalmente aos distúrbios do metabolismo mineral (Kaludjerovic et al., 2019), que pode ser causado dentre outros fatores pela deficiência de VitD (Holick, 2007).

Ainda não existe cura para a DRC e apesar das terapias atuais para a ND que envolvem, essencialmente, o controle glicêmico e da pressão arterial, e o bloqueio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a prevalência de pacientes com essa enfermidade continua alta e aumenta a cada ano (Checheriça et al., 2015; Fu et al., 2015). Além disso, inúmeros ensaios clínicos para desenvolvimento de novas terapias não obtiveram sucesso (Fu et al., 2015) o que torna ainda mais importante o entendimento da complexidade que abrange os primeiros sinais da ND para tentar evitar a progressão para DRT.

## **1.2 Influência da vitamina D na estrutura e na função renal**

O rim tem como função primordial a excreção, no entanto, ele é também uma rica fonte de produção de moléculas ativas, incluindo a VitD (Hu et al., 2019). A VitD ativa ou calcitriol é um hormônio lipossolúvel obtido de uma série de etapas de metabolizações a partir de um precursor produzido pela pele ou adquirido na dieta (Nakashima et al., 2016; Xiao et al., 2016). Nesse sentido, a vitamina D<sub>3</sub> ou colecalciferol proveniente da síntese na pele após exposição solar ou a vitamina D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> oriunda de fontes alimentares são transportadas pela circulação ao fígado pela proteína de ligação a VitD (VDBP) onde sofrem uma primeira hidroxilação formando a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol, que é a forma de VitD circulante em maior quantidade no organismo (Mithal et al., 2009; Jeon, Shin, 2018). A 25(OH)D liga-se a VDBP formando o complexo 25(OH)D-DBP e por meio da circulação sanguínea atinge os rins (Nakashima et al., 2016). No rim, mais especificamente no túbulo proximal, o complexo 25(OH)D-DBP é reabsorvido pelo receptor megalina presente na membrana apical das células dessa porção tubular e no interior destas é convertido pela ação da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase em sua forma ativa, a 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> [1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] ou calcitriol (Figura 2) e daí retorna a circulação e atua em seus receptores intracelulares (VDR) nos diferentes órgãos-alvo (Al-Badr, Martin, 2008; Wang et al., 2012, Jeon, Shin, 2018).



**Figura 2.** Papel do rim na síntese de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e suas ações.  $1\alpha$ -hidroxilase (1-hydroxylase). Adaptado: Dusso et al., 2011.

Devido a sua localização celular, os VDRs são divididos em dois tipos: VDR de membrana (mVDR) e VDR nuclear (nVDR) (Andress, 2006). O mVDR exerce as ações não genômicas da VitD e sua resposta está relacionada a alterações de canais iônicos (Andress, 2006). O nVDR exerce os efeitos genômicos da VitD e para isso, a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  liga-se ao VDR citosólico que é fosforilado e por heterodimerização se liga ao receptor de retinoide-X (RXR) formando o complexo  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR que, por sua vez, se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes relacionadas as ações da VitD (Jeon, Shin, 2018).

O principal papel fisiológico da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  é o da manutenção dos níveis extracelulares dos íons cálcio ( $\text{Ca}^+$ ) e fósforo ( $\text{P}^+$ ) no organismo (Wang et al., 2012). No entanto, estudos também tem descrito que a VitD é essencial para manutenção e integridade das células renais (Dusso et al., 2011; Dusso, Tokumoto, 2011). Isso se deve, pelo menos em parte às ações diretas da VitD nesse órgão, pois, foi demonstrado que o VDR está presente em praticamente todas as células renais (Wang et al., 2012). Portanto, o rim além de principal local de ativação da VitD é também um importante sítio de ação desse hormônio (Manucha, Juncos, 2017; Hu et al., 2019), sendo sua deficiência amplamente relatada na DRC (Holick, 2007; Li, 2010). Nesse sentido, estudos

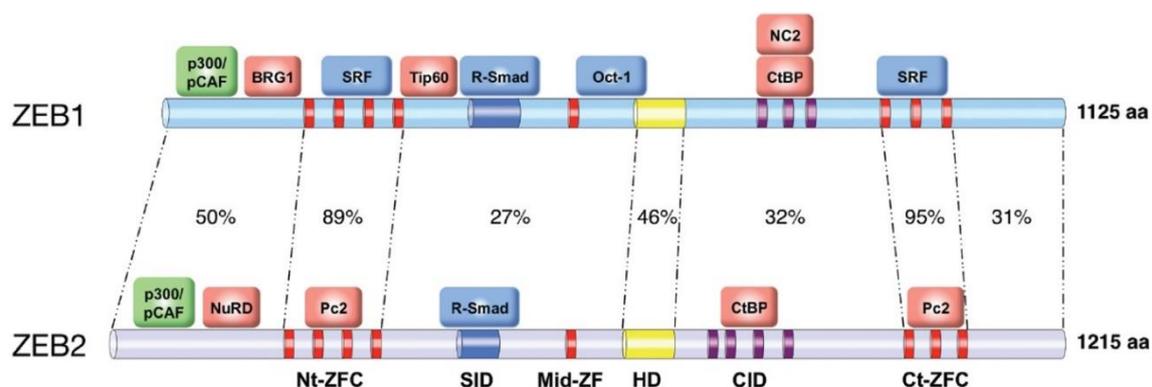
experimentais demonstraram que a deficiência de VitD está relacionada a piora das lesões renais na DRC (Gonçalves et al., 2014; Felício et al., 2016; Bragança et al., 2018; Almeida et al., 2019; Bernardo et al., 2022) e tem sido considerada como um dos potenciais fatores de risco ao desenvolvimento e progressão da ND em pacientes (Felício et al., 2016; Nakashima et al., 2016; Xiao et al., 2016; Felício et al., 2017; Fan et al., 2018). Contudo, os mecanismos relacionados com o efeito da sua deficiência na progressão da lesão renal não foram ainda completamente elucidados.

### **1.3 Transição epitélio-mesenquimal durante a nefropatia diabética**

A fibrose túbulo-intersticial é considerada a consequência final de todas as doenças renais progressivas (Hills, Squires, 2011; Lucisano et al., 2013; Zheng et al., 2017) e é caracterizada por excesso de fibroblastos e células inflamatórias, destruição da estrutura das células tubulares, acúmulo de matriz intersticial e consequente rarefação da microvasculatura peritubular (Zeisberg, Neilson, 2010). A ativação dos fibroblastos túbulo-intersticiais em miofibroblastos, os quais secretam e levam ao acúmulo de proteínas de matriz extracelular (MEC) durante a progressão da ND, é considerado o passo primordial da fibrose renal (Fragiadaki, Mason, 2011). O principal processo relacionado a essa atividade fibrótica no rim diabético é denominado de transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Srivastava SP, Koya D, Kanasaki, 2013). Quando ativados, os miofibroblastos passam então a expressar uma ampla gama de proteínas do citoesqueleto evidenciando a ocorrência da TEM (Essawy et al., 1997).

Portanto, a TEM é caracterizada pela repressão de genes relacionados ao fenótipo epitelial, como da E-caderina, de proteínas de junções apertadas e citoqueratinas, e indução da expressão de genes relacionados ao fenótipo mesenquimal, como da N-caderina, alfa-actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), desmina e vimentina (Essawy et al., 1997; Caja, Tan, 2019). Estudos demonstraram que a deficiência de VitD contribuiu para o aumento da deposição de proteínas de MEC e alteração fenotípica das células túbulo-intersticiais sugerindo aumento da TEM nos rins de ratos em diferentes modelos de DRC (Gonçalves et al., 2014; Bragança et al., 2018; Bernardo et al., 2022). Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais a deficiência de VitD leva ao desenvolvimento e progressão desse processo durante a fibrose renal.

As vias de sinalização associadas à TEM na ND incluem as mediadas por ZEB1/ZEB2 (Xiong et al., 2012; Pu, Zhang, Zhou, 2016). As proteínas ZEB1/ZEB2 são fatores de transcrição nuclear, possuem alta similaridade estrutural e várias regiões de ligação a cofatores que são proteínas com propriedades ativadora ou repressora da transcrição gênica, porém, não possuem um domínio próprio de ligação ao DNA (Sánchez-Tilló et al., 2012) (Figura 3). Nesse sentido, em conjunto com cofatores, ZEB1/ZEB2 atuam como co-repressores da transcrição de genes relacionados a características epiteliais enquanto induz a transcrição de genes relacionados ao fenótipo mesenquimal (Tylzanowski, 2001), sendo dessa forma, importantes contribuintes para ativação do processo de TEM.

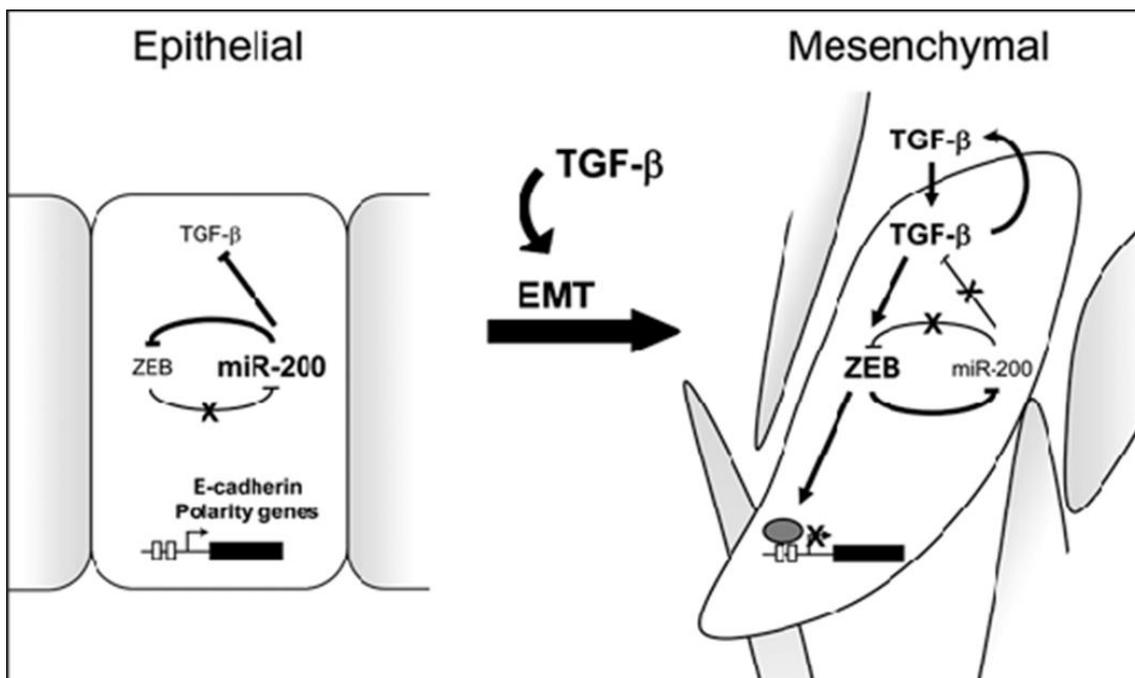


**Figura 3.** Estrutura proteica de ZEB1 e ZEB2. Ambas proteínas ZEB possuem dois agrupamentos do tipo dedo de zinco (ZFC) nas extremidades N (Nt-ZFC) e C terminal (Ct-ZFC) que se ligam às regiões E-box nas regiões reguladoras dos genes-alvo. Mais ao centro dessas proteínas, encontram-se ainda um dedo de zinco extra (o Mid-ZF) e um homeodomínio (HD), que também auxiliam na ligação das proteínas ZEB ao DNA. Proteínas sinalizadas em verde significam coativadoras, em vermelho correpresores e em azul outros fatores de transcrição. Adaptado: Sánchez-Tilló et al., 2012.

O TGF- $\beta$  é considerado o principal indutor das alterações fibróticas no rim diabético (Hills, Squires, 2011) e do processo de TEM mediado por ZEB1/ZEB2 (Hua et al., 2020). Essa citocina pró-fibrótica constitui uma família de fatores de crescimento que inclui três isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, sendo o TGF- $\beta$ 1 presente em maior quantidade no tecido renal (Sabbineni, Verma, Somanath, 2018). A transdução de sinal para o núcleo celular induzida pelo TGF- $\beta$ 1 quando ligado a seus receptores de membrana do tipo I e II (TGF- $\beta$ R1 e TGF- $\beta$ R2) pode ocorrer por via canônica e/ou não canônica (Yang et al., 2019; Hua et al., 2020). No núcleo, esse sinal induz a transcrição de genes em resposta ao TGF- $\beta$ 1, incluindo de ZEB1/ZEB2 (Hua et al., 2020).

O TGF- $\beta$ 1 e as proteínas ZEB1/ZEB2 juntamente com microRNAs (miRs) da família 200 (miR-200) integram uma rede de sinalização autócrina que regulam a TEM (Gregory et al., 2011). MiRs são pequenos RNAs não codificantes que atuam se ligando nas regiões 3'UTRs (*untranslated region*) do RNA mensageiro (mRNA) dos genes-alvo silenciando a expressão destes através da inibição da tradução ou indução da sua degradação (Hill, Browne, Tulchinsky, 2012). A família de miR-200 engloba cinco membros divididos em dois grupos baseados na semelhança entre suas sequências gênicas: miR-200a e miR-141 que pertencem ao grupo I; e miR-200b, miR-200c e miR-429 que pertencem ao grupo II (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008; Kato et al., 2011). Associado a isso, foi demonstrado que ZEB1 possui oito sítios de ligação 3' UTR para miR-200, sendo cinco sítios para integrantes do grupo II e três para os do grupo I; e ZEB2 compreende nove sítios de ligação 3' UTR para miR-200, com seis sítios para componentes do grupo II e três para os do grupo I (Brabletz, Brabletz, 2010).

Foi demonstrado que a regulação negativa dos miRs da família 200 está associada ao aumento da TEM e fibrose renal induzida pelo TGF- $\beta$ 1 via ZEB1/ZEB2 em cultura de células e em diferentes modelos animais de doença renal (Xiong et al., 2012; Sene et al., 2014; Wei et al., 2014; Pu, Zhang, Zhou, 2016; Yang et al., 2019). Estudos sugerem ainda que a regulação da TEM via TGF- $\beta$ /ZEB/miR-200 envolve uma alça dupla de retroalimentação negativa na qual o TGF- $\beta$  leva ao aumento da expressão de ZEB1/ZEB2 e estes regulam os miR-200 ou pela perda da repressão do TGF- $\beta$  pelos miR-200 (Gregory et al., 2008; Brabletz, Brabletz, 2010; Hill, Browne, Tulchinsky, 2012) (Figura 4). Contudo, até o momento não foram encontrados trabalhos associando a deficiência de VitD e a regulação da TEM pela via de sinalização TGF- $\beta$ 1/ZEB/miR-200 durante a progressão da ND, o que torna ainda mais importante a busca por novos alvos terapêuticos para tentar retardar a progressão para a DRT.



**Figura 4.** Modelo de regulação da TEM pela família miR-200. Os miRs-200 mantêm as características fenotípicas celulares pela repressão pós-transcricional de ZEB1/ZEB2 e TGF- $\beta$ . Quando estimulado pelo TGF- $\beta$ , as proteínas ZEB1/ZEB2 são reguladas positivamente e regulam negativamente os miRs-200. A expressão reduzida dos miRs-200 aumenta a sinalização autócrida do TGF- $\beta$  pela perda da sua atividade repressora sobre esse fator de crescimento. Adaptado: Gregory et al., 2008.

#### 1.4 Angiogênese durante a nefropatia diabética

A angiogênese é um processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existent (Tahergorabi, Khazaei, 2012; Costa, Soares, 2013). Quando ocorre de forma normal, é controlada por um balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos, contribuindo para a manutenção e sobrevivência das células endoteliais (Jeong et al., 2021). Entretanto, quando a angiogênese é persistente e desordenada leva a desequilíbrios vasculares com consequências consideráveis na estrutura e função renal de pacientes com ND (Nakagawa et al., 2009; Costa, Soares, 2013).

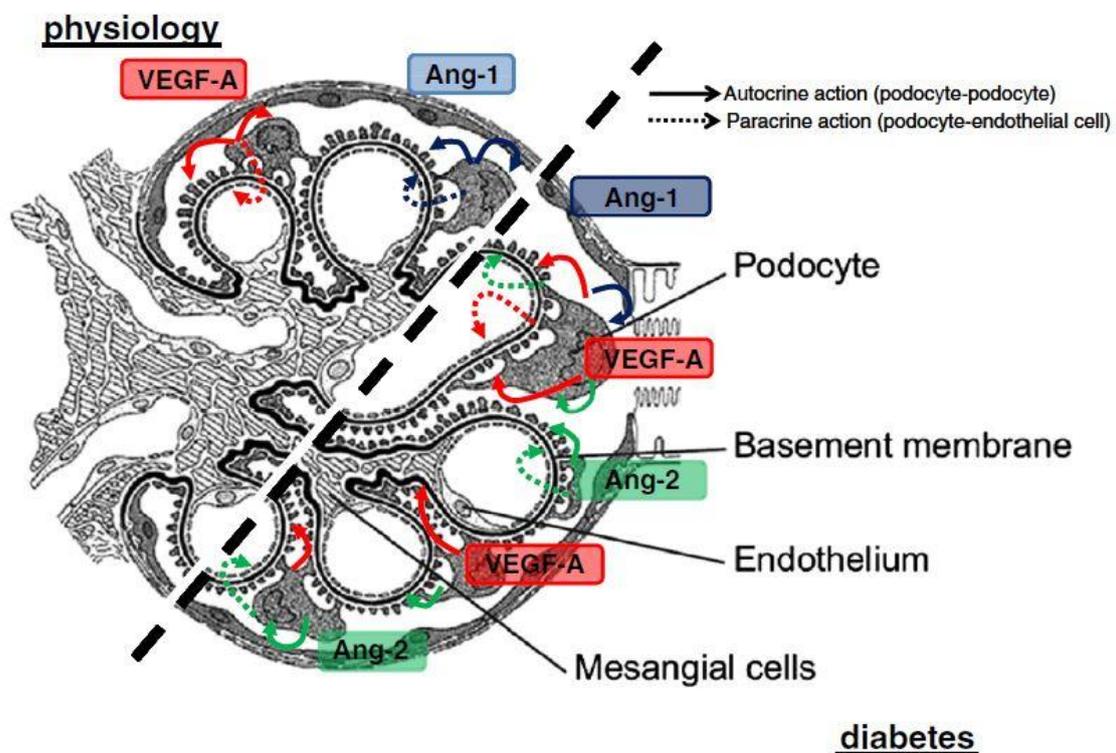
As células primordiais envolvidas no processo de angiogênese são as células endoteliais (Tahergorabi, Khazaei, 2012), as quais têm relevante participação na estrutura da barreira de filtração glomerular, atuando como a primeira linha de defesa na restrição da passagem de proteínas de alto peso molecular do plasma para urina e em conjunto com os podócitos, membrana basal e células mesangiais na prevenção da proteinúria (Haraldsson, Nystrom, 2012). Nesse sentido, durante o desenvolvimento e progressão

da ND a angiogênese descontrolada é caracterizada por concentrações elevadas (sérica, urinária e no tecido renal) dos fatores pró-angiogênicos VEGF-A (forma da família VEGF predominantemente encontrada em glomérulos) e Angpt-2 (Lim et al., 2004; Cas, Gnudi, 2012; Petrica et al., 2014; Dworacka et al., 2015; Fu et al., 2015; Jiang et al., 2022).

Em condições fisiológicas o VEGF-A é constitutivamente expresso pelos podócitos, que são células epiteliais viscerais glomerulares ligadas à membrana basal e que juntas circundam as células endoteliais (Cas, Gnudi, 2012; Furuya, Ishii, Kitamura et al., 2019; Ishii et al., 2019; Gil, Hooker, Larrivéé, 2021). Ainda sob essas condições, a secreção autócrina/parácrina do VEGF-A dos podócitos para as células endoteliais contribui para a manutenção e estabilidade estrutural e funcional da barreira de filtração glomerular (Stieger, Worthmann, Schiffer, 2011; Cas, Gnudi, 2012; Ishii et al., 2019; Jiang et al., 2022) (Figura 5). O VEGF-A promove essas ações pela interação com seus receptores de membrana para VEGF do tipo I ou tipo II (VEGFR1/VEGFR2) presentes majoritariamente nas células endoteliais (Fu et al., 2015; Chen et al., 2020). Entretanto, estudos demonstraram que em altas concentrações de glicose, especificamente nos estágios iniciais da ND, há excesso da secreção de VEGF-A pelos podócitos promovendo a neovascularização e demais injúrias glomerulares (Veron et al., 2011; Wen et al., 2013; Chen et al., 2020) (Figura 5). Nakagawa et al. (2009) sugerem que o aumento da albuminúria em pacientes diabéticos está associada com o aumento da permeabilidade das células endoteliais glomerulares induzidas pelos sistemas VEGF-A/VEGFR1. Dessapte-Baradez et al. (2014) demonstraram que o aumento da expressão de VEGF-A e a fosforilação do VEGFR2 contribuem para a angiogênese anormal e alterações na função e estrutura renal em camundongos diabéticos.

O aumento da secreção de VEGF-A foi associado também com o aumento da expressão e atividade da Angpt-2 (Chen et al., 2020; Gil et al., 2021), outro importante fator de crescimento vascular pró-angiogênico. A Angpt-2 é um ligante para o receptor de tirosina quinase-2 (Tie-2) e atua principalmente como antagonista da angiopoietina-1 (Angpt-1) que também exerce suas ações via Tie-2 (Yuan et al., 2009). A Angpt-1 é produzida pelos podócitos e pericitos e ao se ligar a Tie-2, expresso predominantemente nas células endoteliais, o fosforila contribuindo para a manutenção da integridade do endotélio (Lim et al., 2004). Inversamente, a Angpt-2 produzida tanto por podócitos quanto por células tubulares epiteliais, inibe por competição a ligação entre Angpt-1/Tie-

2, levando ao aumento da permeabilidade vascular pela diminuição da adesão célula-célula e em sinergia com o VEGF-A promove a disfunção endotelial (Yuan et al., 2009; Chen 2020). A desestabilização endotelial causada pelo aumento das expressões do VEGF-A e Angpt-2 contribuiu para a hiperfiltração e albuminúria em pacientes e modelos experimentais de ND (Fu et al., 2015). Associado a isso, em um estudo realizado anteriormente no nosso laboratório foi observado que a prole de mães submetidas a deficiência de VitD apresentaram aumento da desestabilização endotelial, causada pelo desequilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos, com conseqüentes alterações da função e da estrutura renal na vida adulta (Almeida et al., 2019).



**Figura 5.** Esquema mostrando expressão/secreção de VEGF-A e Angiopoietinas 1/2 e seus respectivos alvos glomerulares. Adaptado: Cas, Gnudi, 2012.

Além disso, dos mais de 400 miRs identificados no genoma humano, menos de 10% estão relacionados com a função das células endoteliais e angiogênese, entre eles distingue-se o miR-200b, o qual tem importante função no controle da TEM via TGF- $\beta$ /proteínas ZEB (Sun et al., 2017). O mRNA do VEGF-A também possui um sítio de ligação 3'UTR para o miR-200b, que contribui para a regulação da expressão desse fator de crescimento vascular e indiretamente para a angiogênese (Sun et al., 2017). Nesse sentido, foi demonstrado que a regulação negativa do miR-200b está associada ao

aumento da expressão do VEGF-A e permeabilidade endotelial em cultura de células de retina e em amostras de retina de ratos e pacientes diabéticos (McArthur et al., 2011; Ruiz, Feng, Chakrabarti, 2015).

Diante disso, é possível notar que durante a progressão da ND há uma relação estrita entre as alterações das células epiteliais e endoteliais. Contudo, a relação entre essas alterações e a deficiência de VitD foram pouco estudadas e precisam ser melhor exploradas.

### **1.5 Inflamação durante a nefropatia diabética**

Durante a progressão da ND, a resposta inflamatória contribui para o remodelamento renal e pode ser estimulada por múltiplos processos, incluindo a desestabilização endotelial (Akwii et al., 2019; Jeong et al., 2021) e a TEM (Zhang et al., 2018). No decorrer dos danos epiteliais e endoteliais há liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que favorecem a diapedese, pelo aumento da expressão de moléculas de adesão celular, e consequente infiltração e proliferação de células inflamatórias no rim lesado, principalmente, de monócitos e macrófagos (Barutta, Bellini, Gruden, 2022; Furuya, Ishii, Kitamura, 2019; Jourde-Chiche et al., 2019). No rim, essas células secretam citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, contribuindo para a progressão da fibrose glomerular e túbulo-intersticial (Zhang et al., 2018; Barutta, Bellini, Gruden, 2022).

Bus et al. (2017) demonstraram que o aumento da expressão do VEGF-A estava associado ao aumento da inflamação no DM1. Em estudos clínicos, foi demonstrado que pacientes com diabetes mellitus 2 (DM2) apresentam altos níveis séricos de VEGF-A quando comparados com pacientes não-diabéticos e isso estava associado ao aumento da inflamação e alterações estruturais e funcionais renais nesses pacientes (Petrica et al., 2014; Hanefeld et al., 2016). Foi constatado ainda que o aumento da inflamação está relacionado com aumento do estresse oxidativo e da TEM em cultura de células submetidas a altas concentrações de glicose em biópsias de tecido renal de pacientes com DM2 (Huang et al., 2022). Estudos recentes demonstraram que a inflamação estava associada com aumento da expressão de marcadores de TEM e fibrose renal em ratos nefrectomizados (Gonçalves et al., 2020) e ratos obesos (Bernardo et al., 2022) deficientes em VitD. Apesar disso, os mecanismos envolvidos na relação entre desestabilização endotelial/TEM/inflamação na deficiência de VitD durante a progressão

da ND, principalmente, em modelos experimentais de diabetes tipo 1 ainda não foram totalmente esclarecidos.

# Hipótese

## 2. HIPÓTESE

O diabetes é uma das principais causas de DRC no mundo, entretanto, ainda não está claro se a deficiência de VitD contribui para o risco aumentado de desenvolvimento, progressão e excesso de mortalidade em pacientes com ND e os mecanismos que poderiam estar envolvidos nesse processo. Portanto, nossa hipótese é de que a deficiência de VitD estabelece um ambiente favorável à expressão de moléculas que promovem um *crossstalk* entre as células epiteliais e endoteliais renais levando ao aumento dos distúrbios renais causados pelo diabetes tipo 1.

# Objetivos

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar um modelo de evolução da nefropatia diabética na deficiência de vitamina D e diabetes tipo 1 e suas correlações com marcadores de alterações epiteliais e endoteliais renais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Analisar a influência da deficiência de VitD durante a evolução da nefropatia diabética em ratos diabéticos sobre:

- Os níveis glicêmicos, de paratormônio, cálcio, fósforo e na pressão arterial.
- A estrutura e função renal.
- A expressão gênica de ZO-1, fibronectina, ZEB1/2, miR-200a,b,c.
- A expressão proteica do receptor de VitD, CD34, VEGF-A, VEGFR2, Angpt1/2, Tie-2, Smad2/3, ZEB2.
- Os níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .
- A imunolocalização para desmina, vimentina,  $\alpha$ -SMA, JG12, PCNA e ED-1.
- Os níveis teciduais e urinários de TGF- $\beta$ 1 (principal citocina pró-fibrótica).

# **Material e Métodos**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais e Dieta

O protocolo experimental desse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo no dia 29 de abril de 2019 sob o número de protocolo 002/2019 (Anexo 1).

Foram utilizados 48 ratos *Wistar Hannover*, pesando entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto os quais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina, em sala com um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro, temperatura de 22°C, livre de radiação ultravioleta-B (UVB) e umidade controlada em um número máximo de quatro animais por caixa e água e ração *ad libitum*. Os ratos foram divididos inicialmente em dois grupos experimentais com 24 ratos/cada e foram tratados com as seguintes dietas: dieta padrão (com **VitD**), ração feita de acordo com o protocolo AIN93G, incluindo 1.000.0 UI/Kg de VitD<sub>3</sub> (Reeves e cols, 1993) e dieta livre de VitD<sub>3</sub> (**VitDD**) (Pragsoluções Biociências, Jaú, São Paulo, Brasil), a mesma dieta AIN93G, mas sem VitD<sub>3</sub>, sendo a falta de VitD a única variável entre as dietas. Todos os nutrientes correspondem às recomendações da AIN93G para roedores e a dieta foi selecionada baseada nos estudos realizados por Nascimento et al. (2012) e sua composição está demonstrada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composições das dietas.

Nutriente (g/kg)	Dieta Padrão (VitD)	Dieta sem VitD (VitDD)
Amido de Milho	397.5	397.5
Caseína	200.0	200.0
Amido dextrinado	132.0	132.0
Sacarose	100.0	100.0
Óleo de Soja	70.0	70.0
L-Cisteína	3.00	3.00
Colina	2.50	2.50
Mix Mineral	35.0	35.0
Carbonato de cálcio	357.0	357.0
Mix de vitamina	10.0	10.0
Vitamina D3	0.025	0.00
Fibra	50.0	50.0

Seis semanas após a introdução das dietas (VitD e VitDD) foi realizada a indução do DM1 pela injeção única intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, Sigma Aldrich,

USA), na dose de 45 mg/kg, diluída em tampão citrato 0,1M, pH 4,5, após 12 horas de jejum, enquanto os animais dos grupos controles receberam uma única dose intraperitoneal de tampão citrato 0,1M, pH 4,5. Setenta e duas horas após a administração de STZ foi feita a confirmação da indução do diabetes pela glicemia capilar de jejum utilizando um glicosímetro digital. Os animais que apresentaram glicemia de jejum  $\geq 250$  mg/dL foram considerados diabéticos. Em seguida os ratos foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

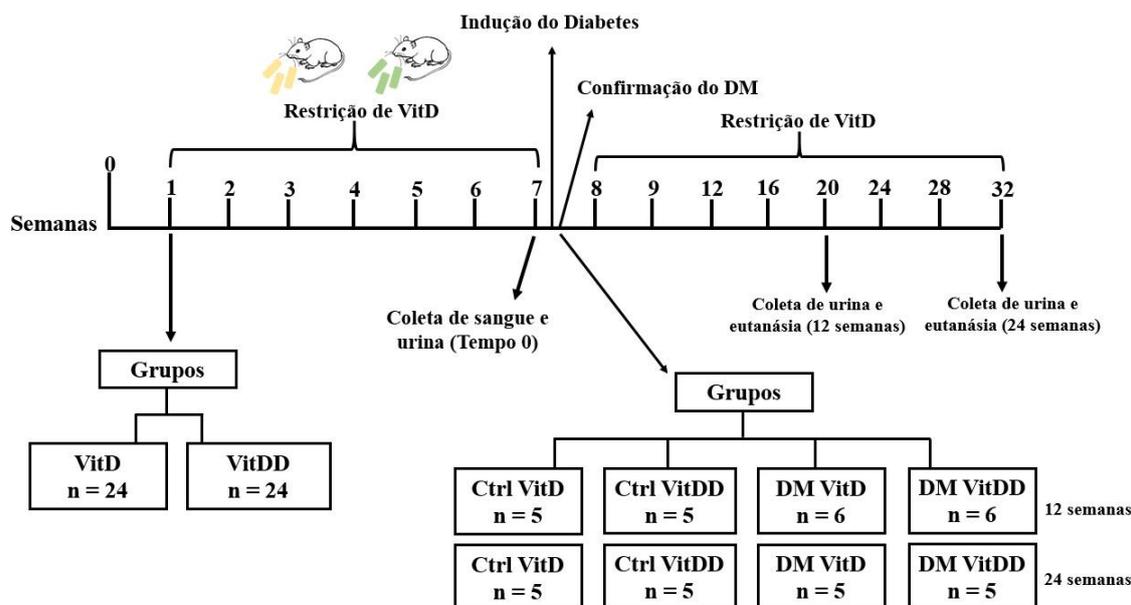
**Ctrl VitD (n = 10)** - ratos alimentados com dieta contendo VitD e sacrificados 12 e 24 semanas após injeção única de tampão citrato 0,1M, pH 4,5.

**Ctrl VitDD (n = 10)** - ratos alimentados com dieta livre de VitD e sacrificados 12 e 24 semanas após injeção única de tampão citrato 0,1M, pH 4,5.

**DM VitD (n = 14)** - ratos submetidos ao tratamento com dieta contendo VitD e sacrificados 12 e 24 semanas após injeção única de STZ na dose de 45 mg/kg.

**DM VitDD (n = 14)** - ratos alimentados com dieta livre de VitD e sacrificados 12 e 24 semanas após injeção única de STZ na dose de 45 mg/kg.

Dois ratos de cada grupo não ficaram diabéticos e por isso foram excluídos do projeto. Além disso, um rato do grupo DM VitDD morreu um mês antes e um do grupo DM VitD um dia antes do final do protocolo experimental. A cada quatro semanas os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e tiveram amostras de urina de 24 horas coletadas para as quantificações da albumina, creatinina e volume urinário. Doze e vinte e quatro semanas após o fim do protocolo experimental os animais foram eutanasiados e o material biológico coletado (Figura 6).



**Figura 6.** Imagem representativa do protocolo experimental. Semanas 0-1, aclimação dos animais; semanas 1-7, animais alimentados com dieta VitD e VitDD; semanas 7-8, coleta de sangue e urina para estudos de função e avaliação da deficiência de VitD nos animais submetidos a restrição de VitD, indução do diabetes e confirmação 72 h após; semanas 8-20, animais alimentados com dieta VitD e VitDD e eutanásia dos animais do protocolo de 12 semanas; semanas 20-32, animais alimentados com dieta VitD e VitDD e eutanásia dos animais do protocolo de 24 semanas.

#### 4.2 Determinação da 25-hidroxivitamina D, glicemia, paratormônio, íons $\text{Ca}^+$ e $\text{P}^+$ e pressão arterial média

A quantificação da 25(OH)D foi realizada após as seis semanas de introdução das dietas com ou livre em VitD e 12 e 24 semanas após a indução do diabetes, pelo teste direto competitivo baseado no princípio de quimioluminescência (CLIA) (Liaison®). A determinação de glicose nas amostras de sangue foi realizada semanalmente utilizando um sistema de monitorização da glicemia (ACCU-CHEK Active, Roche Diabetes Care GmbH). O hormônio da paratireoide, paratormônio (PTH), foi determinado em amostras de soro utilizando kit de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de acordo com as orientações do fabricante (*Rat Intact PTH ELISA* – Quidel, USA). Os íons  $\text{Ca}^+$  e  $\text{P}^+$  no plasma e urina foram quantificados por método colorimétrico (Kit Labtest Diagnóstica S.A) e as frações de excreção desses íons foram calculadas. As determinações de pressão arterial foram realizadas mensalmente, de maneira indireta por pletismografia de cauda (CODA *Non-Invasive Blood Pressure system*, Kent Scientific Corporation, 2010).

### 4.3 Análise da Função Renal

A análise da creatinina plasmática e urinária foi realizada por método colorimétrico utilizando ácido pícrico (Kit Labtest Diagnóstica S.A) e a taxa de filtração glomerular (TFG) foi determinada pelo Clearance de Creatinina. A excreção de albumina foi avaliada por eletroimunoensaio em gel de agarose utilizando um anticorpo anti-albumina de rato (Laurell, 1972).

### 4.4 Estudos histológico e morfométrico

Fragmentos de tecido renal foram coletados no momento da eutanásia e imersos em solução de *methacarb* (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) por 24 horas. Após esse período, a solução foi substituída por álcool 70%. O tecido renal foi incluído em parafina e cortes histológicos de 2  $\mu\text{m}$  de espessura foram corados com Ácido Periódico Metenamina de Prata (PAMS) e Tricrômico de Masson (TM) e examinados sob microscopia de luz. A coloração com PAMS foi utilizada para determinação da área dos tufo glomerulares e da área mesangial fracional de 50 glomérulos em biópsia de tecido renal em campos consecutivos (0,267  $\text{mm}^2$ ). A fibrose túbulo-intersticial foi determinada pela quantificação da área intersticial relativa em 30 campos (0,267  $\text{mm}^2$ ) consecutivos do córtex e 20 da medula externa renal em biópsia de tecido renal coradas com TM. A análise correspondente às áreas dos tufo glomerulares, mesangial fracional e intersticial relativa foram realizadas por morfometria computadorizada usando o programa *ImageJ 1.44p* (National Institute of Health, USA). Os resultados correspondentes a área mesangial fracional foi corrigida pela área total do glomérulo. A área intersticial relativa foi corrigida pela área total do campo e os resultados expressos como porcentagem de área marcada para TM (Souza et al., 2019). As imagens foram adquiridas através de microscópio (Zeiss Axio; Zeiss, Germany) acoplado à câmera (AxioCam MRc - AxioVision Release 4.8.3).

### 4.5 Estudos Imuno-histoquímicos

Fragmentos de tecido renal foram cortados em secções de 4  $\mu\text{m}$  de espessura e incubados com os seguintes anticorpos: anti-desmina (1:100, Dako, Glostrup, Dinamarca), anti-vimentina (1:200, Dako, Glostrup, Dinamarca) e anti-  $\alpha$ -SMA (1:200, Dako, Glostrup, Dinamarca) *overnight* a 4° C, e com anti-PCNA (1:500, Sigma, USA), anti-ED1 (1:1000, Serotec, EUA) e anti-JG12 (Santa Cruz Biotechnology, USA) por 1

hora em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários foram usados de acordo com o anticorpo primário. A marcação para cada anticorpo nos cortes de tecido renal foi revelada utilizando o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, USA) e 3,3-diaminobenzidina (DAB - Sigma, USA). Os cortes foram contracolorados com *methyl green*, desidratados e montados. A avaliação da imunorreação para desmina (em 50 glomérulos), vimentina (em 30 campos corticais) e  $\alpha$ -SMA (em 30 campos corticais e 20 campos intersticiais da medula externa) foram realizadas por morfometria computacional usando o programa *ImageJ 1.44p* (National Institute of Health, USA), como descrito na seção 4.4. Os resultados correspondentes à imunomarcação para desmina e JG12 (glomerular) foram corrigidas pela área do tufo glomerular correspondente e para vimentina e  $\alpha$ -SMA pela área total do córtex e medula por campo e expressos como porcentagem (Souza et al., 2019). Para ED-1 e PCNA (cortical e medular) e JG12 (cortical e medular), a quantificação foi realizada pela contagem do número de células positivas para cada anticorpo e o resultado expresso como média aritmética.

#### **4.6 Estudos por western blotting**

Homogenato de tecido renal foi obtido a partir de um tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1  $\mu$ g/mL aprotinina, 1  $\mu$ g/mL leupeptina, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila, 1 mM ortovanadato de sódio, pH 10, 1 mM pirofosfato de sódio, 25 mM fluoreto de Sódio, 0.001 M EDTA, pH 8) contendo um coquetel de inibidores de protease (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). As amostras foram incubadas a 4 °C durante 15 min, centrifugadas a 2000g, e em seguida teve o sobrenadante coletado. As concentrações de proteína foram quantificadas usando o método de ensaio de Bradford (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent - Bio-Rad) (Almeida et al., 2019). As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose overnight a 4 °C. As membranas foram bloqueadas por 60 minutos com leite desnatado a 5% diluído em TBST (mistura de Trisbase, NaCl, EDTA/L e Tween-20) e incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-CD34 (1:400, Bioss, EUA), anti-Tie2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-Angpt-2 (1:200, Bioss, EUA), anti-VEGF-A (1:500, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-VEGFR2 (1:500, Cell Signaling, EUA), anti-ZEB2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-VDR (1:500, Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anti-Smad2/3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluídos em solução de TBST e BSA. Para avaliar a equivalência do carregamento de proteína e/ou transferência,

as membranas também foram incubadas com um anticorpo monoclonal anti-GAPDH (1:1000, Cell Signaling). Por fim as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo policlonal anti-*rabbit* IgG (1:5000, Dako, Dinamarca) ou anti-*mouse* IgG (1:5000, Dako, Dinamarca) conjugado a peroxidase por uma hora em temperatura ambiente. Os anticorpos ligados à membrana foram detectados usando o substrato quimioluminescente *Supersignal West Pico* (Pierce Chemical, Rockford, IL, EUA). As intensidades das bandas foram visualizadas por um sistema de imagem (Kodak Gel Logic 2200, EUA) e quantificadas por densitometria usando o software *ImageJ 1.44p* (National Institute of Health, EUA) e os resultados apresentados em unidades arbitrárias.

#### 4.7 Avaliações por ELISA

Ensaio de ELISA foram realizados para a quantificação dos níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 $\beta$  (interleucina-1 beta) (R&D Systems, EUA) e níveis teciduais e urinários de TGF- $\beta$ 1 (PROMEGA, EUA). Para realização dos ensaios foram utilizados lisados de tecido renal (como descrito na seção 5.6) e urina da bexiga (coletada no momento da eutanásia, tratada com PMSF e estocada a -70 °C até o momento do uso) (Faleiros et al., 2017).

#### 4.8 Estudos de expressão gênica

Os estudos de expressão gênica foram realizados conforme descrito por Sene et al. (2014). Resumidamente, o RNA total do tecido renal de todos os grupos ( $n = 5$ /cada) foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA) de acordo com as orientações do fabricante e a quantidade foi determinada usando o espectrofotômetro Agilent Epoch Microplate (BioTek Instruments, EUA). As transcrições reversas (RT) de ZO-1, fibronectina, ZEB1/2 e miR-200a/b/c foram realizados usando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA) e o *TaqMan<sup>®</sup> microRNA RT combined With Stem-loop RT Primers* (Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções especificadas pelo fabricante, respectivamente. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RTq-PCR) foi utilizada para análise da expressão do RNA mensageiro (mRNA) de ZO-1, fibronectina, ZEB1/2, e dos miR-200a/b/c. Para realização da RTq-PCR para ZO-1, fibronectina, ZEB1/2 foi utilizando o método *SYBR green<sup>®</sup> Master Mix* (Merck, Alemanha) e para os miR-200a/b/c foi usado o método *TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay* (Life Technologies, EUA). O programa *StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, EUA) foi usado para realização das reações de RTq-PCR.

As expressões diferenciais dos mRNA para ZO-1, fibronectina, ZEB1/2 e dos miR-200a/b/c foram realizadas comparando os grupos DM VitD e DM VitDD e seus respectivos grupos controles. A normalização da expressão do mRNA para ZO-1, fibronectina, ZEB1/2 foi realizada utilizando o GAPDH e para os miR-200a/b/c por pequenos RNAs nucleares (genes de referência U6 e U87). A expressão gênica relativa foi avaliada por quantificação comparativa usando o software *StepOne*<sup>TM</sup> v2.1 (Applied Biosystem, EUA) e pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Todas as sequências de primers utilizadas foram descritas inicialmente em Sene et al (2014).

#### **4.9 Análise estatística**

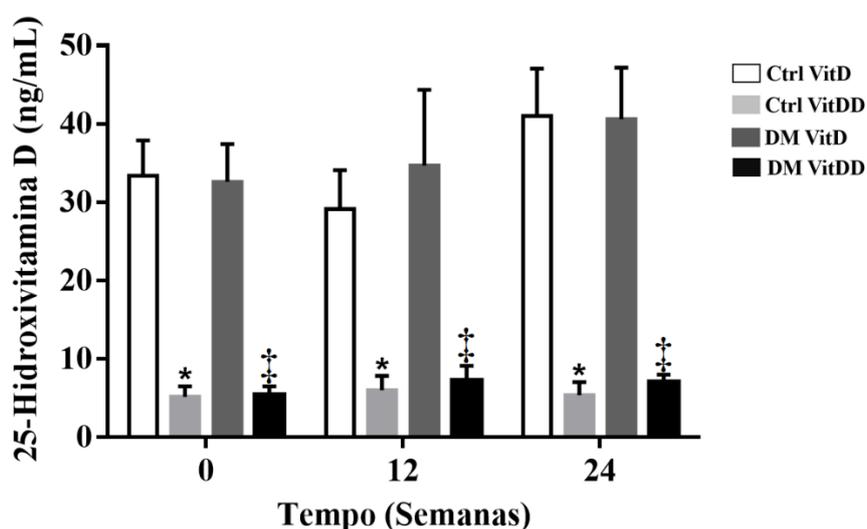
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade da distribuição *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância *One-Way* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Newman Keuls*. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido por comparações múltiplas pelo teste de *Dunn*. O Teste t de *Student* foi utilizado para analisar as variâncias entre as médias nos diferentes tempos dentro do mesmo grupo. Os dados foram expressos como média±desvio padrão (DP) ou como mediana e percentis (25-75%). O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *Graph Pad Prism* versão 7.0 para Windows (*Graph Pad Software*, La Jolla, EUA).

# Resultados

## 5. RESULTADOS

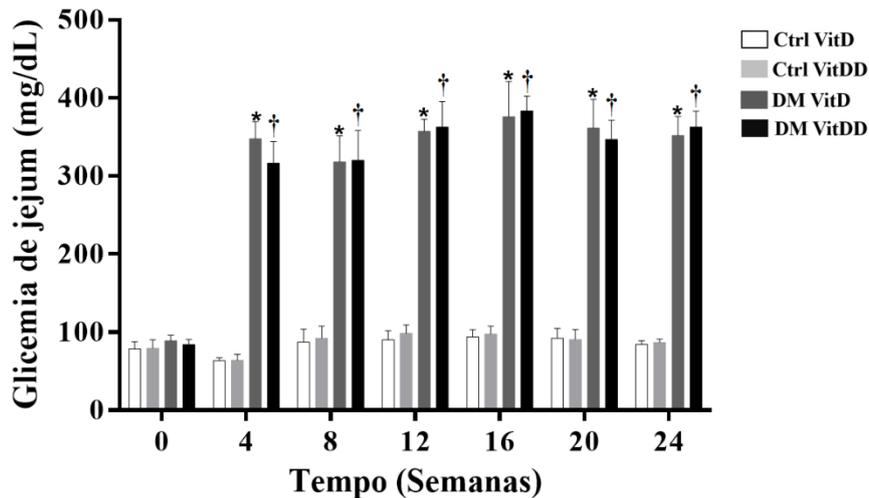
### 5.1 Caracterização do modelo experimental

A 25(OH)D é a forma circulante da VitD em maior quantidade no organismo (Joergensen et al., 2011; Mithal et al., 2009) e por isso foi utilizada como marcador das concentrações séricas desse hormônio em nosso estudo. Assim, nossos dados demonstraram que os ratos tratados com dieta VitDD estavam deficientes deste hormônio no Tempo 0 do protocolo experimental que corresponde ao momento antes da indução do diabetes e permaneceram deficientes até 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou administração de veículo nos animais diabéticos e controles alimentados com dieta livre de VitD ( $p < 0,0001$ ) (Figura 7).



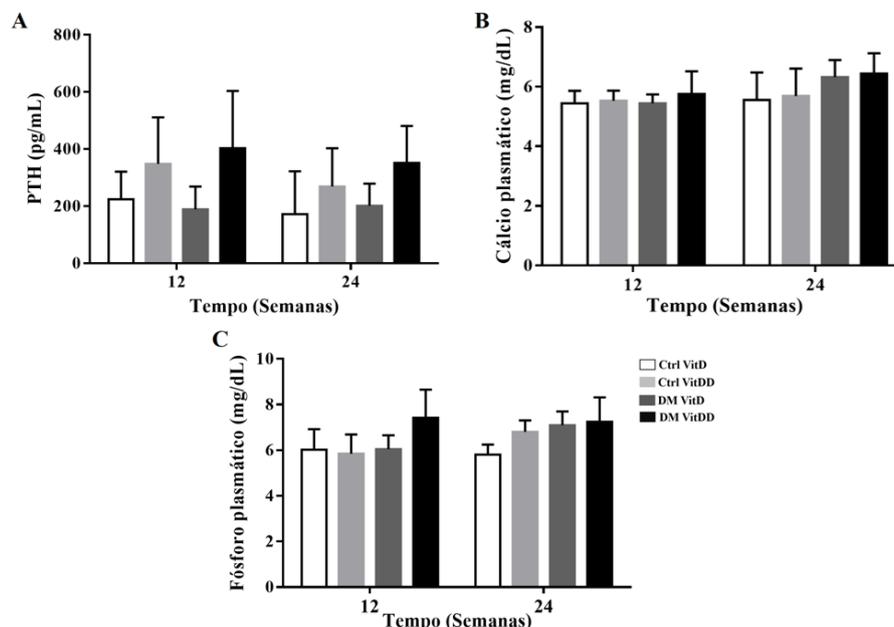
**Figura 7.** Níveis Séricos de 25-Hidroxitamina D de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) antes da indução do diabetes ou injeção de veículo (Tempo 0) e eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. \**versus* Ctrl VitD, ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada.

A glicemia descontrolada é o principal fator contribuinte para as alterações macro e microvasculares que ocorre em pacientes com diabetes (Polat et al, 2016). Por isso, em nosso estudo a glicemia dos ratos diabéticos foi mantida entre 300 a 350 mg/dL ( $p < 0,0001$ ) (Figura 8) para simular a faixa glicêmica descompensada observada em pacientes diabéticos.



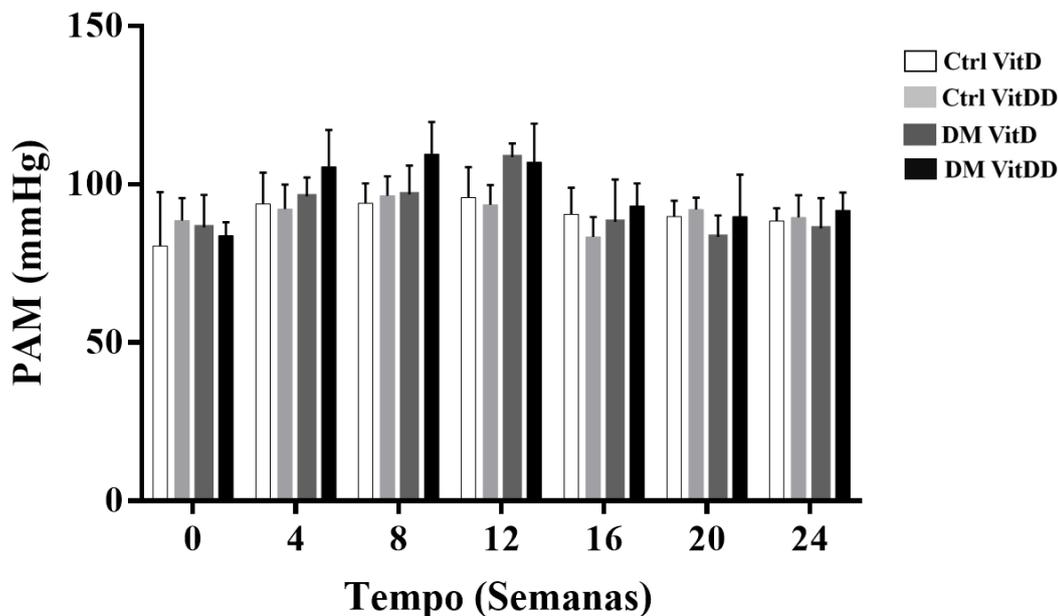
**Figura 8.** Glicemia de jejum a cada 4 semanas ao longo de todo o protocolo experimental de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD). \**versus* Ctrl VitD, †*versus* Ctrl VitDD; n = 5/cada.

Aumento dos níveis séricos de PTH e consequente alterações nas concentrações séricas dos íons  $\text{Ca}^+$  e  $\text{P}^+$  são características observadas na deficiência de VitD (Makitaipale et al., 2020). No entanto, nossos dados mostraram que não houve diferença na concentração sérica de PTH e dos níveis plasmáticos de  $\text{Ca}^+$  e  $\text{P}^+$  entre os grupos experimentais no nosso estudo ( $p > 0,05$ ) (Figura 9A, B, C).



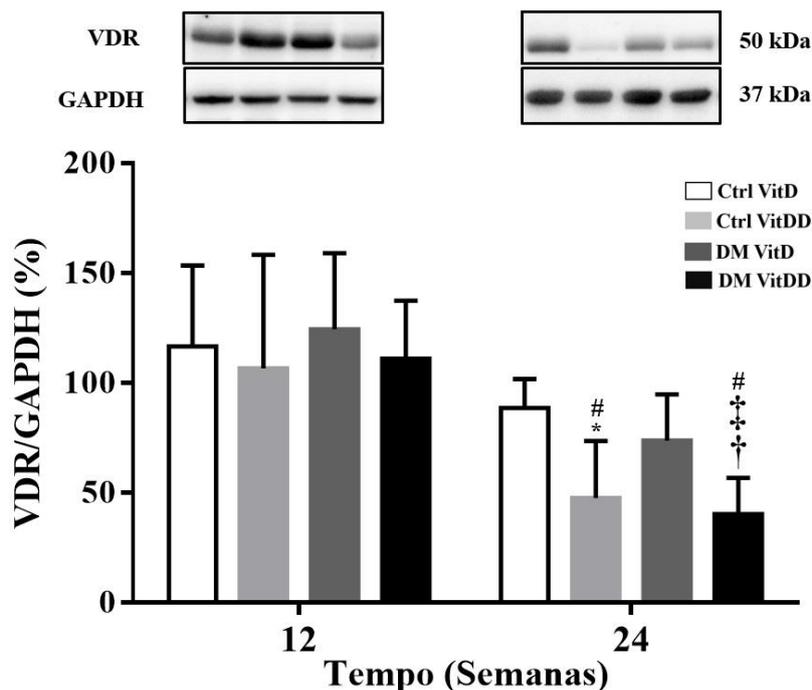
**Figura 9.** A, Níveis séricos de paratormônio (PTH); B e C, níveis plasmáticos dos íons  $\text{Ca}^+$  e  $\text{P}^+$ , respectivamente, de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou da injeção de veículo. n = 5/cada.

Do ponto de vista hemodinâmico, a PAM é a que melhor representa os valores de pressão arterial sistêmica pois, reflete a pressão de ejeção ventricular e a resistência vascular periférica (Aziz et al, 2019). Nossos dados demonstraram que não houve alteração da pressão arterial média entre os grupos experimentais durante todo o protocolo experimental (Figura 10).



**Figura 10.** Pressão Arterial Média (PAM) a cada 4 semanas ao longo de todo o protocolo experimental de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD). n = 5/cada.

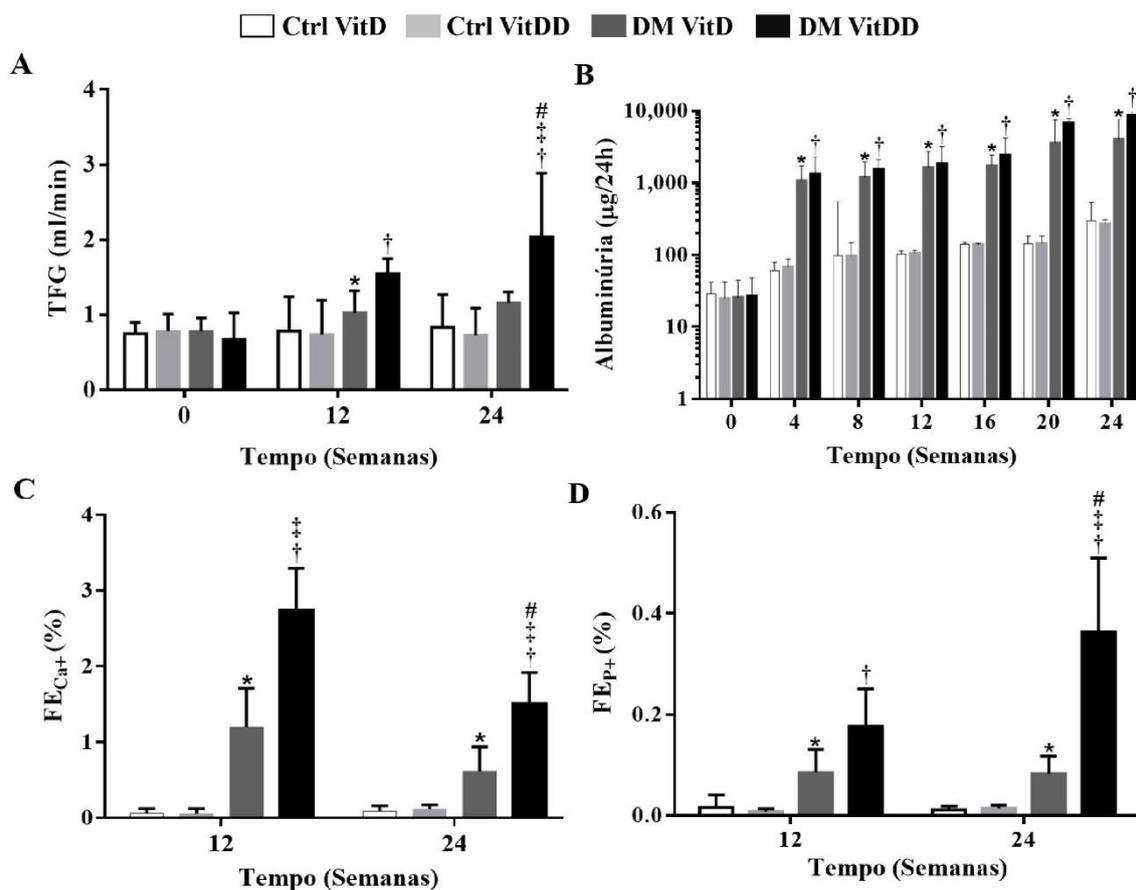
A VitD em sua forma ativa exerce suas funções clássicas e não clássicas por meio da ligação ao seu receptor membranar ou nuclear (Dusso et al, 2011). Nossos dados de caracterização demonstraram que tanto os ratos controles quanto os diabéticos alimentados com dieta livre de VitD apresentaram redução significativa da expressão do VDR com 24 semanas após injeção de veículo ou indução do diabetes, respectivamente ( $p = 0,004$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Expressão proteica do receptor da VitD (VDR) de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. \**versus* Ctrl VitD, †*versus* Ctrl VitDD, ‡*versus* DM VitD, #*versus* DM VitDD de 12 semanas; n = 5/cada.

## 5.2 Influência da deficiência de VitD na função renal durante a progressão da ND

Nossos dados mostraram que 12 semanas após a indução do diabetes os ratos dos grupos DM VitD e DM VitDD apresentaram aumento da TFG ( $p = 0,01$ ) (Figura 12A). Vinte e quatro semanas após a indução do diabetes a TFG permaneceu aumentada no grupo DM VitDD quando comparado ao grupo DM VitD ( $p = 0,004$ ) (Figura 12A). Nossos dados demonstraram também aumento progressivo da excreção urinária de albumina nos animais de ambos os grupos diabéticos quando comparado com seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 12B). Foi demonstrado ainda que 12 e 24 semanas após a indução do diabetes houve aumento da  $FE_{Ca^{2+}}$  ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) e  $FE_{P^{2+}}$  ( $p = 0,002$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) nos ratos do grupo DM VitDD quando comparado com os grupos Ctrl VitDD e DM VitD (Figura 12C, D). Portanto, nossos resultados de função renal sugerem que os animais diabéticos estão ainda nos estágios iniciais da ND, visto que, estas são características observadas nessa fase da doença e a deficiência de VitD contribuiu para o surgimento mais precoce dessas alterações.



**Figura 12.** A, Taxa de Filtração Glomerular (TFG); B, Albuminúria; C, Fração de excreção de cálcio ( $FE_{Ca^+}$ ); D, Fração de excreção de fósforo ( $FE_{P^+}$ ) de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. \**versus* Ctrl VitD, †*versus* Ctrl VitDD, ‡*versus* DM VitD, #*versus* DM VitDD de 12 semanas; n = 5/cada.

### 5.3 Influência da deficiência de VitD na estrutura renal durante a progressão da ND

Os resultados dos estudos morfométricos demonstraram aumento das áreas do tufo glomerular, mesangial e intersticial relativa cortical e medular nos animais dos grupos diabéticos 24 semanas após indução do diabetes quando comparado com seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2, Figura 13 e 14). Contudo, os aumentos das áreas do tufo glomerular e mesangial foram mais evidentes nos ratos do grupo DM VitDD quando comparado com os animais do grupo DM VitD ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0005$ ; respectivamente) (Tabela 2, Figura 13). Os ratos do grupo DM VitDD com 24 semanas apresentaram ainda aumento significativo dessas alterações quando comparados com os

animais DM VitDD eutanasiados 12 semanas após a indução do diabetes ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2, Figura 13).

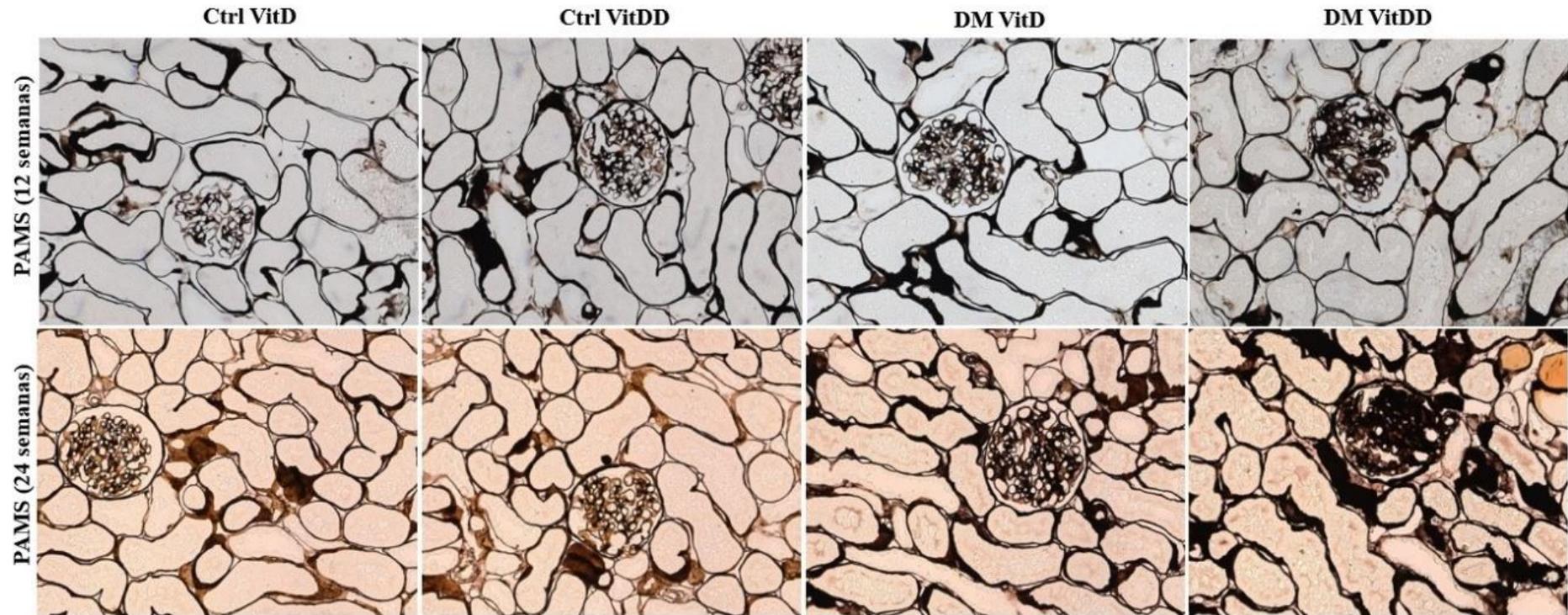
Os aumentos das áreas intersticiais relativas corticais e medulares foram maiores nos ratos do grupo DM VitDD quando comparados com os observados nos animais do grupo DM VitD ( $p = 0,0005$ ;  $p = 0,0002$ ; respectivamente) (Tabela 1, Figura 14). Os ratos do grupo DM VitDD com 24 semanas apresentaram ainda aumento significativo dessas alterações quando comparados com os animais DM VitDD eutanasiados com 12 semanas após a indução do diabetes ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2, Figura 14). Não foi observada diferença estatística dessas alterações de estrutura renal 12 semanas após a indução do diabetes entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2, Figura 13 e 14).

Tomados em conjunto, nossos dados de estrutura renal corroboram o fato de os animais diabéticos ainda estarem nos estágios iniciais da ND, uma vez que, essa fase também é caracterizada por hipertrofia glomerular, expansão mesangial e início da fibrose túbulo-intersticial e que a deficiência de VitD acelera o desenvolvimento e progressão das lesões renais nesses animais.

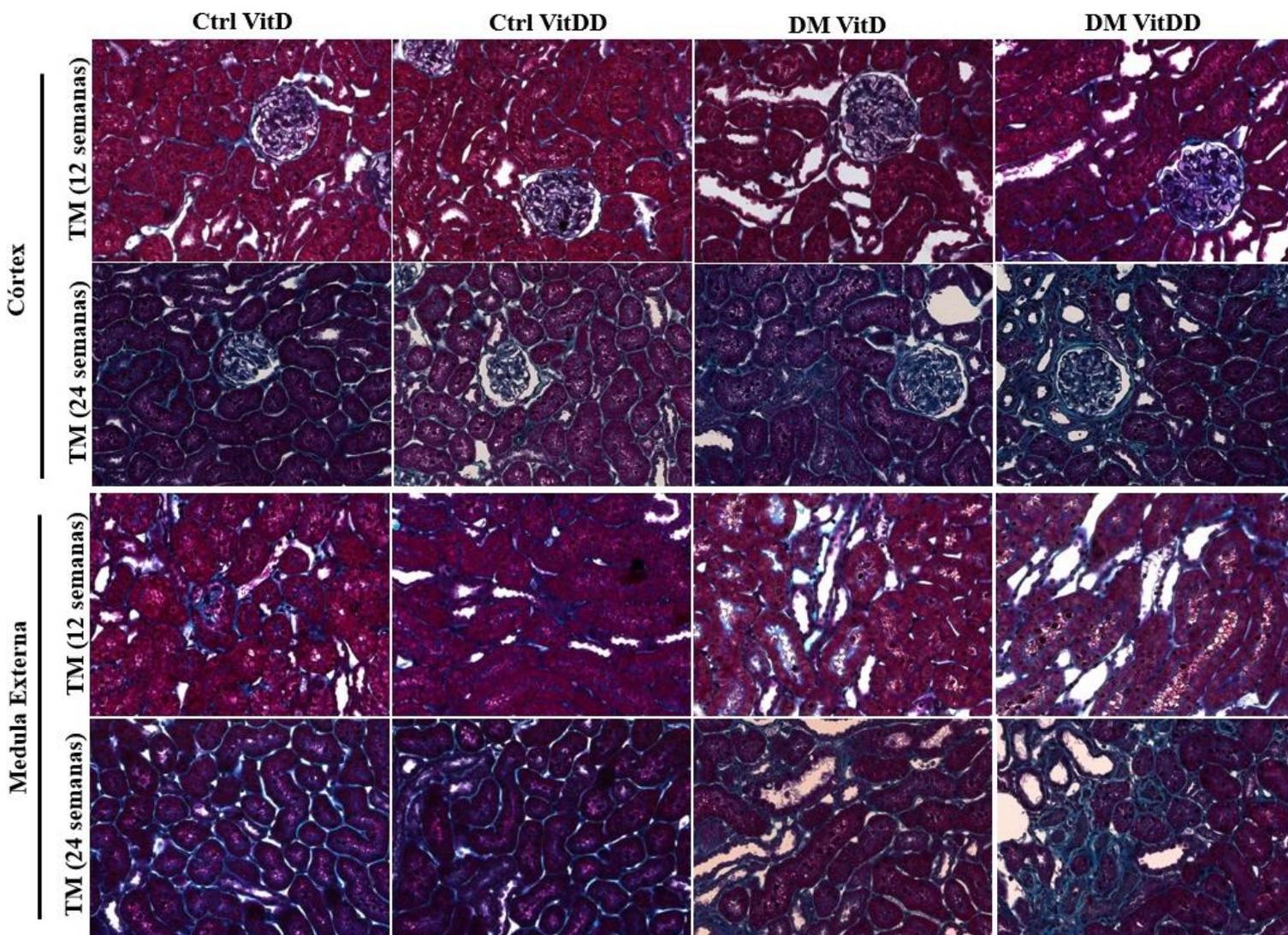
**Tabela 2.** Dados da histologia renal de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD).

Variável	GRUPO			
	Ctrl VitD	Ctrl VitDD	DM VitD	DM VitDD
<b>Área do tufo glomerular (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>				
12 semanas	5097 $\pm$ 407	5577 $\pm$ 724	5764 $\pm$ 243	5965 $\pm$ 446
24 semanas	5799 $\pm$ 49	5648 $\pm$ 219	6550 $\pm$ 193*	7148 $\pm$ 391†‡
<b>Área mesangial fracional</b>				
12 semanas	0,06 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01
24 semanas	0,1 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,03#	0,18 $\pm$ 0,02†‡#
<b>Área intersticial relativa (%)</b>				
<b>Córtex</b>				
12 semanas	0,0(0,0;0,6)	0,0(0,0;0,8)	0,4(0,2;0,8)	0,4(0,0;1,2)
24 semanas	1,2 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 1,5	3,7 $\pm$ 2,2#	11,1 $\pm$ 5,8†‡#
<b>Medula</b>				
12 semanas	0,0(0,0;0,5)	0,0(0,0;0,8)	0,6(0,1;0,8)	0,6(0,0;1,4)
24 semanas	3,3 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 1,7	8,6 $\pm$ 2,9*#	14,1 $\pm$ 5,4†‡#

Os dados são apresentados como média $\pm$ DP e em mediana (percentis 25 e 75), n=5/cada. \**versus* Ctrl VitD; †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; #*versus* seu respectivo grupo de 12 semanas.



**Figura 13.** Fotomicrografias representativas do córtex renal corado com Ácido Periódico Metanamina de Prata (PAMS) de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. Aumento 400x.



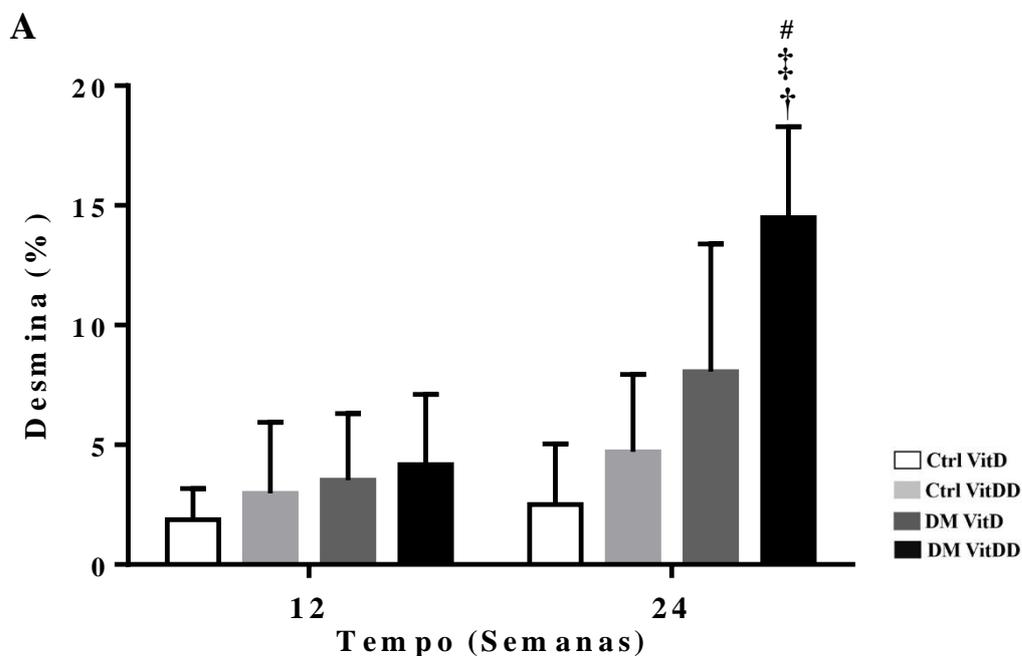
**Figura 14.** Fotomicrografias representativas do córtex e medula renal coradas com Tricrômio de Masson (TM) de rins de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. Aumento 400x.

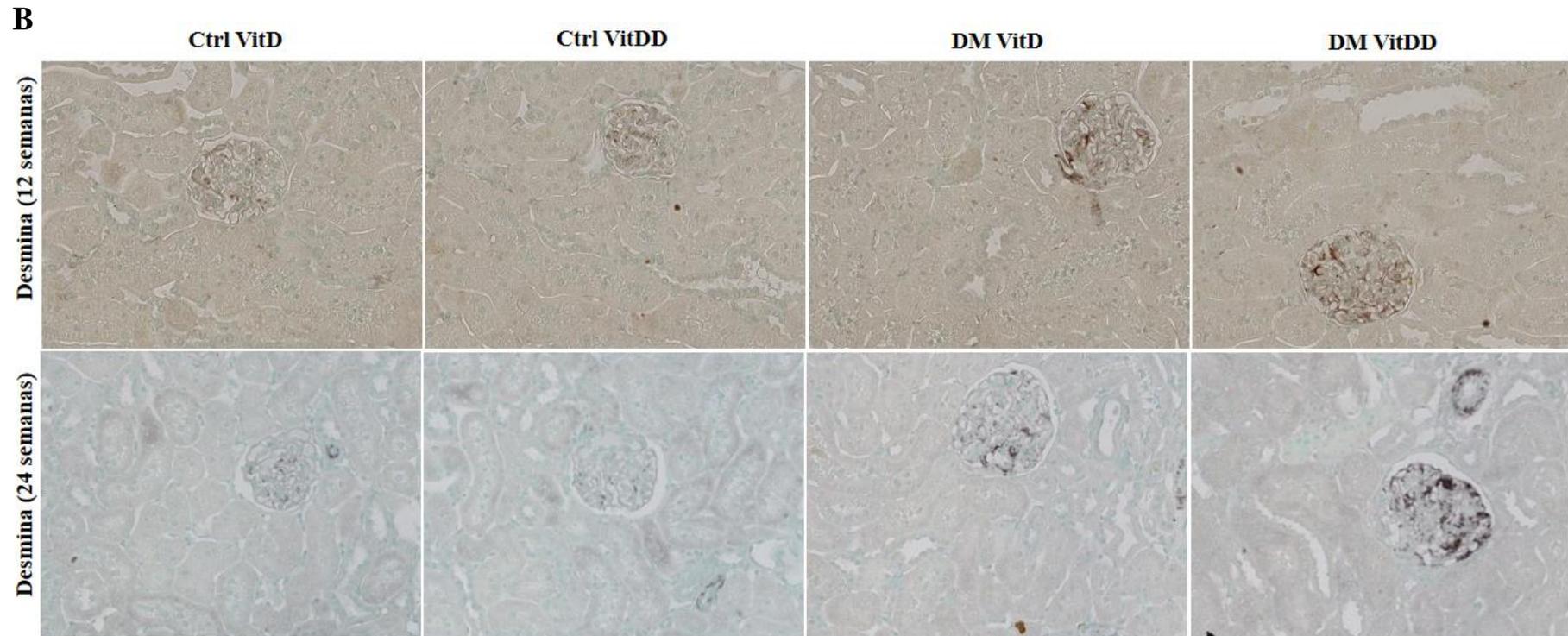
#### 5.4 Influência da deficiência de VitD na transição epitélio-mesenquimal durante a progressão da ND

A fibrose é considerada a via final comum para todas as doenças renais crônicas e o processo de TEM um dos principais responsáveis pelo acúmulo de proteínas de MEC no rim fibrótico (Zheng et al., 2017).

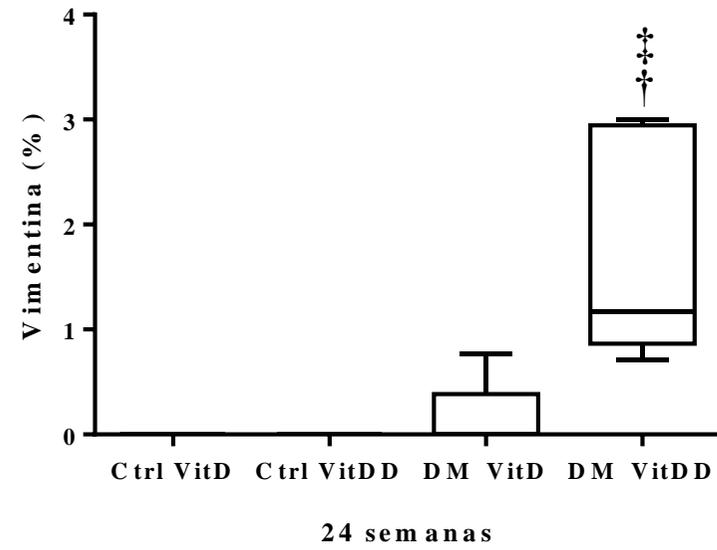
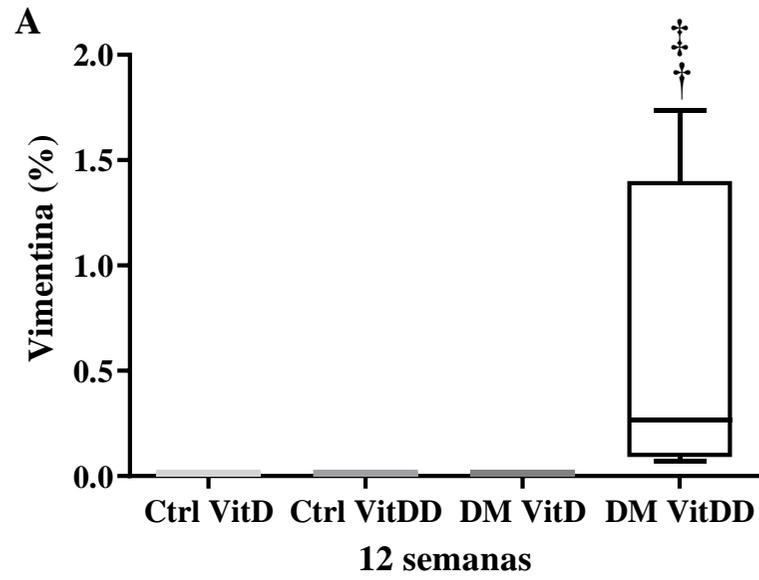
Diante disso, nossos dados demonstraram alterações da expressão de marcadores de TEM nas diferentes células renais no grupo DM VitDD, observada pelo aumento da marcação para desmina (marcador de lesão de podócitos) nos animais com 24 semanas ( $p = 0,004$ ) (Figura 15A, B), vimentina (marcador de lesão das células tubulares) nos

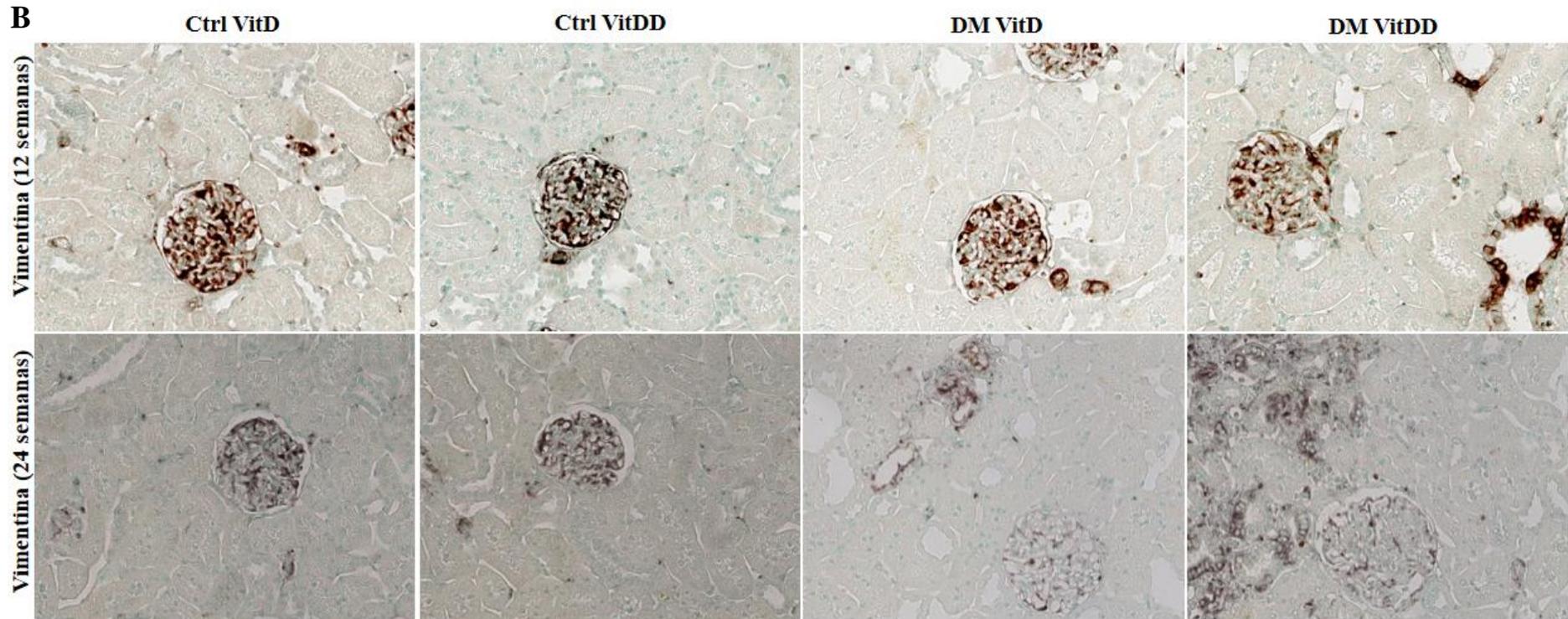
animais com 12 e 24 semanas ( $p = 0,001$ ;  $p = 0,002$ ; respectivamente) (Figura 16A, B), para  $\alpha$ -SMA (marcador de miofibroblasto intersticial) cortical nos animais com 12 e 24 semanas ( $p = 0,002$ ;  $p = 0,004$ ; respectivamente) (Figura 17A, B) e de  $\alpha$ -SMA na região medular nos animais com 24 semanas ( $p = 0,03$ ) (Figura 18A, B) após a indução do diabetes quando comparados com os dos grupos Ctrl VitDD e DM VitD. Foi demonstrado ainda que o aumento da expressão para  $\alpha$ -SMA cortical e medular foi progressivo nos animais do grupo VitDD ( $p < 0,05$ ) (Figura 17 e 18), sugerindo que a deficiência de VitD leva a uma maior propensão para o desenvolvimento e progressão da fibrose em ratos diabéticos.





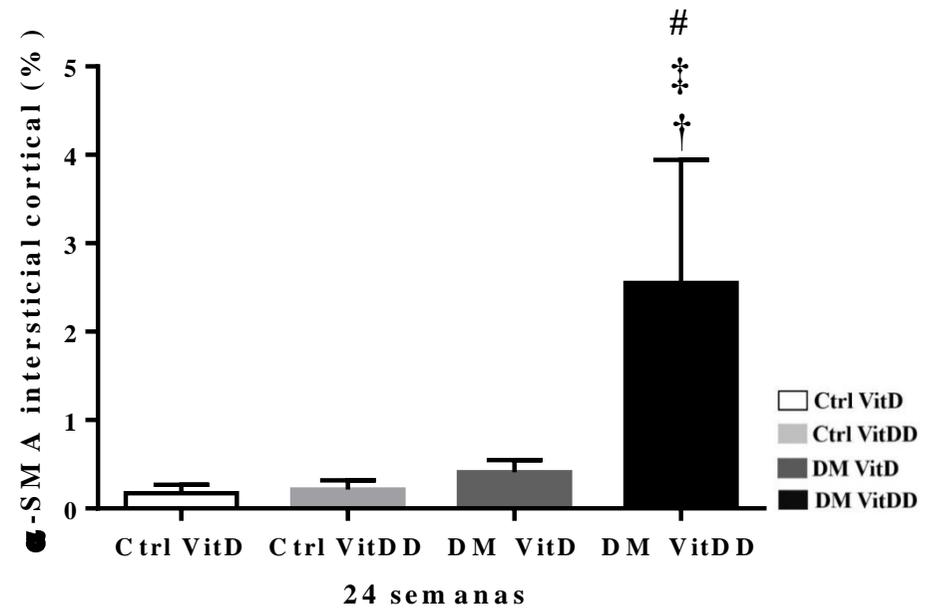
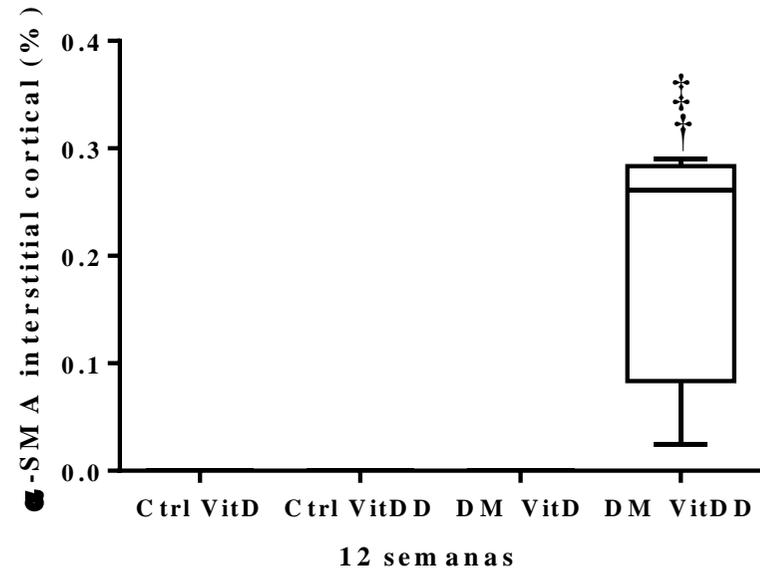
**Figura 15.** (A) Quantificação da área marcada e (B) imunolocalização para desmina em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM), deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. <sup>†</sup>*versus* Ctrl VitDD; <sup>‡</sup>*versus* DM VitD; <sup>#</sup>*versus* seu respectivo grupo de 12 semanas; n = 5/cada. Aumento 400x.

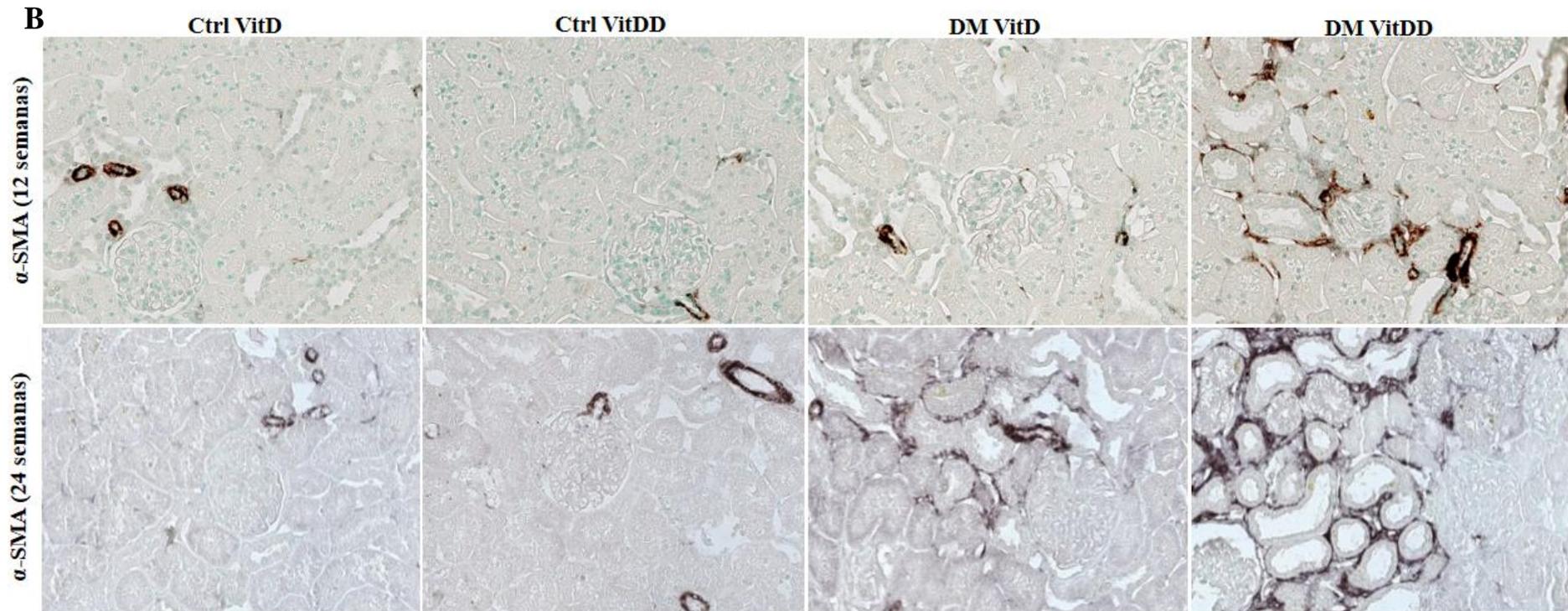




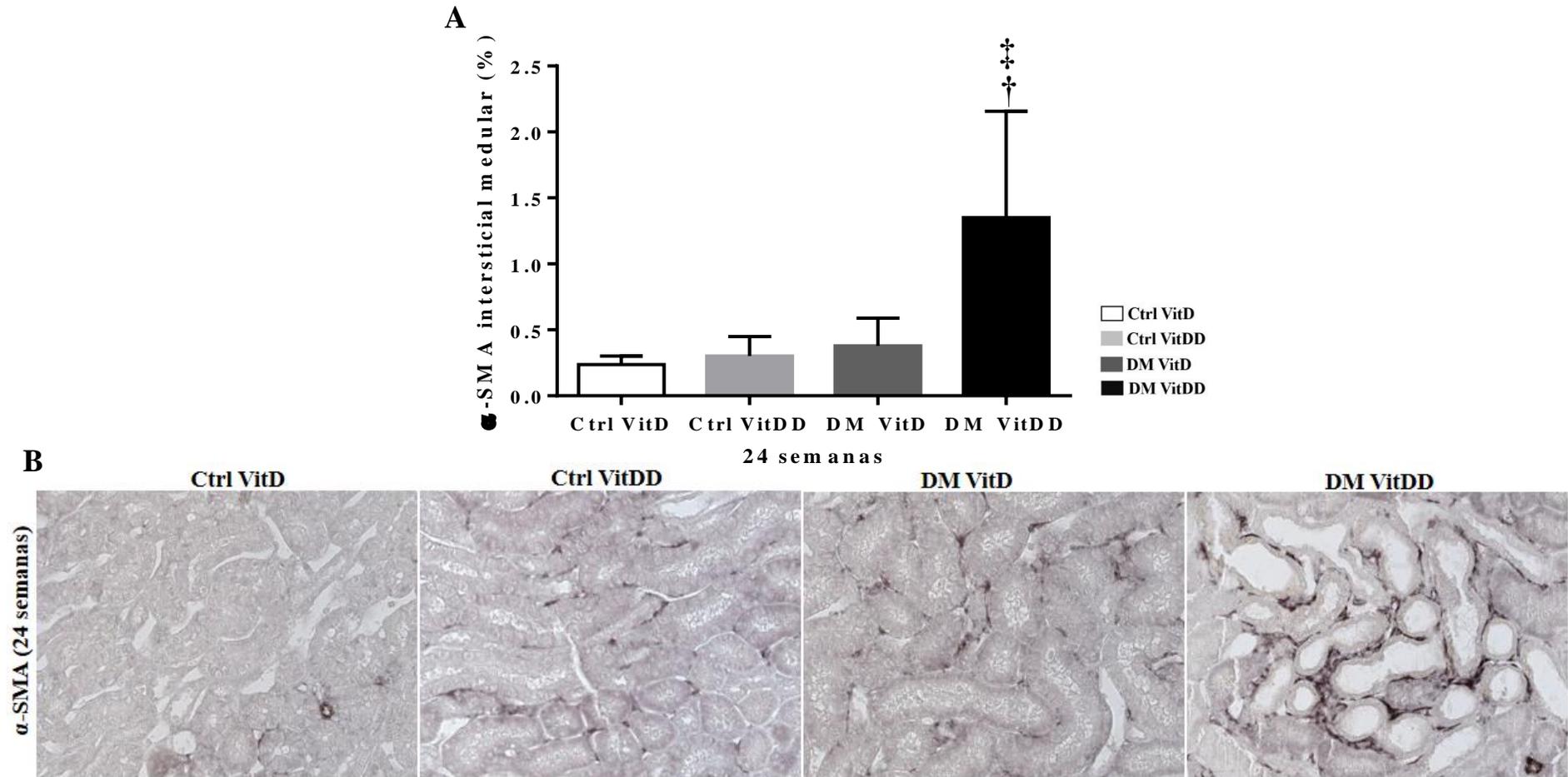
**Figura 16.** (A) Quantificação da área marcada e (B) imunolocalização para vimentina e para esse anticorpo em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM), deficientes em vitamina D (VitDD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. \**versus* Ctrl VitD; †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada. Aumento 400x.

A



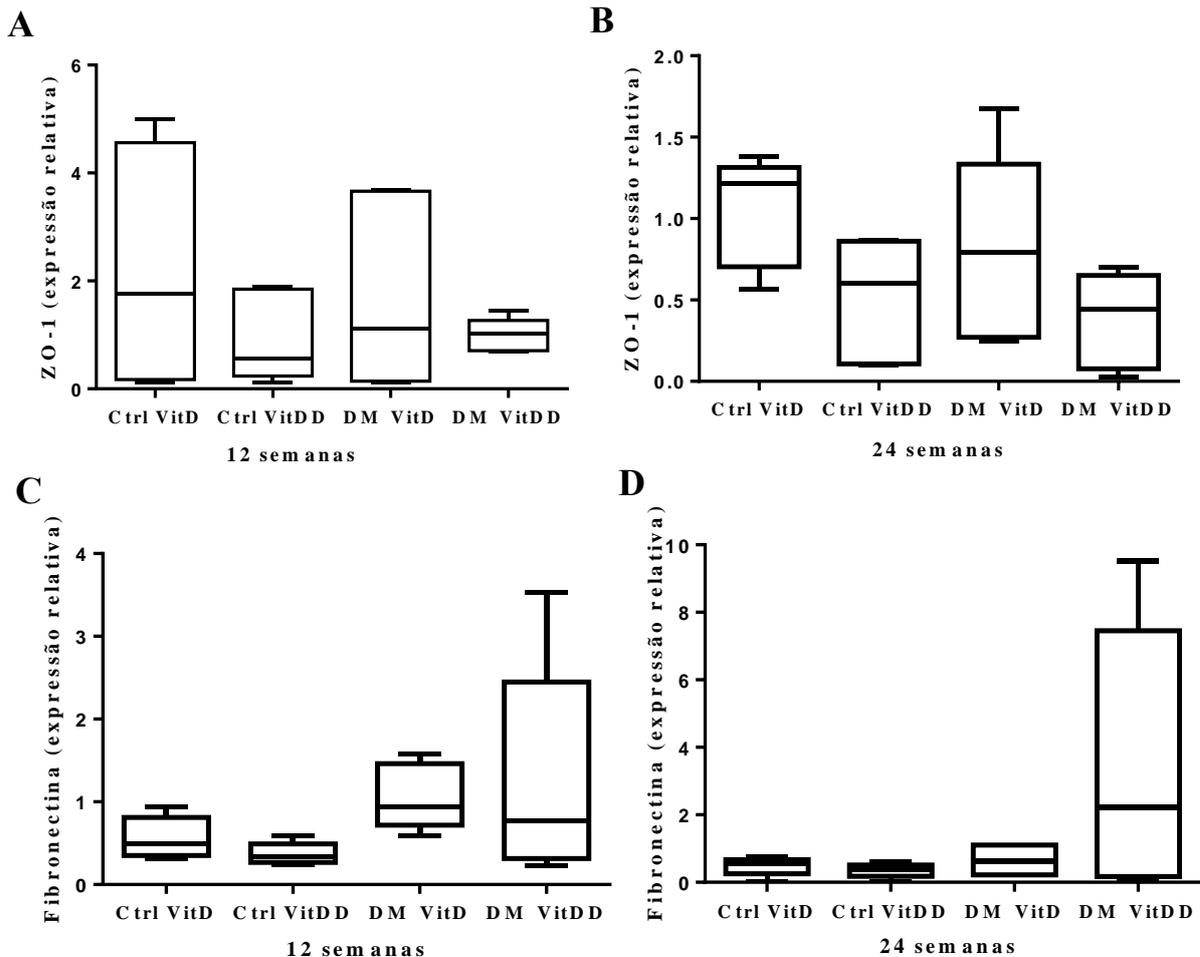


**Figura 17.** (A) Quantificação da área marcada e (B) imunolocalização no córtex renal para  $\alpha$ -SMA em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM), deficientes em vitamina D (VitDD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. <sup>†</sup>*versus* Ctrl VitDD; <sup>‡</sup>*versus* DM VitD; <sup>#</sup>*versus* seu respectivo grupo de 12 semanas; n = 5/cada. Aumento 400x.



**Figura 18.** (A) Quantificação da área marcada e (B) imunolocalização para  $\alpha$ -SMA em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) e diabéticos deficientes em vitamina D (VitDD) eutanasiados 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. <sup>†</sup>*versus* Ctrl VitDD; <sup>‡</sup>*versus* DM VitD; <sup>#</sup>*versus* seu respectivo grupo de 12 semanas; n = 5/cada. Aumento 400x.

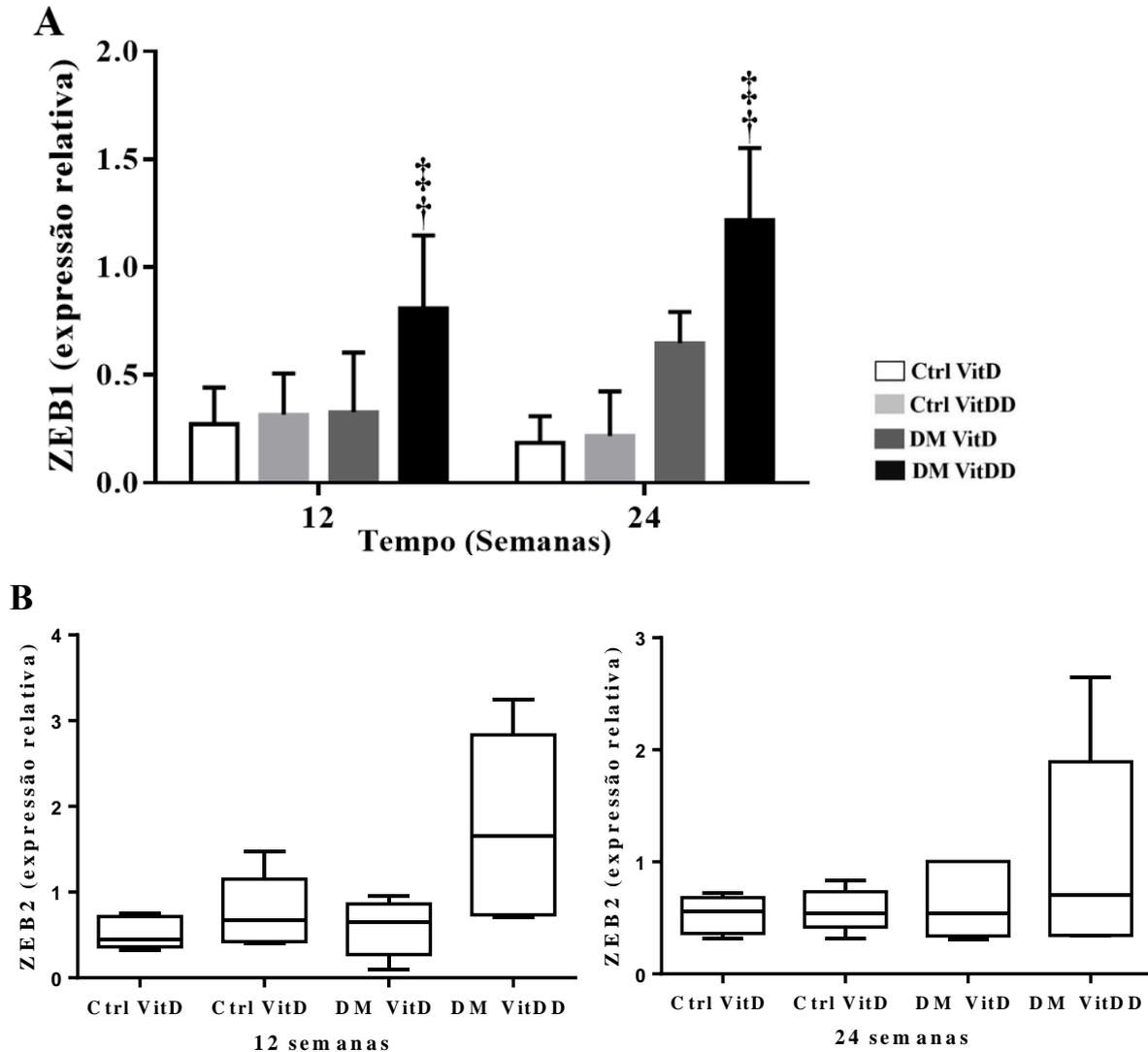
Associado ao aumento da expressão tecidual desses marcadores de TEM, nossos dados demonstraram tendência de redução da expressão gênica de ZO-1 (uma importante proteína do diafragma *slit*), ao passo que houve tendência de aumento da expressão gênica de fibronectina (considerada a primeira proteína de MEC a ser depositada no rim fibrótico) nos rins dos animais grupo DM VitDD quando comparado com os grupos Ctrl VitDD e DM VitD ( $p > 0,05$ ) (Figura 19A, B).



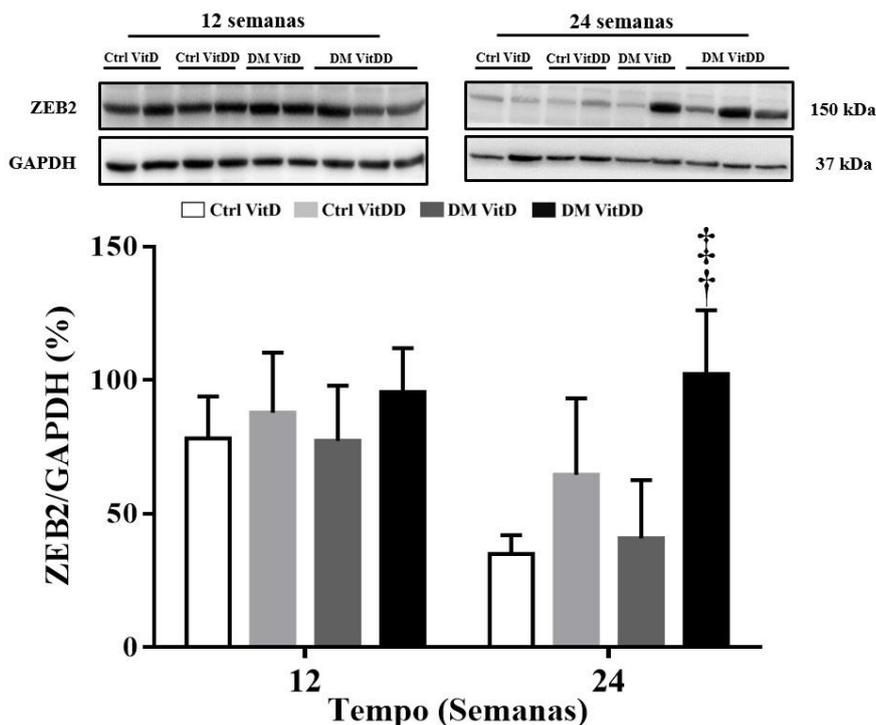
**Figura 19.** A e B, expressão relativa do mRNA para zona ocludens 1 (ZO-1); C e D, expressão relativa do mRNA para fibronectina; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD), eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo.  $n = 5$ /cada.

Considerando que nossos dados demonstraram evidente processo de TEM nos grupos dos animais diabéticos, sendo essas alterações mais intensas no grupo DM VitDD, avaliamos também a participação da via de sinalização ZEB1/ZEB2 nesse processo. Nossos dados demonstraram aumento significativo da expressão gênica de ZEB1 no grupo DM VitDD com 12 e 24 semanas ( $p = 0,01$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) após a

indução do diabetes quando comparado com os grupos Ctrl VitDD e DM VitD (Figura 20A). Embora não tenhamos observado aumento da expressão gênica de ZEB2 entre os grupos experimentais e nos diferentes tempos ( $p > 0,05$ ), nossos dados mostraram aumento da expressão proteica desse marcador no grupo DM VitDD com 24 semanas após a indução do diabetes quando comparados com os grupos Ctrl VitDD e DM VitD ( $p$

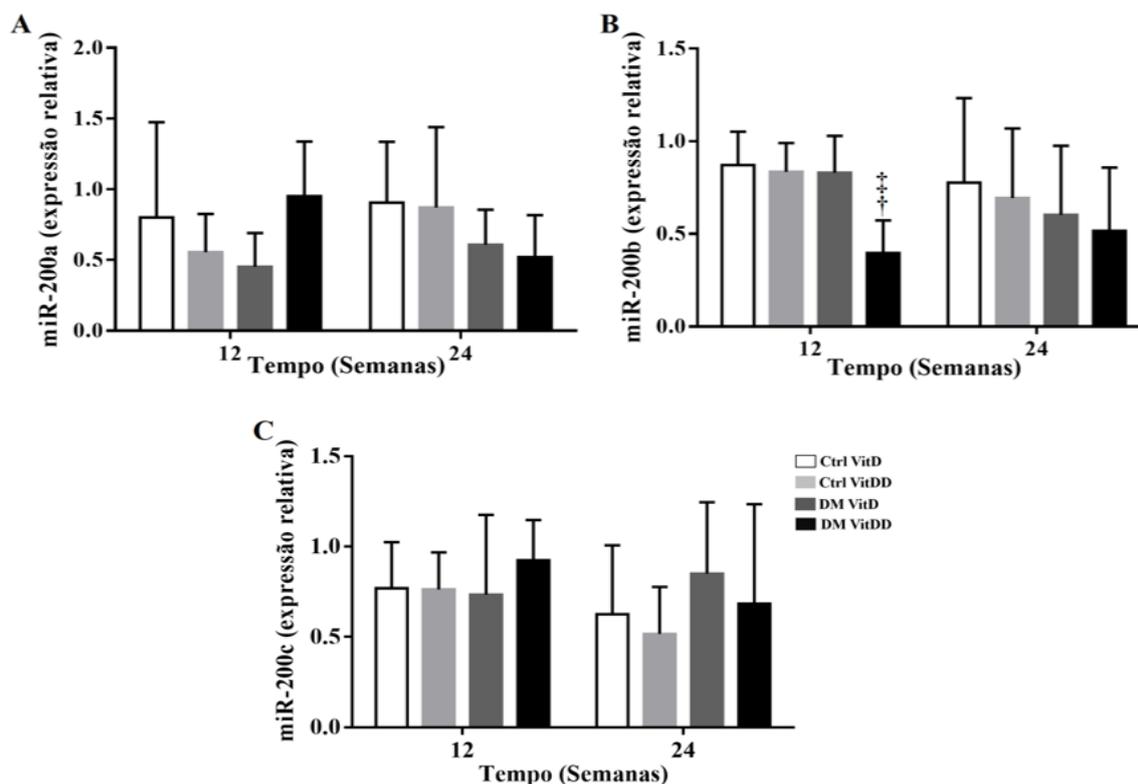


**Figura 20.** **A**, expressão relativa do mRNA para ZEB1; **B**, expressão relativa do mRNA para ZEB2; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. <sup>†</sup>versus Ctrl VitDD; <sup>††</sup>versus DM VitD;  $n = 5$ /cada.



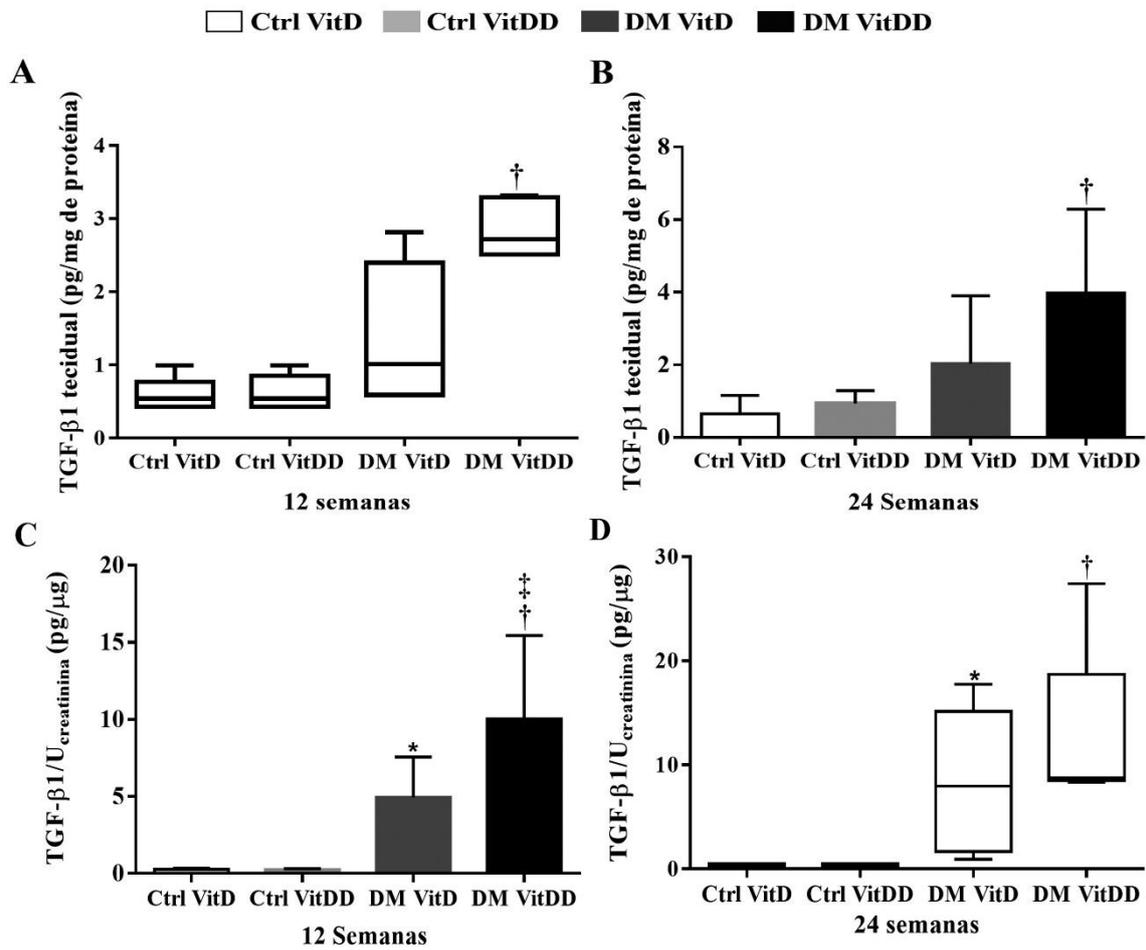
**Figura 21.** Imagem representativa e quantificação da expressão proteica de ZEB2. O resultado é expresso como razão densitométrica entre ZEB2 e GAPDH. <sup>†</sup>versus Ctrl VitDD; <sup>‡</sup>versus DM VitD; n = 5/cada.

ZEB1/ZEB2 são regulados epigeneticamente pela família de miR-200. As análises dos nossos dados demonstraram que houve significativa regulação negativa da expressão do miR-200b no grupo DM VitDD com 12 semanas ( $p = 0,0002$ ) e tendência de redução com 24 semanas ( $p > 0,05$ ) após a indução do diabetes quando comparado com os grupos Ctrl VitDD e DM VitD (Figura 22B). Não houve diferença estatística da expressão do miR-200a e miR-200c entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ) (Figura 22A, C).

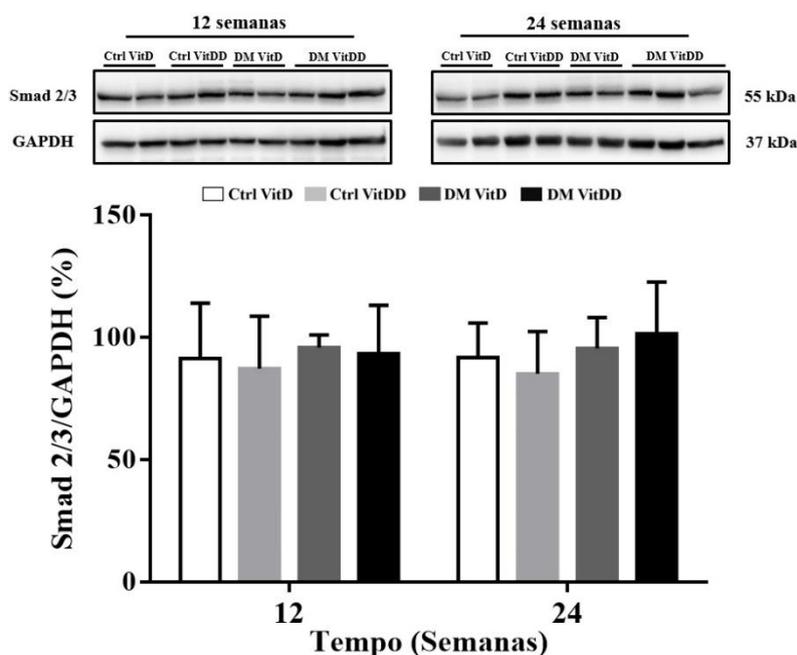


**Figura 22.** **A**, expressão relativa do mRNA para miR-200a; **B**, expressão relativa do mRNA para miR-200b; **C**, expressão relativa do mRNA para miR-200c; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM), deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada.

O TGF- $\beta$ 1 é considerado o principal indutor do processo de TEM via ZEB1/ZEB2 de forma dependente ou independente das proteínas Smads (Caja, Tan, 2019). Nossos dados demonstraram aumento significativo dos níveis teciduais de TGF- $\beta$ 1 no grupo DM VitDD com 12 e 24 semanas após a indução do diabetes quando comparado com o grupo Ctrl VitD ( $p < 0,004$ ;  $p = 0,01$ ; respectivamente) (Figura 23A, B). Nossos dados demonstraram ainda aumento significativo da excreção urinária de TGF- $\beta$ 1 nos ratos dos grupos DM VitD e DM VitDD com 12 e 24 semanas quando comparado com seus respectivos grupos controles ( $p = 0,0002$ ;  $p = 0,002$ ; respectivamente) (Figura 23C, D). Foi observado que a excreção urinária de TGF- $\beta$ 1 foi significativamente maior no grupo DM VitDD quando comparado com o grupo DM VitD com 12 semanas após a indução do diabetes ( $p = 0,0002$ ) (Figura 23C). Além disso, não foi demonstrado diferença estatística da expressão proteica de Smad2/3 entre os grupos experimentais tanto com 12 quanto com 24 semanas após a indução do diabetes ( $p > 0,05$ ;  $p > 0,05$ ; respectivamente) (Figura 24).



**Figura 23.** A e B, níveis teciduais de TGF- $\beta$ 1 corrigida pela concentração total de proteína do lisado de tecido renal; C e D, níveis urinários de TGF- $\beta$ 1 corrigido pelos níveis urinários de creatinina; de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. \**versus* Ctrl VitD; †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada.



**Figura 24.** Imagem representativa e quantificação da expressão proteica de Smad2/3. O resultado é expresso como razão densitométrica entre Smad2/3 e GAPDH. n = 5/cada.

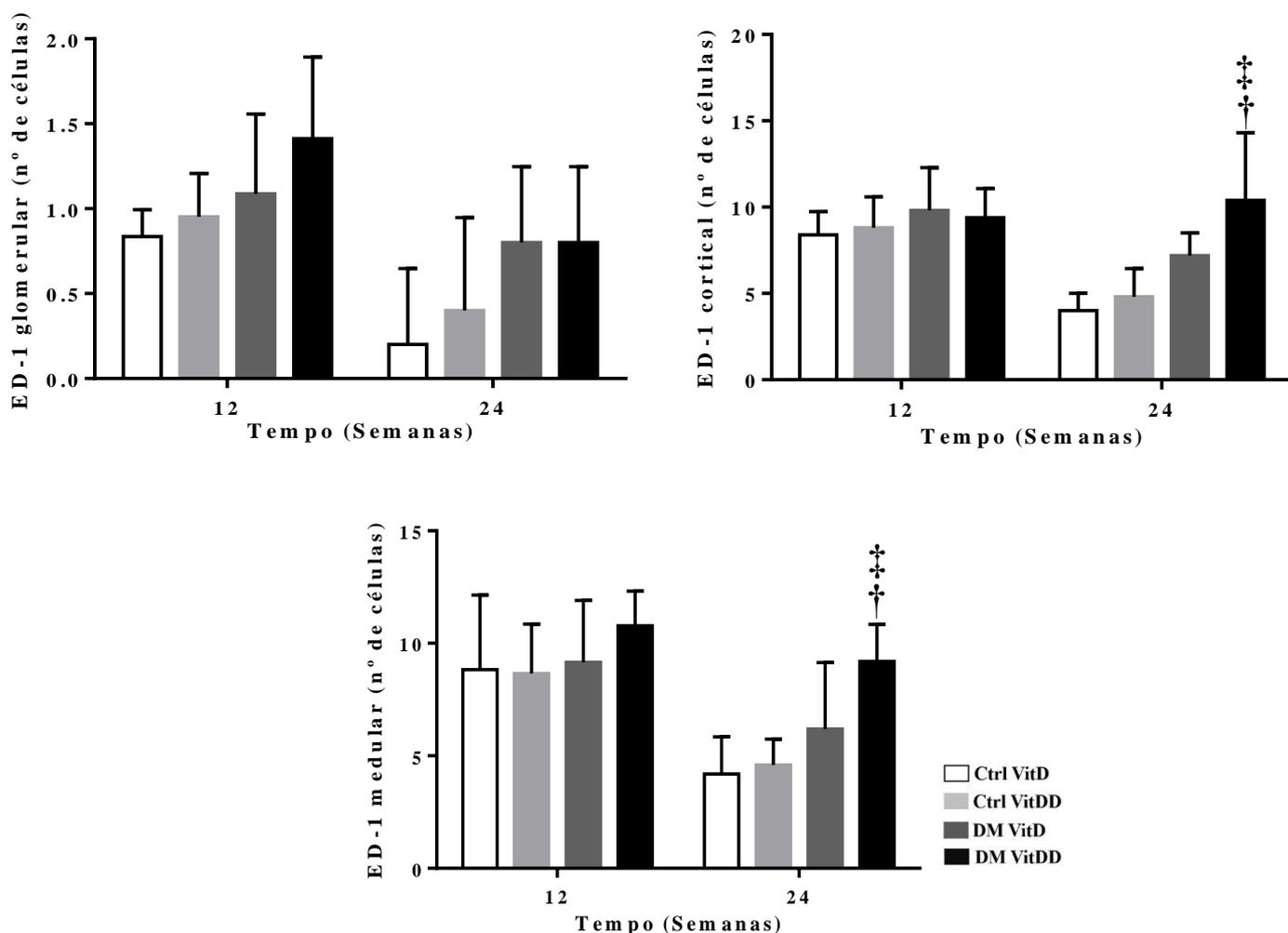
Quando agrupados, nossos dados de TEM mostram que a deficiência de VitD levou ao aumento dos níveis teciduais e da excreção urinária de TGF- $\beta$ 1 e à regulação negativa do miR-200b nos animais diabéticos já com 12 semanas após a indução do diabetes e isso provavelmente contribuiu para o aumento da expressão gênica de ZEB1 e ZEB2 e consequente aumento das expressões de desmina, vimentina e  $\alpha$ -SMA observadas em nosso estudo.

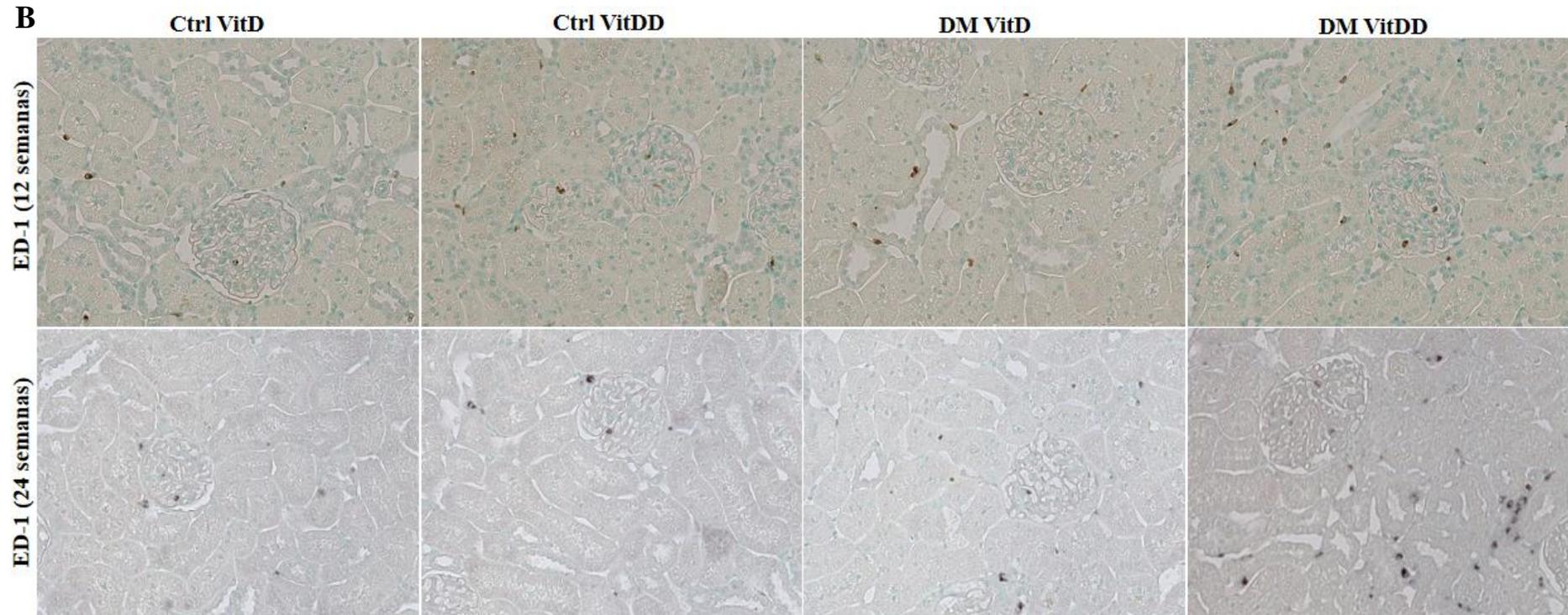
### 5.5 Influência da deficiência de VitD nas células endoteliais e inflamação durante a progressão da Nefropatia Diabética

Por muito tempo a ND não foi considerada como uma doença inflamatória, no entanto, estudos recentes têm mostrado que o recrutamento de células imunes e o consequente aumento da inflamação estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da ND e isso se deve muito em parte a disfunção endotelial e ao processo de TEM (Vietinghoff et al., 2011; Seo et al., 2015). Nesse sentido, nossos achados demonstraram aumento da inflamação cortical e medular, evidenciado pelo aumento do número de células ED-1 positivas (marcador de monócitos e macrófagos) no grupo DM VitDD com 24 semanas após a indução do diabetes comparado aos grupos Ctrl VitDD e DM VitD ( $p = 0,002$ ;  $p = 0,004$ ; respectivamente) (Figura 25A, B). Além disso, nossos achados

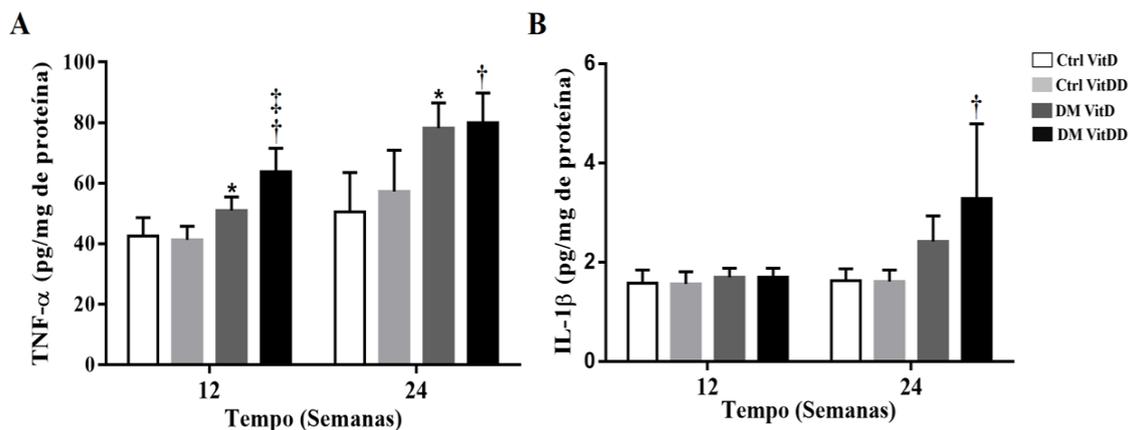
mostraram aumento dos níveis teciduais de TNF- $\alpha$  (principal citocina pró-inflamatória) nos grupos DM VitD e DM VitDD com 12 e 24 semanas após a indução do diabetes quando comparado com seus respectivos grupos controles ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,001$ , respectivamente) (Figura 26A). Entretanto, com 12 semanas, os níveis de TNF- $\alpha$  foi maior no grupo DM VitDD em relação ao grupo DM VitD ( $p < 0,0001$ ) (Figura 26A). O grupo DM VitDD apresentou ainda níveis teciduais aumentado de IL-1 $\beta$  com 24 semanas após a indução do diabetes quando comparado com o grupo Ctrl VitDD ( $p = 0,03$ ) (Figura 26B).

**A**



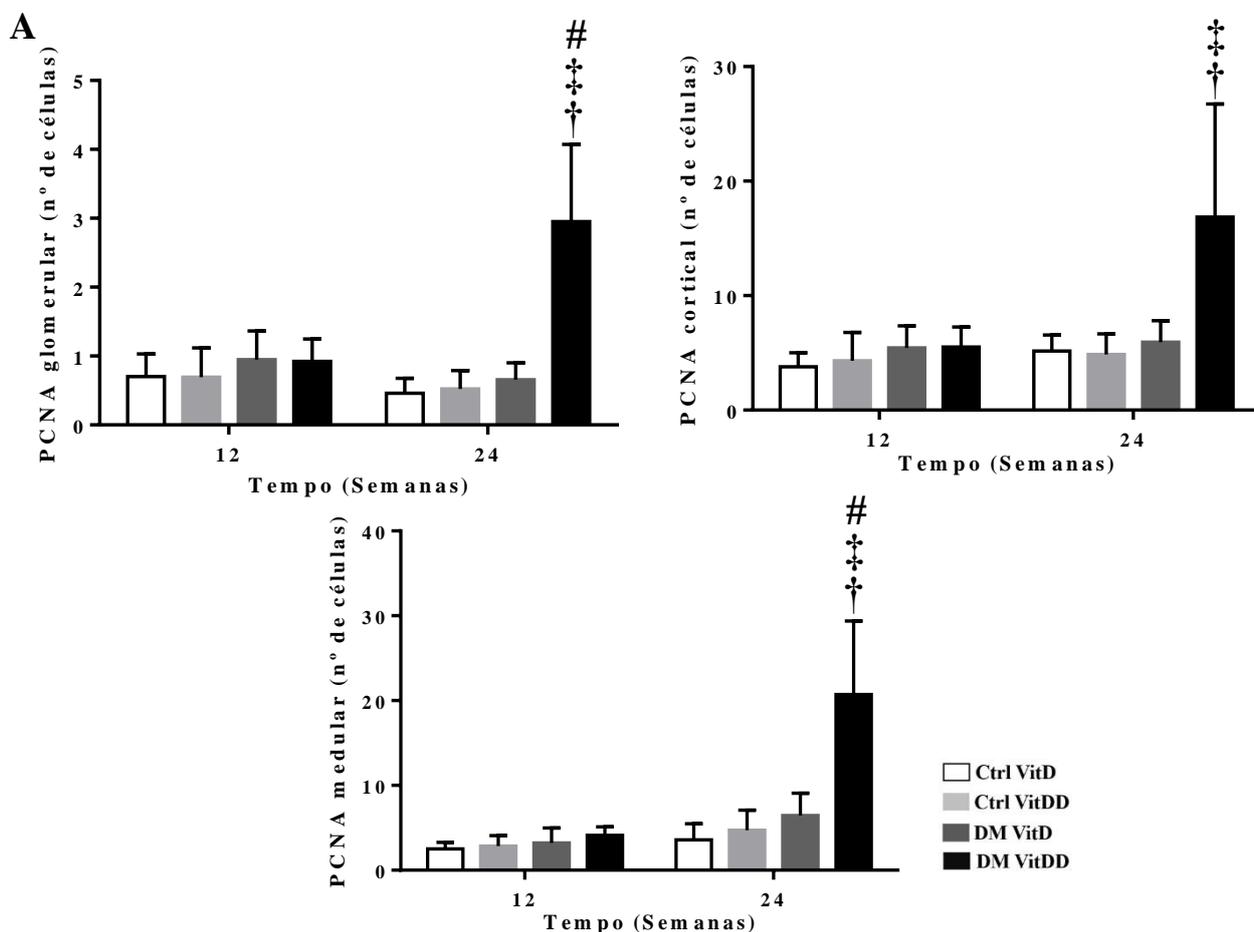


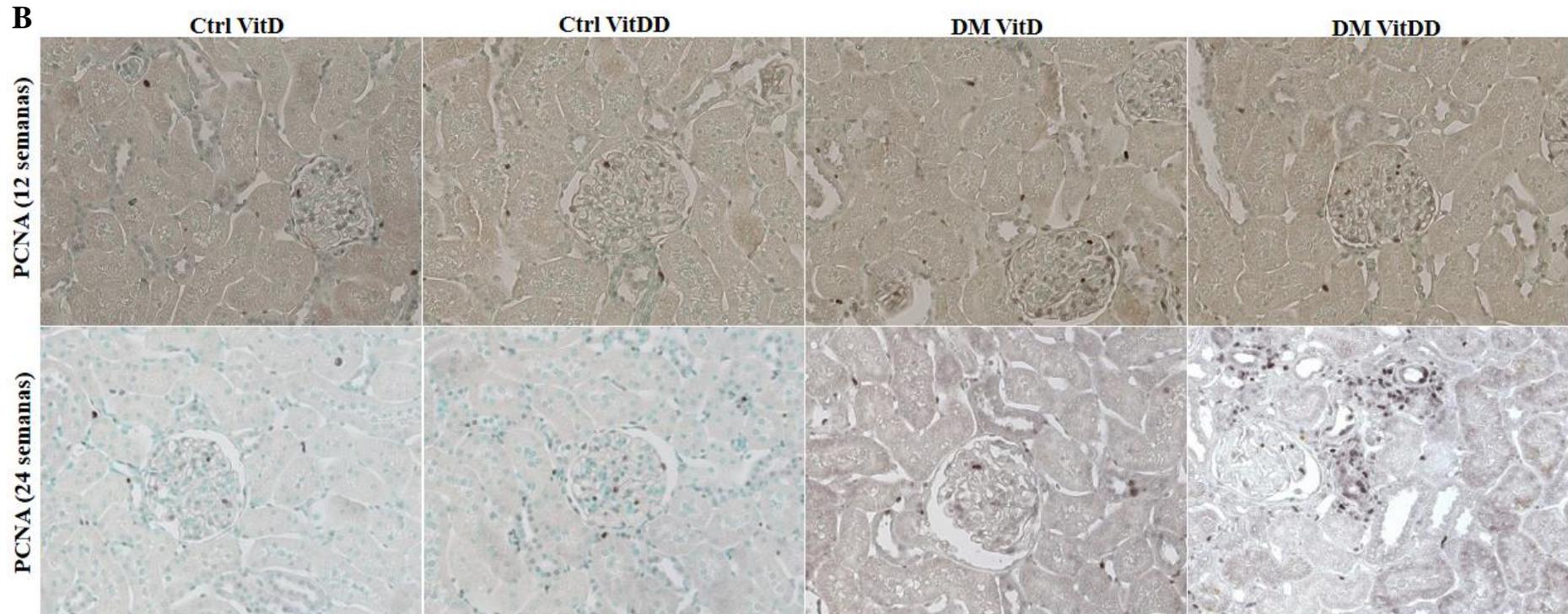
**Figura 25.** (A) Quantificação expressa como número (nº) de células marcadas e (B) imunolocalização cortical para células ED-1 positivas em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. \**versus* Ctrl VitD; †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada. Aumento 400x.



**Figura 26.** (A) níveis teciduais de TNF- $\alpha$  e (B) níveis teciduais de IL-1 $\beta$ , corrigido pela concentração total de proteína do lisado de tecido renal de ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada.

Associado a inflamação, foi demonstrado aumento da proliferação celular (determinada pelo número de células PCNA positivas) glomerular, cortical e medular no grupo DM VitDD com 24 semanas após a indução do diabetes quando comparado aos grupos Ctrl VitDD e DM VitD (p = 0,001; p = 0,03; p = 0,01; respectivamente) (Figura 27A, B).

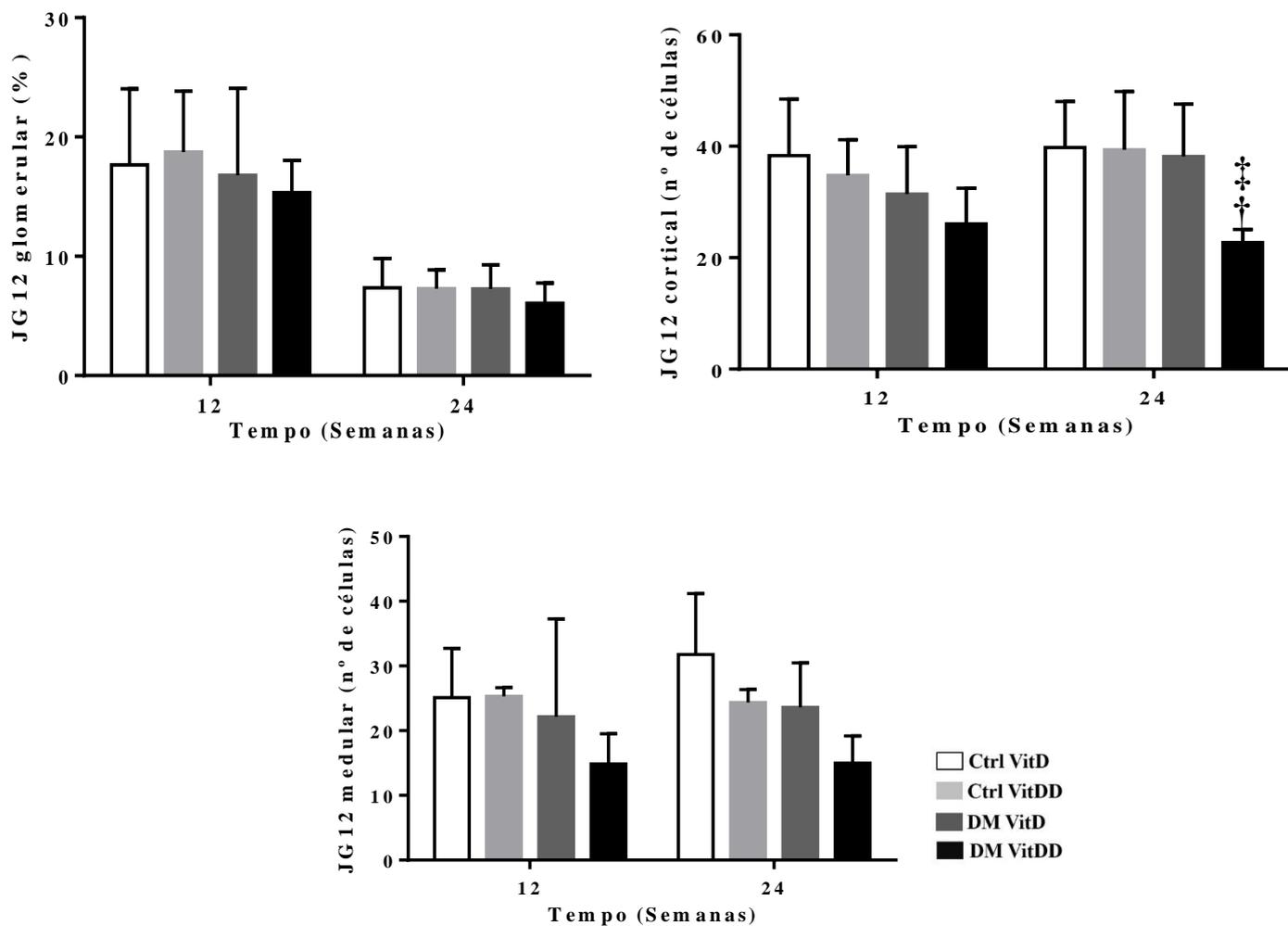


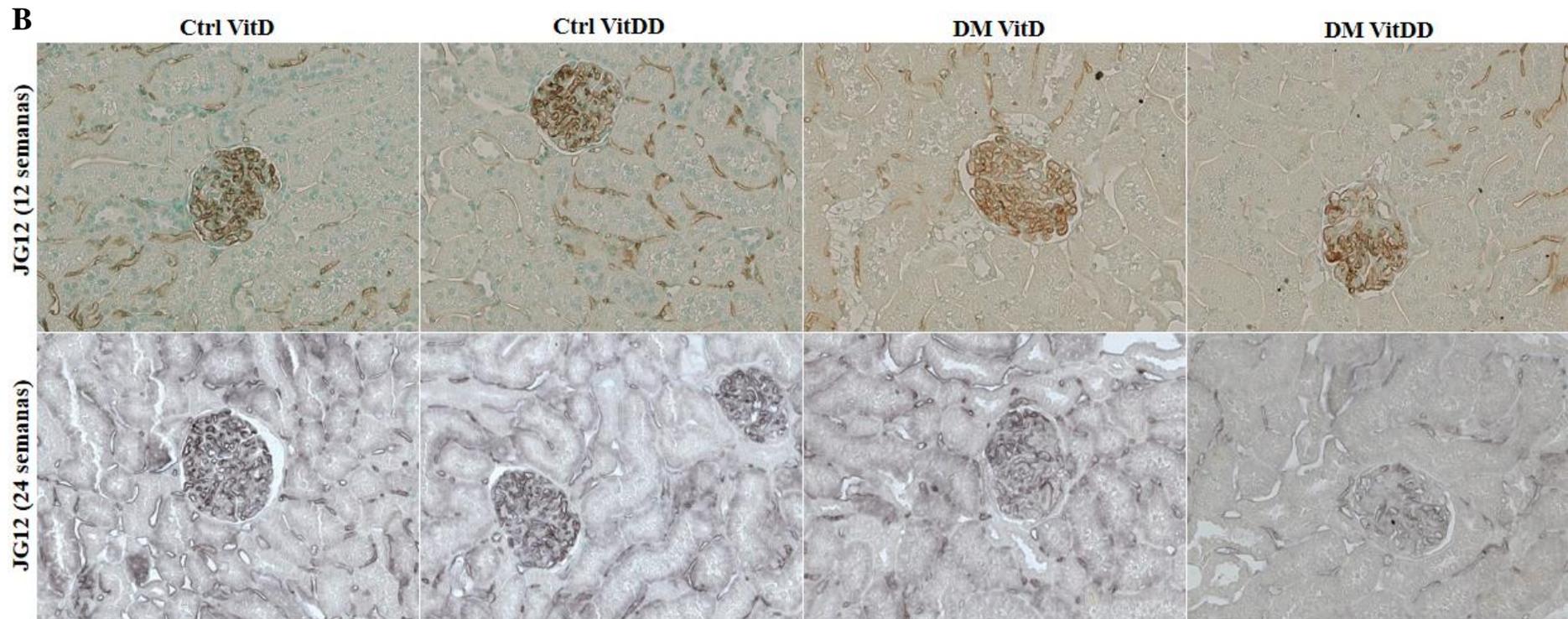


**Figura 27.** (A) Quantificação expressa como número (n°) de células marcadas e (B) imunolocalização glomerular e cortical para células PCNA positivas em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. <sup>†</sup>*versus* Ctrl VitDD; <sup>‡</sup>*versus* DM VitD; n = 5/cada. Aumento 400x.

Análises por imuno-histoquímica evidenciaram também redução significativa do número de células positivas para JG12 (marcador de capilares endoteliais e peritubulares) no córtex e na medula renal, evidenciando um menor número de vasos nessa região nos rins dos animais do grupo DM VitDD 24 semanas após a indução do diabetes em relação aos animais dos grupos Ctrl VitDD e DM VitD ( $p = 0,01$ ) (Figura 28).

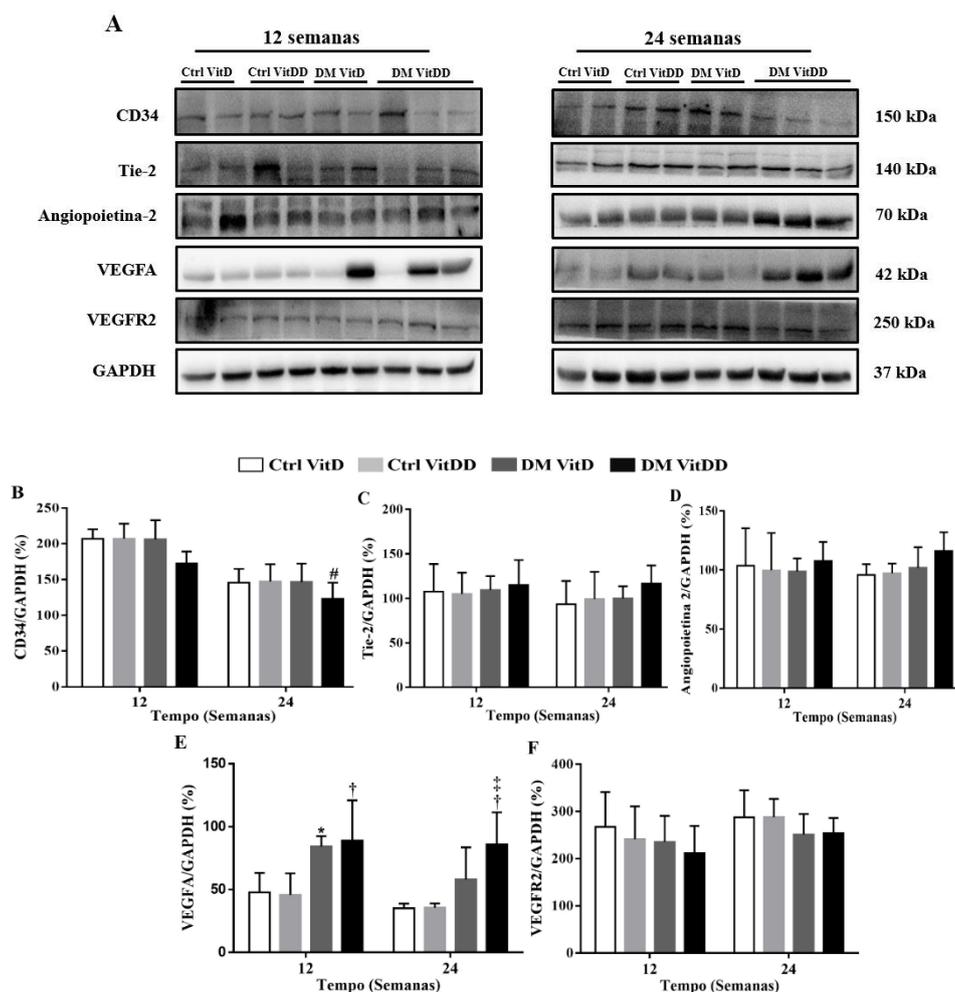
A





**Figura 28.** (A) Quantificação expressa como porcentagem da área marcada para JG12 (glomérulo) e número (nº) de células JG12 positivas (córtex e medula) e (B) imunolocalização glomerular e cortical para células JG12 positivas em ratos controles (Ctrl) e diabéticos (DM) deficientes em vitamina D (VitDD) ou não (VitD) eutanasiados 12 e 24 semanas após a indução do diabetes ou injeção de veículo. \**versus* Ctrl VitD; †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada. Aumento 400x.

Com 24 semanas após indução do diabetes houve redução significativa da expressão proteica de CD34 (marcador endotelial) no córtex renal dos animais do grupo DM VitDD quando comparado com seu respectivo grupo de 12 semanas ( $p < 0,05$ ) (Figura 29A, B). Foi demonstrado também aumento da expressão proteica do VEGF-A nos animais dos grupos DM VitD e DM VitDD com 12 semanas após a indução do diabetes quando comparado aos seus respectivos grupos controles ( $p = 0,004$ ) (Figura 29A, E). Vinte e quatro semanas após a indução do diabetes a expressão proteica para o VEGF-A permaneceu aumentada no grupo DM VitDD quando comparado com os animais dos grupos Ctrl VitD e DM VitD ( $p = 0,001$ ) (Figura 29A, E). Portanto, esses dados mostram que a deficiência de VitD provocou uma disfunção endotelial que pode ter contribuído para o aumento da inflamação observado em nosso estudo. Não foi observada diferença estatística para Tie-2, Angpt-2 e VEGFR2 entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ) (Figura 29A, C, D, F).



**Figura 29.** A, Imagem representativa dos resultados obtidos da expressão proteica de CD34, Tie-2, Angiopoietina-2, VEGFA e VEGFR2. B, C, D, E, F representa a razão densitométrica entre CD34, Tie-2, Angiopoietina-2, VEGFA e VEGFR2 e GAPDH (respectivamente). \**versus* Ctrl VitDD; †*versus* Ctrl VitDD; ‡*versus* DM VitD; n = 5/cada.

# Discussão

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a influência da deficiência de VitD na progressão da lesão renal em ratos com diabetes tipo 1 e a participação da TEM e da desestabilização endotelial nesse processo. Nossos resultados demonstraram que os ratos diabéticos deficientes em VitD apresentam aumento das alterações estruturais renais, declínio da função renal, desestabilização endotelial, aumento da inflamação e da expressão dos marcadores de transdiferenciação nas diferentes células renais em comparação com ratos diabéticos suficientes em VitD. Essas alterações foram evidenciadas pelo aumento da expressão de desmina, vimentina e  $\alpha$ -SMA nos diferentes compartimentos renais nos ratos do grupo DM VitDD. Associado a isso, foi notado aumento da infiltração de células inflamatórias, proliferação celular e redução do número de capilares peritubulares, evidenciado pela expressão tecidual de células ED-1, PCNA e JG12 positivas, respectivamente. O aumento da expressão desses marcadores, está associado ao aumento dos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , teciduais e urinários do TGF- $\beta$ 1, expressão gênica do ZEB1, expressão proteica do VEGF-A e ZEB2, e regulação negativa do miR-200b observados em nosso estudo e de forma mais evidente nos ratos diabéticos deficientes em VitD.

A presença da deficiência de VitD nos ratos alimentados com dieta livre de VitD foi demonstrada pelos baixos níveis séricos de 25(OH)D nos ratos dos grupos Ctrl VitDD e DM VitDD. A 25(OH)D tem um tempo de meia vida mais longo, cerca de 3 semanas, e é a forma da VitD em maior quantidade no organismo, por isso é considerada a molécula mais sensível para análise dos níveis circulantes desse hormônio no organismo (Xiao et al., 2016). Além disso, geralmente, na deficiência de VitD são observados níveis séricos aumentados de PTH o que estimula a produção compensatória de VitD pelas células do túbulo proximal renal, podendo levar uma quantificação inadequada dos níveis de VitD (Makitaipale et al., 2020). Altos níveis de PTH estimulam ainda o aumento da concentração sérica de  $\text{Ca}^+$  (por em associação com a VitD aumentar a reabsorção intestinal desse íon) e diminuição de  $\text{P}^+$  no organismo (neste caso por aumentar diretamente a excreção renal deste íon) (Lam et al., 2015; Makitaipale et al., 2020). Apesar dos baixos níveis de VitD nos ratos dos grupos Ctrl VitDD e DM VitDD, não foram observadas diferenças entre os níveis de PTH sérico,  $\text{Ca}^+$  e  $\text{P}^+$  plasmático entre os grupos experimentais em nosso estudo.

Estudos clínicos e experimentais têm relatado o aumento da prevalência de hipertensão associada a deficiência de VitD (Andersen et al., 2015; Darraj et al., 2019). Já está bem estabelecido que o aumento da expressão de todos os componentes e superativação do SRAA contribui para o desenvolvimento e progressão da ND e que a VitD exerce efeito inibitório sobre esse sistema (Chokhandre et al., 2015; Lin et al., 2018; Liyanage et al., 2018). Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram que ratos com ND (Volpini et al., 2003) e que a prole adulta de mães submetidas à deficiência de VitD durante a gestação e período de desenvolvimento renal (Almeida et al., 2019) apresentavam aumento da pressão arterial, no entanto, em nosso estudo essa alteração não foi observada. Almeida et al. (2019) demonstraram ainda que a hipertensão observada nos animais deficientes em VitD estava relacionada ao aumento da expressão tecidual renal de renina e do receptor para a angiotensina II do tipo 1 (AT1) e dos níveis séricos de angiotensina II. Andersen et al. (2015) demonstraram que a depleção de VitD levou ao aumento da expressão renal endógena e humana do mRNA da renina em ratos dTGR (ratos duplo-transgênicos que expressam renina e angiotensinogênio humano) e aumento da hipertensão nesse modelo experimental. Bragança et al. (2018) também observaram aumento da expressão tecidual renal de angiotensinogênio e dos níveis plasmáticos de aldosterona e da pressão arterial em ratos nefrectomizados deficientes em VitD. Esses estudos mostram, portanto, a importante participação da VitD na regulação do SRAA e nas lesões renais induzidas pela hipertensão.

Nossos dados demonstraram ainda que na vigésima quarta semana após a indução do diabetes houve redução da expressão renal do VDR nos grupos Ctrl VitD e DM VitDD. Estudos em diferentes modelos de doença renal também verificaram redução da expressão do VDR na deficiência de VitD (Gonçalves et al., 2014; Bragança et al., 2018; Song et al., 2021). Esses estudos demonstraram que a redução da expressão do VDR estava relacionada ao aumento da expressão tecidual do TGF- $\beta$ 1 e com a fibrose túbulo-intersticial em ratos com injúria renal induzida por isquemia e reperfusão (Gonçalves et al., 2014) e com as lesões glomerulares em cultura de células submetidas a alta glicose em ratos com ND (Song et al., 2021). Adicionalmente, Zhang et al. (2015) demonstraram que a deleção do VDR foi crucial para o aumento das lesões estruturais e funcionais renais em camundongos com OUU.

O aumento da TFG, excreção urinária de albumina progressiva e da FECa<sup>+</sup> e FEP<sup>+</sup> nos ratos diabéticos observados em nosso estudo são características marcantes dos estágios iniciais da ND. Essas alterações foram mais intensas no grupo DM VitDD. A hipovitaminose D foi frequentemente relacionada ao desenvolvimento de microalbuminúria (Felicio et al., 2016), diminuição sustentada da função renal em pacientes com DM1 (Boer Sachs, Cleary, 2012) e com o aumento da prevalência de pacientes com ND (Diaz et al., 2009; Jung et al., 2016; Huang, Wen, Ye, 2022). A superativação local do SRAA tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da TFG e microalbuminúria em pacientes diabéticos deficientes em VitD (Chokhandre et al., 2015). Adicionalmente, estudos clínicos e experimentais demonstraram que o aumento da albuminúria está associado às alterações das proteínas estruturais dos glomérulos renais e da permeabilidade glomerular causada pela hiperglicemia associados ou não a deficiência de VitD (Ito et al., 2015; Saleh et al., 2016; Manucha, Juncos, 2017).

As alterações na estrutura renal observadas em nosso estudo foram caracterizadas pela presença de hipertrofia glomerular, expansão mesangial e aumento da área intersticial relativa nos ratos diabéticos com 24 semanas. A ND desenvolve-se de forma lenta e progressiva, o que justifica o aparecimento de lesões estruturais mais acentuadas apenas na 24<sup>a</sup> semana após a indução do diabetes, sendo essas alterações mais evidentes no grupo DM VitDD. Estudos anteriores também demonstraram que a deficiência de VitD foi associada à hipertrofia glomerular e aumento da área intersticial relativa observada na progressão para a DRC após lesão renal por isquemia e reperfusão (Gonçalves et al., 2014), em ratos nefrectomizados (Bragança et al., 2018) e em pacientes com DM1 (Boer, Sachs, Cleary, 2012). A fibrose glomerular e túbulo-intersticial são características marcantes da DRC e estão extremamente ligadas ao declínio da função renal independente da doença subjacente (Lucisano et al., 2013), assim, nossos dados de alterações estruturais podem, pelo menos em parte, explicar as alterações funcionais observadas em nosso estudo.

O aumento da expressão tecidual de desmina glomerular, vimentina tubular e  $\alpha$ -SMA intersticial representam a ativação de fibroblastos locais em miofibroblastos e caracterizam a TEM, que continua como um dos principais processos que levam à deposição anormal de MEC no rim diabético (Singh et al., 2018). O podócito é um

componente essencial da barreira de filtração glomerular. Foi demonstrado que a sua perda levou a proteinúria e a glomeruloesclerose progressiva em um modelo de DRC induzida pela puromicina (Herrmann, Tozzo, Funk, 2012) e em animais e pacientes diabéticos (Ito et al., 2015; Zhang et al., 2015; Saleh et al., 2016). A vimentina quando expressa contribui para o espessamento da membrana basal tubular e consequente fibrose túbulo-intersticial (Makino et al., 2003). A  $\alpha$ -SMA, por sua vez, está associada ao aumento da proliferação dos fibroblastos e acúmulo de matrix extracelular intersticial (Hua et al., 2020). Assim como em nossos achados, estudos anteriores também demonstraram que a deficiência de VitD provoca aumento da expressão de marcadores de TEM em diferentes modelos de DRC (Bragança et al., 2018; Gonçalves et al., 2020; Bernardo et al., 2022). Bragança et al. (2018) e Bernardo et al. (2022) demonstraram ainda que o acúmulo de proteínas da MEC renal estava associado ao aumento da proliferação celular, ativação de macrófagos túbulo-intersticiais e rarefação capilar glomerular em ratos nefrectomizados e em ratos obesos com injúria por isquemia e reperusão deficientes em VitD, respectivamente. Contudo os mecanismos pelos quais a depleção de VitD leva a ativação desse processo, especialmente na progressão da ND foram pouco estudados. Em nosso estudo, investigamos também a via relacionada aos fatores de transcrição nuclear ZEB1/ZEB2, importantes indutores da TEM.

Estudos demonstraram que o aumento significativo da expressão gênica e proteica de ZEB1/ZEB2 estava associado a redução da expressão de E-caderina (marcador epitelial de junção célula-célula) e ao aumento da TEM em cultura de células tubulares renais proximais e em ratos com OUU (Xiong et al., 2012; Pu, Zhang, Zhou, 2016), em células glomerulares da prole adulta de ratas submetidas a uma dieta materna pobre em proteínas (Sene et al., 2014) e de camundongos diabéticos (Wei et al., 2014), de forma dependente ou não da ativação de ZEB1/ZEB2 pelo TGF- $\beta$ 1. Até a presente data, não foram encontrados estudos mostrando a relação entre a deficiência de VitD e ZEB1/2 na doença renal diabética. No entanto, foi demonstrado que o tratamento com VitD diminuiu indiretamente a transcrição de ZEB1/ZEB2, promovendo, entre outros benefícios, o bloqueio da aquisição de um fenótipo mesenquimal e inibição da proliferação celular durante a progressão do câncer de cólon (Pereira et al., 2012) e atenuou a expressão de ZEB1/ZEB2 contribuindo para a supressão da metástase em cultura de células de carcinoma de mama humano (Chiang et al., 2016). Além da sua contribuição para a TEM, foi demonstrado ainda que a superexpressão de ZEB1/ZEB2

regulou positivamente a expressão do VEGF-A e a angiogênese em diferentes tipos de câncer (Liu et al., 2016; Ko, Kim, 2018). Nesse contexto, além do envolvimento na regulação da TEM, ZEB1/ZEB2 podem contribuir para a regulação da angiogênese aumentando os níveis do VEGF-A.

O VEGF-A é produzido majoritariamente pelos podócitos, mas pode ser secretado também pelas células epiteliais tubulares e atua regulando a estrutura e função das células endoteliais adjacentes, ligando-se aos seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 presentes nessas células (Fu et al., 2015; Gil et al., 2021; Jiang et al., 2022). Estudos clínicos e experimentais demonstraram que níveis aumentados de VEGF-A estão especialmente presentes nos estágios iniciais da ND (Fu et al., 2015; Gil et al., 2021; Jiang et al., 2022). Nesse sentido, foi demonstrado que a superexpressão específica do VEGF-A por podócitos e aumento da ativação do VEGFR2 contribuiu para a angiogênese anormal, inflamação e alterações na função e estrutura renal nos estágios iniciais da ND em camundongos diabéticos (Veron et al., 2011; Dessapte-Baradez et al., 2014). Bus et al. (2017) demonstraram que o aumento da expressão do VEGF-A por si só levou a ativação das células endoteliais e aumento da expressão renal de TNF- $\alpha$  e proteínas quimiotáticas para macrófagos/monócitos em cultura de células e camundongos com diabetes tipo 1.

Embora o sistema VEGF-A/VEGFR2 sozinho possa desempenhar essas funções, estudos indicam que suas ações são potencializadas pela capacidade do VEGF-A em elevar os níveis de outros fatores pró-angiogênicos, como Angpt-2 (Dessapte-Baradez et al., 2014; Fu et al., 2015). As angiopietinas englobam outra família de fatores de crescimento vascular e foi demonstrado que a redução do raio angiopietina 1/angiopietina 2 (Angpt-1/Angpt-2) associada ao aumento dos níveis renais de VEGF-A intensifica o desenvolvimento da ND (Nakagawa et al., 2009). Em concordância com esses achados, Yamamoto et al. (2004) demonstraram que o aumento dos níveis do VEGF-A levou ao aumento dos níveis de Angpt-2, redução do raio Angpt-1/Angpt-2, redução da expressão de Tie2 e angiogênese anormal em camundongos com DM1. Níveis elevados de Angpt-2 induzem ainda a expressão de moléculas quimiotáticas e permeabilidade do endotélio, eventos importantes para a resposta inflamatória renal (Akwii et al., 2019). A Angpt-2 está envolvida ainda no recrutamento de macrófagos/monócitos, que contribuem para amplificação da produção de fatores pró-

angiogênicos e desestabilização dos capilares glomerulares e peritubulares renais (Jeong et al., 2021). Tsai et al. (2018) demonstraram que altos níveis de Angpt-2 foram responsáveis pelo aumento da inflamação, perda de pericitos e apoptose em cultura de células mesangiais submetidas a altos níveis de glicose, e que o aumento dos níveis séricos de Angpt-2 apresentou correlação positiva com o aumento da albuminúria em camundongos db/db (animais que desenvolvem obesidade e DM2 espontaneamente) e pacientes com DM2.

A regulação pós-transcricional do mRNA de juntos ZEB1/ZEB2 e o VEGF-A é realizada pelo miR-200b (Xiong et al., 2012; Sun et al., 2017). Nesse contexto, foi constatado que a regulação negativa do miR-200b está associada ao aumento da produção do VEGF-A e a permeabilidade vascular em cultura de células endoteliais de retina bovina submetidas a altos níveis de glicose e em tecido retiniano de ratos com DM1 induzido por STZ (Ruiz, Feng, Chakrabarti, 2015) e em pacientes diabéticos (McArthur et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que a regulação negativa de todos os membros da família miR-200 levou ao aumento da TEM induzida por TGF- $\beta$ 1 em cultura de células epiteliais tubulares renais e em ratos com OUU (Xiong et al., 2012; Pu, Zhang, Zhou, 2016) e à TEM em glomérulos isolados de ratos adultos programados submetidos a uma dieta materna com baixo teor de proteína (Sene et al., 2014). Além disso, estudos clínicos demonstraram que biópsias de tecido renal de pacientes com diferentes doenças renais crônicas, incluindo a ND, apresentam expressão diminuída de miR-200 (Chien et al., 2016).

# Conclusão

## 7. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos resultados demonstraram que a deficiência de VitD acelerou o desenvolvimento e progressão da ND em ratos com diabetes tipo 1. A redução da expressão do miR-200b com conseqüente aumento das expressões de ZEB1/2 e VEGF-A sugere que a diminuição da regulação desses fatores de transcrição nuclear e da secreção desse fator de crescimento vascular, respectivamente, podem estar relacionadas com as alterações estruturais e funcionais mais acentuadas observadas nos ratos diabéticos deficientes em VitD.

# Referências

## 8. Referências

Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* 2019;8:471-489.

Al-Badr W, Martin KJ. Vitamin D and Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1555–1560.

Almeida LF, Francescato HDC, Antunes-Rodrigues J, de Paula FJA, Giovanni C, Costa RS, et al. Imbalance of Pro- and Anti-Angiogenic Factors Due to Maternal Vitamin D Deficiency Causes Renal Microvasculature Alterations Affecting the Adult Kidney Function. *Nutrients* 2019;11:1929-1944.

Andersen LB, Przybyl L, Haase N, Versen-Höynck F, Qadri F, Jorgensen JS, Sorensen GL, Fruekilde P, Poglitsch M, Szijarto I, Gollasch M, Peters J, Muller DN, Christesen HT, Dechend R. Vitamin D Depletion Aggravates Hypertension and Target-Organ Damage. *J Am Heart Assoc* 2015;4(2):e001417.

Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int* 2006;69:33–43.

Arneith B, Arneith R, Shams M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* 2019;20:2467.

Barutta F, Bellini S, Gruden G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy. *Clinical Science* 2022;136:493–520.

Bernardo DRD, Canale D, Nascimento MM, Shimizu MHM, Seguro AC, Bragança AC, et al. The association between obesity and vitamin D deficiency modifies the progression of kidney disease after ischemia/reperfusion injury. *Front Nutr* 2022;9:952028.

Boer IH, Sachs MC, Cleary PA, Hoofnagle AN, Lachin JM, Molitch ME, Steffes MW, Sun W, Zinman B, Brunzell JD. Circulating vitamin D metabolites and kidney disease in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:4780-8.

Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 2010;11(9):670-7.

Bragança AC, Canale D, Gonçalves J, Shimizu MHM, Seguro AC, Volpini RA. Vitamin D Deficiency Aggravates the Renal Features of Moderate Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Rats. *Front Med* 2018;5:282-297.

Bus P, Scharpfenecker M, Wilk PVD, Wolterbeek R, Bruijn JA, Baelde Hans J. The VEGF-A inhibitor sFLT-1 improves renal function by reducing endothelial activation and inflammation in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2017; 60(9): 1813–1821.

Caja L, Tan EJ. Epithelium to Mesenchyme Transition. In: Boffetta P, Hainaut P eds. *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)*. New York: Tisch Cancer Institute; Grenoble: Institute for Advanced Biosciences. Academic Press of Elsevier 2019:14-23.

Cas AD, Gnudi L. VEGF and angiopoietins in diabetic glomerulopathy: How far for a new treatment? *Metabolism* 2012;61(12):1666-73.

Checherița IA, Manda G, Hinescu ME, Peride I, Niculae A, Bilha S, Gramaticu A, Voroneanu L, Covic A. New molecular insights in diabetic nephropathy. *Int Urol Nephrol* 2016;48(3):373-87.

Chen SJ, Lv LL, Liu BC, Tang RN. Crosstalk between tubular epithelial cells and glomerular endothelial cells in diabetic kidney disease. *Cell Proliferation* 2020;53:e12763.

Chiang KC, Yeh TS, Chen SC. The Vitamin D Analog, MART-10, Attenuates Triple Negative Breast Cancer Cells Metastatic Potential. *Int J Mol Sci* 2016;17:606.

Chien HY, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Li WC. Differential microRNA Profiles Predict Diabetic Nephropathy Progression in Taiwan. *Int J Med Sci* 2016;13(6):457-65.

Chokhandre MK, Mahmoud MI, Hakami T, Jafer M, Inamdar AS. Vitamin D & its analogues in type 2 diabetic nephropathy: a systematic review. *J Diabetes & Metab Disorders* 2015;14:58-68.

Costa PZ, Soares R. Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sci* 2013;92:1037-1045.

Dessapt-Baradez C, Woolf AS, White KE, Pan J, Huang JL, Hayward AA, Price KL, Kolatsi-Joannou M, Locatelli M, Diennet M, Webster Z, Smillie SJ, Nair V, Kretzler M, Cohen CD, Long DA, Gnudi L. Targeted glomerular angiopoietin-1 therapy for early diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2014;25(1):33-42.

Diaz VA, Mainous AG, Carek PJ, Wessell AM, Everett CJ. The association of vitamin D deficiency and insufficiency with diabetic nephropathy: implications for health disparities. *J Am Board Fam Med* 2009;22(5):521-527.

Dusso A, González EA, Martin KJ. Vitamin D in chronic kidney disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(4):647-55.

Dusso AS, Masanori Tokumoto. Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. *Kidney Int* 2011;79:715-729.

Dworacka M, Iskakova S, Krzyzagska E, Wesolowska A, Kurmambayev Y, Dworacki G. Alpha-lipoic acid modifies circulating angiogenic factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2015;107:273-279.

- Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB, Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:43–50.
- Faleiros CM, Francescato HDC, Papoti M, Chaves L, Giovanini C, Costa RS, Coimbra TM. Effects of previous physical training on adriamycin nephropathy and its relationship with endothelial lesions and angiogenesis in the renal cortex. *Life Sci* 2017;169:43-51.
- Fan L, Zhang Y, Zhu J, Song Y, Lin J. Association of vitamin D deficiency with diabetic peripheral neuropathy and diabetic nephropathy in Tianjin, China. *Asia Pac J Clin Nutr* 2018;27(3):599-606.
- Felício JS, Luz RM, Melo FTC, Resende FS, Oliveira AF, Peixoto AS, et al. Vitamin D on early stages of diabetic kidney disease: a cross-sectional study in patients with type 1 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016;7:149.
- Felício JS, Oliveira AF, Peixoto AS, Souza ACCB, Neto JFA, Melo FTC, Carvalho CT, et al. Albuminuria Reduction after High Dose of Vitamin D in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: A Pilot Study. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;14(8):199.
- Feng B, Cao Y, Chen S, Chu X, Chu Y, Chakrabarti S. miR-200b Mediates Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes* 2016;65:768–779.
- Forouhi NG, Ye Z, Rickard AP, Khaw KT, Luben R, Langenberg C, Wareham NJ. Circulating 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk cohort and updated meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* 2012;55:2173–2182.
- Fouli GE, Gnudi L. The Future: Experimental Therapies for Renal Disease in Diabetes. *Nephron* 2019;143:3-7.
- Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis—evidence for and against. *International Journal of Experimental Pathology* 2011;92(3):143–150.
- Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC. Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015;308: F287–F297.
- Furuya F, Ishii T, Kitamura K. Chronic Inflammation and Progression of Diabetic Kidney Disease. *Contrib Nephrol* 2019;198:33-39.
- Gil CL, Hooker E, Larrivéé B. Diabetic Kidney Disease, Endothelial Damage, and Podocyte-Endothelial Crosstalk. *Kidney Med* 2021;3(1):105-115.
- Gnudi L. Angiopietins and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2016;59:1616–1620.
- Gonçalves JG, Bragança AC, Canale D, Shimizu MHM, Sanches TR, Moysés RMA, Andrade L, Seguro AC, Volpini RA. Vitamin D Deficiency Aggravates Chronic Kidney Disease Progression after Ischemic Acute Kidney Injury. *PLoS One* 2014;9:e107228.

Gonçalves JG, Canale D, Bragança AC, Seguro AC, Shimizu MHM, Volpini RA. The Blockade of TACE-Dependent EGF Receptor Activation by Losartan-Erlotinib Combination Attenuates Renal Fibrosis Formation in 5/6-Nephrectomized Rats Under Vitamin D Deficiency. *Front Med (Lausanne)* 2021;7:609158.

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593-601.

Hakim FA, Pflueger A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease. *Med Sci Monit* 2010;16(2):RA37-48.

Hanefeld M, Appelt D, Engelmann K, Sandner D, Bornstein SR, Ganz X, Henkel E, Haase R, Birkenfeld AL. Serum and Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factors in Relation to Quality of Glucose Control, Biomarkers of Inflammation, and Diabetic Nephropathy. *Horm Metab Res* 2016;48(8):529–534.

Haraldsson B, Nystrom J. The glomerular endothelium: new insights on function and structure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21(3):258-63.

Haris B, Ahmed I, Syed N, Almabrazi H, Saraswathi S, Al-Khawaga S, Saeed A, et al. Clinical features, epidemiology, autoantibody status, HLA haplotypes and genetic mechanisms of type 1 diabetes mellitus among children in Qatar. *Sci Rep* 2021;11(1):18887.

Herrmann A, Tozzo E, Funk J. Semi-automated quantitative image analysis of podocyte desmin immunoreactivity as a sensitive marker for acute glomerular damage in the rat puromycin aminonucleoside nephrosis (PAN) model. *Exp Toxicol Pathol* 2012;64:45-9.

Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer* 2013;132:745-54.

Hills CE, Squires PE. The role of TGF-beta and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 131–139, 2011.

Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266–281.

Hu X, Liu W, Yan Y, Liu H, Huang Q, Xiao Y, Gong Z, Du J. Vitamin D protects against diabetic nephropathy: Evidence-based effectiveness and mechanism. *Eur J Pharmacol* 2019;845:91-98.

Hua W, Dijke PT, Kostidis S, Giera M, Hornsveld M. TGFβ-induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2020;77(11):2103-2123.

Huang B, Wen W, Ye S. Correlation Between Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels in Albuminuria Progression of Diabetic Kidney Disease and Underlying Mechanisms By Bioinformatics Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:880930.

International Diabetes Federation (IDF), Diabetes Atlas, 10th edition. Disponible em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>.

Ishii T, Furuya F, Takahashi K, Shikata M, Takamura T, Kobayashi H, Miyazaki A. Angiopoietin-Like Protein 2 Promotes the Progression of Diabetic Kidney Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:172–180.

Ito D, Cao P, Kakihana T, Sato E, Suda C, Muroya Y, Ogawa Y, Hu G, Ishii T, Ito O, Kohzuki M, Kiyomoto H. Chronic Running Exercise Alleviates Early Progression of Nephropathy with Upregulation of Nitric Oxide Synthases and Suppression of Glycation in Zucker Diabetic Rats. *PLoS One* 2015;10:e0138037, 2015.

Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* 2018;50(4):1-14.

Jeong JH, Ojha U, Lee YM. Pathological angiogenesis and inflammation in tissues. *Arch Pharm Res* 2021;44:1–15.

Jiang S, Luo M, Bai X, Nie P, Zhu Y, Cai H, Li B, Luo P. Cellular crosstalk of glomerular endothelial cells and podocytes in diabetic kidney disease. *Journal of Cell Communication and Signaling* 2022;16:313–331.

Joergensen C, Hovind P, Schmedes A, Parving HH, Rossing P. Vitamin D levels, microvascular complications, and mortality in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:1081-5.

Jourde-Chiche N, Fakhouri F, Dou L, Bellien J, Burtey S, Frimat M, Jarrot PA, et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019;15(2):87-108.

Jung, CH, Kim KJ, Kim BY, Kim CH, Kang SK, Mok JO. Relationship between vitamin D status and vascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res* 2016;36(2):117–124.

Kaludjerovic J, Komaba H, Sato T, Erben RG, Baron R, Olauson H, Larsson TE, Lanske B. Klotho expression in long bones regulates FGF23 production during renal failure. *FASEB J* 2017;31(5):2050-2064.

Kato M, Arce L, Wang M, Putta S, Lanting L, Natarajan Rama. A microRNA circuit mediates Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 2011;80(4): 358–368.

Keri KC, Samji NS, Blumenthal S. Diabetic nephropathy: newer therapeutic perspectives. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2018;8(4):200-207.

Ko D, Kim S. Cooperation between ZEB2 and Sp1 promotes cancer cell survival and angiogenesis during metastasis through induction of survivin and VEGF. *Oncotarget* 2017;11(1):726-742.

- Krolewski A. Progressive Renal Decline: The New Paradigm of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:954–962.
- Lam V, Takechi R, Pallabage-Gamarallage M, Giles C, Mamo JCL. The Vitamin D, Ionised Calcium and Parathyroid Hormone Axis of Cerebral Capillary Function: Therapeutic Considerations for Vascular-Based Neurodegenerative Disorders. *PLoS ONE* 2015;10(4):e0125504.
- Laurell CB. Electroimmuno assay. *Scand J Clin Lab Investig* 1972, 29:21–37.
- Li YC. Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney Int* 2010;78:134-9.
- Lim HS, Blann AD, Chong AY, Freestone B, Lip GY. Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in diabetes: implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention. *Diabetes Care* 2004;27:2918–2924.
- Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* 2018;117(8):662-675.
- Liu L, Tong Q, Liu S, Cui J, Zhang Q, Sun Wei, Yang S. ZEB1 Upregulates VEGF Expression and Stimulates Angiogenesis in Breast Cancer. *PLoS ONE* 2016;11(2): e0148774.
- Liyanage PLGC, Lekamwasam S, Weeraratna TP, Liyanage C. Effect of Vitamin D therapy on urinary albumin excretion, renal functions, and plasma renin among patients with diabetic nephropathy: A randomized, double-blind clinical trial. *J Postgrad Med* 2018;64(1):10–15.
- Lucisano S, Buemi M, Passantino A, Aloisi C, Cernaro V, Santoro D. New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage. *Kidney Blood Press Res* 2013;37(6):667-78.
- Maclsaac RJ, Ekinici EI, Jerums G. Markers of and Risk Factors for the Development and Progression of Diabetic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis* 2014;63(2):S39-S62.
- Makino H, Nakamura Y, Wada J. Remission and Regression of Diabetic Nephropathy. *Hypertension Research* 2003;26:515-519.
- Makitaipale J, Sankari S, Sievänen H, Laitinen-Vapaavuori O. The relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone concentration in assessing vitamin D deficiency in pet rabbits. *BMC Veterinary Research* 2020;16:403-411.
- Manucha W, Juncos LI. The protective role of vitamin D on the heart and the kidney. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2017;11:12–19.
- McArthur K, Feng B, Wu Y, Chakrabarti S. MicroRNA-200b Regulates Vascular Endothelial Growth Factor–Mediated Alterations in Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 2011;60:1-10.

Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 2009;20:1807–1820.

Nakagawa T, Kosugi T, Haneda M, Rivard CJ, Long DA. Abnormal angiogenesis in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2009;58:1471-1478.

Nakashima A, Yokoyama K, Yokoo T, et al. Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease. *World J Diabetes* 2016;7:89–100.

Nascimento FAM, Ceciliano TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal Vitamin D Deficiency Delays Glomerular Maturity in F1 and F2 Offspring. *PLoS ONE* 2012;7: e41740.

Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab Res Rev* 2017;33:1-9.

Park SM, Gaur AB, Lengyel E, et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008;22:894–907.

Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 2019;12:1-13.

Pereira F, Barbáchano A, Singh PK, et al. Vitamin D has wide regulatory effects on histone demethylase genes. *Cell Cycle* 2012;11:1081-1089.

Petrica L, Vlad A, Gluhovschi G, Gadalean F, Dumitrascu V, Gluhovschi C, Velciov S, Bob F, Vlad D, Popescu R, Milas O, Ursoniu S. Proximal Tubule Dysfunction Is Associated with Podocyte Damage Biomarkers Nephritin and Vascular Endothelial Growth Factor in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Cross-Sectional Study. *PLoS One* 2014;9(11): e112538.

Polat SB, Ugurlu N, Aslan N, Cuhaci N, Ersoy R, Cakir B. Evaluation of biochemical and clinical markers of endothelial dysfunction and their correlation with urinary albumin excretion in patients with type 1 diabetes mellitus. *Arch Endocrinol Metab* 2016;60(2):117-124.

Pu J, Zhang Y, Zhou J. Effect of Huai Qi Huang on epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells through miR-200a. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016;2016:8612190.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JrGC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51.

Rossing P, Joergensen C. Effect of vitamin D on diabetic kidney disease in T1DM. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:6–7.

Ruiz MA, Feng B, Chakrabarti S. Polycomb Repressive Complex 2 Regulates MiR-200b in Retinal Endothelial Cells: Potential Relevance in Diabetic Retinopathy. *PLoS One* 2015; 10(4): e0123987.

Sabbineni H, Verma A, Somanath PR. Isoformspecific effects of transforming growth factor  $\beta$  on endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Cellular Physiology* 2018;233:8418–8428.

Saleh MA, Miguel C, Stevens DI, Carmines PK, Pollock DM, Pollock JS. Free radical scavenging decreases endothelin-1 excretion and glomerular albumin permeability during type 1 diabetes. *Physiol Rep* 2016;24:1–9.

Sánchez-Tilló E, Siles L, Cuatrecasas BOM, Vaquero EC, Castells A, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res* 2011;1:897-912.

Sene LB, Mesquita FF, Moraes LN, Santos DC, Carvalho R, Gontijo JAR, Boer PA. Involvement of Renal Corpuscle microRNA Expression on Epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. *PLoS ONE* 2014;8:e71310.

Seo J, Kim YG, Lee SH, Lee A, Kim DJ, Jeong KH, Lee KH, Hwang SJ, Woo JS, Lim SJ, Kim W, Moon JY. Mycophenolate Mofetil Ameliorates Diabetic Nephropathy in db/db Mice. *Biomed Research International* 2015;1-11:2015.

Silva C, Sampaio-Pinto V, Andrade S, Rodrigues I, Costa R, Guerreiro S, Carvalho E, et al. Establishing a Link between Endothelial Cell Metabolism and Vascular Behaviour in a Type 1 Diabetes Mouse Model. *Cell Physiol Biochem* 2019;52(3): 503–516.

Singh RM, Howarth FC, Adeghate E, et al. Type 1 diabetes mellitus induces structural changes and molecular remodelling in the rat kidney. *Mol Cell Biochem* 2018;449:1-17.

Song Y, Wang L, Pittas AG, et al. Blood 25-hydroxy vitamin D levels and incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 2013;36:1422-8.

Song Z, Xiao C, Jia X, Luo C, Shi L, Xia R et al. Vitamin D/VDR Protects Against Diabetic Kidney Disease by Restoring Podocytes Autophagy. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2021;14: 1681–1693.

Souza CS, Oliveira BSS, Viana GN, Correia TML, Bragança AC, Canale D, et al. Preventive effect of exercise training on diabetic kidney disease in ovariectomized rats with type 1 diabetes. *Exp Biol Med* 2019;244:758-769.

Srivastava SP, Koya D, Kanasaki K. MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT. *Biomed Res Int* 2013;2013:125469.

Stieger N, Worthmann K, Schiffer M. The role of metabolic and haemodynamic factors in podocyte injury in diabetes. *Diabetes. Metab Res Rev* 2011;27(3):207–215.

Sun J, Wang Y, Cui W, et al. Role of epigenetic histone modifications in diabetic kidney disease involving renal fibrosis. *J Diabetes Res* 2017;2017:7242384.

Taherigorabi Z, Khazaei M. Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms. *Int J Prev Med* 2012;3(12):827-38.

Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, Ferrario F, et al. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21: 556–563, 2010.

Thethi TK, Bajwa MA, Ghanim H, Jo C, Weir M, Goldfine AB, et al. Effect of paricalcitol on endothelial function and inflammation in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *J Diabetes Complications* 2015;29:433-7.

Tsai YC, Kuo PL, Hung WW, Wu LY, Wu PH, Chang WA, Kuo MC, Hsu YL. Angpt2 Induces Mesangial Cell Apoptosis through the MicroRNA-33-5p-SOCS5 Loop in Diabetic Nephropathy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018;13:543-555.

Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, Boer IH, Goldstein-Fuchs J, Hirsch I, et al. Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* 2014;37:2864–2883.

Tylzanowski P, Verschueren K, Huylebroeck D, Luyten FP. Smad-interacting protein 1 is a repressor of liver/bone/kidney alkaline phosphatase transcription in bone morphogenetic protein-induced osteogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem* 2001;276(43):40001-7.

Veron D, Bertuccio CA, Marlier A, Garcia AM, Jimenez J, Velazquez H, Kashgarian M, Moeckel GW, Tufro A. Podocyte vascular endothelial growth factor (Vegf164) overexpression causes severe nodular glomerulosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011;54:1227–41.

Vietinghoff S, Koltsova EK, Mestas J, Diehl CJ, Witztum JL, Ley K. Mycophenolate mofetil decreases atherosclerotic lesion size by depression of aortic T-lymphocyte and interleukin-17-mediated macrophage accumulation. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(21):2194-204.

Volpini RA, Giovanini C, Costa RS, Coimbra TM. Effect of enalapril and losartan on the events that precede diabetic nephropathy in rats. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19:43–51.

Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:993-1000.

Wang Y, Borchert ML, DeLuca HF. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney International* 2012;81:993–1001.

- Wei J, Zhang Y, Luo Y, Wang Z, Bi S, Song D, et al. Aldose reductase regulates miR-200a-3p/141-3p to coordinate Keap1-Nrf2, Tgf $\beta$ 1/2, and Zeb1/2 signaling in renal mesangial cells and the renal cortex of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 2014;67:91-102.
- Wen D, Huang X, Zhang M, Zhang L, Chen J, Gu Y, Hao CM. Resveratrol attenuates diabetic nephropathy via modulating angiogenesis. *PLoS One* 2013;8(12):e82336.
- Xiao X, Wang Y, Hou Y, Han F, Ren J, Hu Z. Vitamin D deficiency and related risk factors in patients with diabetic nephropathy. *J Int Med Res* 2016;44(3):673-84.
- Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, Wen P, Yang J. The miR-200 family regulates TGF- $\beta$ 1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:F369-79.
- Xu Y, Ouyang C, Lyu D, Lin Z, Zheng W, Xiao F, Xu Z, Ding L. Diabetic nephropathy exacerbates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) via miR-2467-3p/Twist1 pathway. *Biomed Pharmacother* 2020;125:109920.
- Yamamoto Y, Maeshima Y, Kitayama H, Kitamura S, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H. Tumstatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2004;53(7):1831-40.
- Yang B, Xia Z, Xin C, Ma C, Zhang F. Xiaokeping Mixture Attenuates Diabetic Kidney Disease by Modulating TGF- $\beta$ /Smad Pathway in db/db Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019;2019:9241896.
- Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 2009;29:2011-22.
- Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of Tubulointerstitial Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1819-34.
- Zhang X, Guo K, Xia F, Zhao X, Huang Z, Niu J. FGF23C-tail improves diabetic nephropathy by attenuating renal fibrosis and inflammation. *BMC Biotechnol* 2018;18(1):33.
- Zhang X, Song Z, Guo Y, Zhou M. The novel role of TRPC6 in vitamin D ameliorating podocyte injury in STZ-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2015;399:155-65.
- Zheng Q, Cui X, Zhang D, Yang Y, Yan X, Liu M, et al. miR-200b inhibits proliferation and metastasis of breast cancer by targeting fucosyltransferase IV and  $\alpha$ 1,3-fucosylated glycans. *Oncogenesis* 2017;6:e358.

**Anexos**

## Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética



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





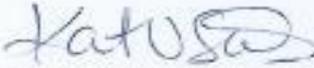
## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Influência da Deficiência de Vitamina D na evolução da Nefropatia Diabética*", registrado com o número **002/2019**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de abril de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 60 ratos Wistar-OLD machos pesando 200g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/04/2019 a 01/05/2022.

We certify that the Protocol nº 002/2019, entitled "*Influence of Vitamin D Deficiency on the Evolution of Diabetic Nephropathy*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 04/29/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 60 male Wistar-Old rats weighing 200g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 05/01/2022.

Ribeirão Preto, 29 de abril de 2019



**Profa. Dra. Katuchia Uzzan Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP - USP

---

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14046-900 - Tel.: (16) 3315-3001 / 3315-3276 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br

## Anexo 2 – Colaboração em artigo



Article

## Paricalcitol Improves the Angiopoietin/Tie-2 and VEGF/VEGFR2 Signaling Pathways in Adriamycin-Induced Nephropathy

Amanda Lima Deluque <sup>1,\*</sup>, Beatriz Magalhães Oliveira <sup>1</sup>, Cláudia Silva Souza <sup>1</sup>, Ana Livia Dias Maciel <sup>1</sup>, Heloisa Della Coletta Francescato <sup>1</sup>, Cleonice Giovanini <sup>1</sup>, Lucas Ferreira de Almeida <sup>1</sup>, Francisco José Albuquerque de Paula <sup>2</sup>, Roberto Silva Costa <sup>3</sup>, José Antunes-Rodrigues <sup>4</sup> and Terezila Machado Coimbra <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Renal Physiology, Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14060-900, SP, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Endocrinology, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14015-010, SP, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Renal Pathology, Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14015-010, SP, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Neuroendocrinology, Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14060-900, SP, Brazil

\* Correspondence: amandadeluque@rnp.usp.br (A.L.D.); tmaccoibol@rnp.usp.br (T.M.C.); Tel.: +55-(16)-3315-3021 (T.M.C.)



Citation: Deluque, A.L.; Oliveira, B.M.; Souza, C.S.; Maciel, A.L.D.; Francescato, H.D.C.; Giovanini, C.; de Almeida, L.F.; de Paula, F.J.A.; Costa, R.S.; Antunes-Rodrigues, J.; et al. Paricalcitol Improves the Angiopoietin/Tie-2 and VEGF/VEGFR2 Signaling Pathways in Adriamycin-Induced Nephropathy. *Nutrients* 2022, 14, 5316. <https://doi.org/10.3390/nu14245316>

Academic Editor: Sonia Seal

Received: 5 November 2022

Accepted: 9 December 2022

Published: 14 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Renal endothelial cell (EC) injury and microvascular dysfunction contribute to chronic kidney disease (CKD). In recent years, increasing evidence has suggested that EC undergoes an endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT), which might promote fibrosis. Adriamycin (ADR) induces glomerular endothelial dysfunction, which leads to progressive proteinuria in rodents. The activation of the vitamin D receptor (VDR) plays a crucial role in endothelial function modulation, cell differentiation, and suppression of the expression of fibrotic markers by regulating the production of nitric oxide (NO) by activating the endothelial NO synthase (eNOS) in the kidneys. This study aimed to evaluate the effect of paricalcitol treatment on renal endothelial toxicity in a model of CKD induced by ADR in rats and explore mechanisms involved in EC maintenance by eNOS/NO, angiopoietins (Angp)/endothelium cell-specific receptor tyrosine kinase (Tie-2, also known as TEK) and (VEGF)-VEGF receptor 2 (VEGFR2) axis. The results show that paricalcitol attenuated the renal damage ADR-induced with antiproteinuric effects, glomerular and tubular structure, and function protection. Furthermore, activation of the VDR promoted the maintenance of the function and structure of glomerular, cortical, and external medullary endothelial cells by regulating NO production. In addition, it suppressed the expression of the mesenchymal markers in renal tissue through attenuation of (transforming growth factor-beta) TGF- $\beta$ 1/Smad2/3-dependent and downregulated of Ang-2/Tie-2 axis. It regulated the VEGF/VEGFR2 pathway, which was ADR-downregulated. These effects were associated with lower ATI expression and VDR recovery to renal tissue after paricalcitol treatment. Our results showed a protective role of paricalcitol in the renal microvasculature that could be used as a target for treating the beginning of CKD.

**Keywords:** paricalcitol; endothelial toxicity; cell differentiation; angiopoietin-2; Tie-2 receptor; angiogenic factors; progressive kidney disease

### 1. Introduction

The progression of chronic kidney disease (CKD) to end-stage renal disease (ESRD) is related to the onset and evolution of interstitial renal fibrosis, regardless of the underlying cause. Interstitial renal fibrosis is characterized by the accumulation of fibroblasts and their activation into myofibroblasts, leading to an increase in extracellular matrix deposition [1].

## Anexo 3 – Colaboração em artigo



## Article

**Calcitriol Reduces the Inflammation, Endothelial Damage and Oxidative Stress in AKI Caused by Cisplatin**

Beatriz M. Oliveira <sup>1</sup>, Lucas Ferreira de Almeida <sup>1</sup>, Amanda L. Deluque <sup>1</sup>, Claudia S. Souza <sup>1</sup>, Ana Livia D. Maciel <sup>1</sup>, Heloisa D. C. Francescato <sup>1</sup>, Roberto S. Costa <sup>2</sup>, Cleonice Giovanini <sup>1</sup>, Francisco José A. de Paula <sup>2</sup> and Terezila M. Coimbra <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Department of Medical Clinic, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, São Paulo, Brazil

\* Correspondence: tcoimbra@fmrp.usp.br; Tel: +55-16-3315-3021



Citation: Oliveira, B.M.; de Almeida, L.F.; Deluque, A.L.; Souza, C.S.; Maciel, A.L.D.; Francescato, H.D.C.; Costa, R.S.; Giovanini, C.; de Paula, F.J.A.; Coimbra, T.M. Calcitriol Reduces the Inflammation, Endothelial Damage and Oxidative Stress in AKI Caused by Cisplatin. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15077. <https://doi.org/10.3390/ijms230415077>

Academic Editors: Giovana S. Di Marco and Marcus Brand

Received: 7 October 2022

Accepted: 12 December 2022

Published: 14 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Cisplatin treatment is one of the most commonly used treatments for patients with cancer. However, thirty percent of patients treated with cisplatin develop acute kidney injury (AKI). Several studies have demonstrated the effect of bioactive vitamin D or calcitriol on the inflammatory process and endothelial injury, essential events that contribute to changes in renal function and structure caused by cisplatin (CP). This study explored the effects of calcitriol administration on proximal tubular injury, oxidative stress, inflammation and vascular injury observed in CP-induced AKI. Male Wistar Hannover rats were pretreated with calcitriol (6 ng/day) or vehicle (0.9% NaCl). The treatment started two weeks before i.p. administration of CP or saline and was maintained for another five days after the injections. On the fifth day after the injections, urine, plasma and renal tissue samples were collected to evaluate renal function and structure. The animals of the CP group had increased plasma levels of creatinine and of fractional sodium excretion and decreased glomerular filtration rates. These changes were associated with intense tubular injury, endothelial damage, reductions in antioxidant enzymes and an inflammatory process observed in the renal outer medulla of the animals from this group. These changes were attenuated by treatment with calcitriol, which reduced the inflammation and increased the expression of vascular regeneration markers and antioxidant enzymes.

**Keywords:** AKI; calcitriol; cisplatin; endothelium; CP-induced AKI; inflammatory process

## 1. Introduction

Cisplatin (CP) is one of the most potent and effective anticancer drugs used in clinical practice [1]. Despite its effectiveness, its use is limited by its nephrotoxicity, which leads to kidney injury (AKI), and it has been shown that cisplatin accumulation in the kidney leads to selective damage to S3 of the proximal tubule located in the outer stripe of the outer medulla [2–4]. AKI is characterized by an abrupt drop in renal function, decline in glomerular filtration rate (GFR) and accumulation of metabolic waste [5]. Several mechanisms have been studied to evaluate the determinants for the nephrotoxic effect of CP. The kidney's toxicity from cisplatin has been associated with the basolateral uptake along the proximal tubule via the organic cation transporter 2 (OCT2), leading to an intracellular cisplatin concentration up to five times higher than that of plasma levels [6].

This accumulation can lead to an increased production of reactive oxygen species (ROS) [7,8], triggering oxidative stress [9], vascular injury [10] and activation of inflammatory pathways [11] and apoptotic pathways [11,12].

To maintain cellular homeostasis, a balance between ROS production and antioxidant defense activity is necessary [13,14]. CP interferes with this balance by increasing the production of ROS [15] and reducing the production of antioxidant enzymes, such as