

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

BEATRIZ MAGALHÃES OLIVEIRA

**Influência da Vitamina D na evolução da lesão renal aguda provocada pela
cisplatina em ratos**

Ribeirão Preto
2023

BEATRIZ MAGALHÃES OLIVEIRA

Influência da Vitamina D na evolução da lesão renal aguda provocada pela cisplatina em ratos

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências com ênfase em Fisiologia.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Terezila Machado
Coimbra

Ribeirão Preto
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.

Ficha Catalográfica

Oliveira, Beatriz Magalhães
Influência da Vitamina D na evolução da lesão renal aguda provocada pela cisplatina em ratos. Ribeirão Preto, 2023.

98 p. : il. ; 30 cm

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

Orientadora: Machado Coimbra, Terezila.

1. Lesão Renal Aguda. 2. Cisplatina. 3. Vitamina D. 4. Disfunção endotelial. 5. Inflamação.

Nome: OLIVEIRA, Beatriz Magalhães

Título: Influência da Vitamina D na evolução da lesão renal aguda provocada pela cisplatina em ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências (área de concentração: Fisiologia

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Jorge e Lucilene**, por todo amor, dedicação e cuidado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por ter me dado a chance de viver e por todas as oportunidades que tive ao longo da minha vida.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Lucilene e Jorge, e aos meus irmãos, Bruna e Matheus, por todo o apoio, carinho e companheirismo. Sem esse apoio jamais conseguiria. A vocês o meu amor incondicional.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Terezila Machado Coimbra, por toda a sua generosidade e carinho para comigo. Obrigado pela oportunidade, por todos os ensinamentos, com certeza contribuíram com a minha formação. A você meu profundo respeito e admiração.

agradeço à Dr^a Heloisa Della Coletta Francescato, por todos os ensinamentos, apoio e amizade. Sempre com generosidade e paciência de ensinar. Torço muito pela sua felicidade e sucesso.

À Cleonice Giovanini, que foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço por todo o carinho, amizade e companheirismo. Que sua vida seja muito feliz.

À amizade da Amanda, Ana Livia, Karolyne e Cláudia. Obrigada por toda amizade, por todos os momentos compartilhados e principalmente por estarem sempre dispostas a me ouvir. Não tenho dúvidas, que sem a ajuda de vocês, eu não teria chegado até aqui. Não há palavras suficientes para agradecer por tudo que fizeram por mim.

À amizade do Lucas, por todo o companheirismo, todas as risadas e momentos de aprendizado.

Agradeço às minhas amigas, Betina Mielke e Cainá Emanuela, por todo apoio e amizade ao longo desses anos. Obrigada por mesmo distantes serem tão presentes na minha vida.

Aos amigos que fiz na pós-graduação, Thaís, Daniel, Júlio, Viviane, Nikolas, Amandinha e Henrique, me sinto abençoada por ter tido a chance de conhecer cada um de vocês. Obrigada por todos os momentos compartilhados, a presença de vocês tornou essa caminhada muito mais fácil e prazerosa. Levarei um pouco de cada um comigo e espero ter deixado um pouco de mim também. Gratidão e carinho é o que sinto.

Ao grupo de estudos de fisiopatologia renal, em especial ao Professor Márcio Dantas e Roberto Silva, por todos os ensinamentos, conselhos e discussões de artigos. Com certeza foram momentos importantes que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, por todos os ensinamentos e suportes prestados durante todos esses anos. Gratidão por ter tido a chance de conviver com grandes mestres.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, por todo o auxílio, amizade e incentivo.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Fisiologia, da FMRP-USP pelo auxílio prestado durante todos esses anos.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por me receberem durante todos esses 4 anos, por me cederem subsídios e estrutura para a realização deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo indispensável auxílio financeiro deste estudo, tornando possível a sua realização.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

RESUMO

Oliveira, B.M. **Influência da Vitamina D na evolução da lesão renal aguda provocada pela cisplatina em ratos.** 2023 Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

Um dos agentes quimioterápicos mais comumente utilizados para o tratamento de tumores sólidos é a cisplatina (CP). Contudo, trinta por cento dos pacientes que fazem uso de CP desenvolvem lesão renal aguda (LRA), caracterizada por declínio na taxa de filtração glomerular (TFG), disfunção tubular, resposta inflamatória e lesão da microvasculatura renal. Vários estudos têm demonstrado o efeito benéfico do calcitriol, a forma ativa da vitamina D na redução do processo inflamatório, estresse oxidativo e na modulação da função endotelial. Este estudo teve como objetivo explorar os efeitos do tratamento prévio com calcitriol na LRA induzida por CP em ratos e explorar os mecanismos relacionados a lesão tubular proximal, estresse oxidativo, inflamação e lesão das células endoteliais. Ratos machos Wistar Hannover foram submetidos à cirurgia de implante subcutâneo de mini-bomba osmótica contendo calcitriol (6 ng/dia) ou veículo (0,9% NaCl) duas semanas antes da administração intraperitoneal (i.p.) de CP (5 mg/Kg) ou Salina (0,9% NaCl) e foi mantida por mais cinco dias após a injeção. No quinto dia após as injeções, os animais foram eutanasiados e amostras de urina, sangue (plasma e soro) e tecido renal foram coletadas para avaliação da função e estrutura renal, além da análise de marcadores inflamatórios, de lesão tubular, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Os resultados mostram que o tratamento prévio com calcitriol protegeu contra a LRA induzida por CP, reduzindo as alterações de função renal, evidenciadas por menores níveis de creatinina plasmática (pCr) e de excreção fracional de sódio (FENa⁺), assim como a melhora da taxa de filtração glomerular (TFG). Esses efeitos estavam associados a menor lesão tubular aguda e recuperação da expressão de cubulina na região da medula externa renal. Adicionalmente, o tratamento com calcitriol foi capaz de aumentar a expressão do receptor de vitamina D (VDR) em animais do grupo CP+Calcitriol. O calcitriol reduziu a expressão de vimentina, do antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA), assim como reduziu a expressão de macrófagos teciduais e secreção de interleucina pró-inflamatória (IL-1 IL-1 β) e induziu aumento da secreção de interleucina-10 (IL-10). Esses efeitos benéficos do calcitriol pode estar associado ao menor dano endotelial induzido por CP, demonstrados pela maior expressão de aminopeptidase P (JG12), grupo de diferenciação 34 (CD34) e ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS/p-eNOS). O tratamento com calcitriol também regulou o eixo de manutenção endotelial relacionado ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e de seu receptor tipo 2 para VEGF (VEGFR2), impediu as alterações de expressão do receptor tipo 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) e da proteína superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), demonstrando o efeito antioxidante da vitamina D. Com esses achados, nossos resultados mostraram que o calcitriol foi capaz de atenuar a LRA, apresentando potenciais terapêuticos para pacientes que fazem uso de CP.

Palavras-chave: LRA; calcitriol; cisplatina; endotélio; LRA induzida por CP; processo inflamatório.

ABSTRACT

Oliveira, B.M. **Influence of Vitamin D on the evolution of acute kidney injury caused by cisplatin in rats.** 2023 Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

One of the most commonly used chemotherapeutic agents for the treatment of solid tumors is cisplatin (CP). However, thirty percent of patients using CP develop acute kidney injury (AKI), characterized by a decline in glomerular filtration rate (GFR), tubular dysfunction, inflammatory response and damage to the renal microvasculature. Several studies have demonstrated the beneficial effect of calcitriol, the active form of vitamin D, in reducing the inflammatory process, oxidative stress and modulating endothelial function. This study aimed to explore the effects of prior calcitriol treatment on CP-induced AKI in rats and to explore the mechanisms related to proximal tubular injury, oxidative stress, inflammation and endothelial cell damage. Male Wistar Hannover rats underwent subcutaneous implantation of a mini-osmotic pump containing calcitriol (6 ng/day) or vehicle (0.9% NaCl) two weeks before intraperitoneal (i.p.) administration of CP (5 mg/Kg) or Saline (0.9% NaCl) and was maintained for a further five days after injection. On the fifth day after the injections, the animals were euthanized and samples of urine, blood (plasma and serum) and kidney tissue were collected to assess kidney function and structure, as well as to analyze markers of inflammation, tubular damage, oxidative stress and endothelial dysfunction. The results show that treatment with calcitriol attenuated AKI induced by CP, reducing changes in renal function, as evidenced by lower levels of plasma creatinine (pCr) and fractional excretion of sodium (FENa⁺), as well as improved glomerular filtration rate (GFR). These effects were associated with less acute tubular injury and recovery of cubulin expression in the renal outer medulla. In addition, treatment with calcitriol was able to increase the expression of the vitamin D receptor (VDR) in animals in the CP+Calcitriol group. Calcitriol reduced the expression of vimentin, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), as well as reducing the expression of tissue macrophages and secretion of pro-inflammatory interleukin (IL-1 IL-1 β) and induced increased secretion of interleukin-10 (IL-10). These beneficial effects of calcitriol may be associated with less CP-induced endothelial damage, demonstrated by increased expression of aminopeptidase P (JG12), differentiation group 34 (CD34) and activation of the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS/p-eNOS). Calcitriol treatment also regulated the endothelial maintenance axis related to vascular endothelial growth factor (VEGF) and its type 2 receptor for VEGF (VEGFR2), attenuated changes in the expression of C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) and extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) protein, demonstrating the antioxidant effect of vitamin D. With these findings, our results showed that calcitriol was able to attenuate AKI, presenting therapeutic potential for patients using CP.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura tridimensional da cisplatina.....	20
Figura 2. Mecanismo de ativação da vitamina D.....	25
Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental.....	34
Figura 4. Cortes histológicos representativos da medula externa renal corados com Tricrômio de Masson.....	41
Figura 5. Imunolocalização de cubilina na medula externa renal.....	42
Figura 6. Imunolocalização de Vimentina e PCNA na medula externa renal. A pontuação para vimentina e o número de células PCNA-positivas na medula externa renal nos diferentes grupos. Análise de Western blot de vimentina e GAPDH no tecido renal. Densitometria de vimentina.....	44
Figura 7. Imunolocalização de células positivas para ED1 (macrófagos) na medula externa renal.....	45
Figura 8. Níveis no tecido renal de IL (interleucina)-1 β e IL (interleucina)-10. Análise de Western blot de CXCR4 e GAPDH no tecido renal. Densitometria de CXCR4.....	46
Figura 9. Imunolocalização de JG12 na medula externa renal. Análise de Western blot de CD34. Densitometria de CD34.....	47
Figura 10. Análise de Western blot de NOS3 e p-NOS no tecido renal.....	48
Figura 11. Análise de Western blot de VEGF e VEGFR2 no tecido renal.....	49
Figura 12. Análise de Western blot de EC-SOD no tecido renal.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escores utilizados para análise histológica e imunoistoquímica.	36
Tabela 2. Creatinina plasmática (pCr), Excreção fracionada de sódio (FENa+) e Taxa de filtração glomerular (TFG) dos grupos SAL, SAL + Calcitriol, CP e CP + Calcitriol.	40

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CDDP	Cis-diaminodicloroplatina
Cl ⁻	Íon Cloreto
CLIA	Quimioluminescência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Cisplatina
Cr	Creatinina
Ctr1	Transportador de cobre 1
CYP450	Citocromo P450
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina CXC
DAB	3,3 diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SOD	Superóxido dismutase extracelular
eNOs	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
FENa ⁺	Excreção Fracionada de Sódio
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos 23
GSH	Glutathiona reduzida
h	horas
IFN γ	Interferon gama

IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
I κ B	Proteína inibidora K β
JG12	Amino peptidase 12
KDa	kiloDalton
LRA	Lesão renal aguda
mA	Miliampere
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NF κ B	Fator nuclear-kappa B
NH ₃	Amônia
NO	Óxido nítrico
NTA	Necrose tubular aguda
OCT2	Transportador de cátions orgânicos 2
pCr	Creatinina plasmática
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PTH	Paratormônio
Pt	Platina
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
RXR	Receptor retinóide X
SDS	Sulfato de Sódio dodecil
SOD	Superóxido dismutase
TEM	Transição epitélio mesenquimal
TFG	Taxa de filtração glomerular

TGF- β	Fator transformador de crescimento- β
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR-4	Receptor <i>Toll-like</i> 4
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR2	Receptor de VEGF 2
VDR	Receptor nuclear da Vitamina D
VDBP	Proteína carreadora da Vitamina D
VDRE	Elementos responsivos da Vitamina D
7-DHC	7-deidrocolesterol
1,25(OH) $2D^3$	Calcitriol
25(OH)D	Calcidiol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Cisplatina	20
1.2 Cisplatina induz nefrotoxicidade	21
1.3 Vitamina D.....	24
2. HIPÓTESE.....	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Animais.....	33
4.2 Protocolo experimental	33
4.3 Dosagem de 25(OH) D sérica	35
4.4 Avaliação da função renal.....	35
4.5 Estudo histológico.....	35
4.6 Estudo Imunoistoquímico	36
4.7 Western Blot	37
4.8 ELISA	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Avaliação da função renal.....	40
5.2 Estudo histológico.....	40
5.3 Avaliação de 25-OH vitamina D, VDR e o receptor de cubilina.....	41
5.4 Calcitriol atenua a lesão renal provocada por CP	42
5.5 Calcitriol atenua o processo inflamatório provocado pela CP.....	45
5.6 Calcitriol atenua o dano endotelial induzido pela CP	46
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS	61
9. APÊNDICES	85

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cisplatina

A cisplatina (CP), denominada quimicamente de cis-diaminodicloroplatina (CDDP), foi descoberta em 1844 por Michele Peyrone e por muito tempo foi chamada de sal de Peyrone (PEYRONE, 1844). Porém, apenas em 1965 que seu mecanismo anti-mitótico foi reconhecido pelo biofísico Dr. Barnett Rosenberg (TRIMMER; ESSIGMANN, 1999). A descoberta ocorreu acidentalmente durante um estudo dos efeitos do campo elétrico no crescimento bacteriano utilizando platina como eletrodo e cloreto de amônio como tampão. Foi observado que as bactérias estudadas tinham sua divisão celular interrompidas quando o campo elétrico era aplicado, sugerindo a ação inibitória da CDDP na divisão celular de bactérias (ROSENBERG *et al.*, 1965).

Após uma série de testes de bancada, pesquisas pré-clínicas, além de ensaios clínicos, a CDDP foi, em 1978, aprovada pelo *Federal Drug Administration* (FDA) para uso clínico como agente quimioterápico e recebeu o nome de CP. Este medicamento é extensamente utilizado para tratamento de tumores sólidos, como, testicular, ovariano, de bexiga, pulmão, colo do útero, câncer de cabeça e pescoço e alguns outros tipos de cânceres (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; GWO *et al.*, 2016). Composta por um complexo quadrado-planar, a CP, é formada por dois ligantes de íon cloreto (Cl⁻) e dois ligantes de amônia inerte (NH₃) coordenados ao átomo central de platina (Pt) em uma configuração cis (HANNON, 2007).

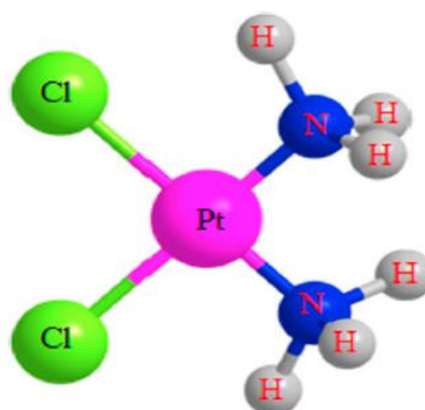


Figura 1. Estrutura tridimensional da cisplatina. Figura retirada do artigo de HANNON, 2007.

A CP age principalmente na replicação e a transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA), interrompendo o ciclo celular e interferindo em diversas vias que controlam a

diferenciação e a resposta ao estresse, que posteriormente, culminam na ativação de vias apoptóticas (SIDDIK, 2003). A importância da CP no tratamento do câncer é reconhecida e associada à remissão completa ou parcial da doença. Embora tenha se tornado um medicamento bastante utilizado na clínica, seu uso é limitado devido aos seus efeitos colaterais (COHEN; LIPPARD, 2001; WANG; LIPPARD, 2005) como, neurotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (PERES; DA CUNHA, 2013; ZHU *et al.*, 2015).

1.2 Cisplatina induz nefrotoxicidade

Estima-se que aproximadamente 30% dos pacientes que recebem uma dose inicial de CP podem desenvolver algum grau de insuficiência renal aguda (KIDERA *et al.*, 2014; PERES; DA CUNHA, 2013; PRASAJA *et al.*, 2015; LATCHA *et al.*, 2016). A lesão renal aguda (LRA) é a lesão comumente associada a ação nefrotóxica da CP no tecido renal (HANIF *et al.*, 2020) e é caracterizada por uma diminuição acentuada na taxa de filtração glomerular (TFG), com aumento agudo nos níveis de creatinina sérica (Cr) e diminuição no débito urinário (KDIGO, 2012). Embora, a nefrotoxicidade induzida pela CP possa se manifestar de várias maneiras, a necrose tubular aguda (NTA) é a mais prevalente (MILLER *et al.*, 2010). A NTA é caracterizada por uma dilatação da luz tubular, perda da bordadura em escova nos túbulos proximais e presença de células em necrose na luz tubular (ZANETTI *et al.*, 2010).

A via renal é a principal forma de excreção da CP, cerca de 50% da droga é excretada na urina nas primeiras 48h (VISACRI *et al.*, 2017). A CP é livremente filtrada e age principalmente nas células dos túbulos proximais, mais especificamente no segmento S3, que corresponde a porção reta dos túbulos proximais, localizada na medula externa renal (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; HOLDITCH *et al.*, 2019), onde as concentrações de CP são maiores devido ao acúmulo da droga (CIARIMBOLI, 2014; FILIPSKI *et al.*, 2009). A CP é captada pelas células tubulares renais por difusão passiva ou transporte ativo (GOMEZ-SIERRA *et al.*, 2018) por transportadores como o transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) e o transportador de cobre 1 (Ctr1) (YAO, *et al.*, 2007). Enquanto a sua remoção para o lúmen tubular é realizada pelo transportador de extrusão de multidroga e toxinas 1 (MATE1) (RIDZUAN *et al.*, 2019). Dentro da célula tubular renal, a CP é ativada metabolicamente (TOWNSEND *et al.*, 2003) em uma substância altamente reativa e nefrotóxica (COOPER *et al.*, 2011). Os mecanismos presentes na LRA induzida por CP são complexos e envolvem principalmente lesão tubular intensa, resposta inflamatória, estresse oxidativo e disfunção endotelial (OZKOK; EDELSTEIN, 2014; ZHU *et al.*, 2015).

A lesão e morte das células tubulares são mecanismos fundamentais, que contribuem para o início e progressão da LRA (LAMIERE *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018). Inicialmente, a ativação de vias de morte celular leva a perda do epitélio tubular, resultando em alterações nas células epiteliais tubulares, como perda da borda em escova, achatamento tubular e rápida perda da polaridade celular (SOLEZ *et al.*, 1979; MOLITORIS *et al.*, 1988). Em decorrência da lesão tubular intensa, as células epiteliais tubulares mudam do fenótipo epitelial para mesenquimal em um processo conhecido como transição epitelial-mesenquimal (TEM) e passam a expressar marcadores de fenótipo mesenquimal, como a vimentina, e marcadores de proliferação celular, como o antígeno nuclear das células em proliferação (PCNA) (WILZGAL *et al.*, 1994; FUJIGAKI *et al.*, 2006). As células epiteliais tubulares, no contexto da LRA, podem assumir o fenótipo de células inflamatórias e fibrogênicas, que impulsionam a progressão da doença renal aguda para a doença renal crônica (LIU *et al.*, 2018). A inflamação tubulointersticial pode ser observada já no início da LRA (LV *et al.*, 2017) e a resposta das células epiteliais tubulares à lesão parece ser um determinante chave no seu desenvolvimento (LIU *et al.*, 2018).

A inflamação é um dos principais mecanismos fisiopatológicos associados a LRA induzida por CP (FURUICHI *et al.*, 2009; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2011; MALIK *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020) e é regulada pela interação complexa entre citocinas inflamatórias e imunossupressoras produzidas pelas células epiteliais tubulares renais lesionadas ou por células imunológicas infiltradas nos rins (ANSARI *et al.*, 2017). Os macrófagos desempenham um importante papel na nefrotoxicidade induzida por CP (ZHANG *et al.*, 2009; VANDENABEELE *et al.*, 2010), induzindo a ativação de inflamassoma, das vias de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fator nuclear kappa B (NFκB), resultando no aumento da produção de citocinas inflamatórias, como interleucina 1 beta (IL-1β) (CHAI *et al.*, 2020). A importância funcional dos macrófagos na LRA é demonstrada pelo fato de que a depleção sistêmica de monócitos e macrófagos atenuar a LRA (FERENBACH *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014). Os macrófagos, residentes no tecido renal e recrutados, são classificados em dois subconjuntos funcionais: macrófagos classicamente ativos (M1), que estão associados a respostas imunológicas pró inflamatórias; e macrófagos alternativamente ativos (M2), envolvidos principalmente no reparo tecidual (MILLS, 2012). Os macrófagos M1 são responsáveis por secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias com IL-1β e TNF-α (JUBAS *et al.*, 2015; VAROL *et al.*, 2015), enquanto os macrófagos M2 secretam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. A IL-1β está envolvida no recrutamento de monócitos circulantes para o parênquima renal inflamado (WALSH, 1994).

O receptor 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) desempenha um papel vital no processo inflamatório (TÖGEL *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; SLEIGHTHOLM *et al.*, 2017), a sua ativação leva a uma variedade de respostas, como quimiotaxia, proliferação celular e hematopoiese de leucócitos (ZLOTNIK *et al.*, 2011). Evidências recentes mostram que o CXCR4 está envolvido na patogênese da LRA (TÖGEL *et al.*, 2005), uma vez que a sua expressão aumentada em túbulos e leucócitos agrava a LRA e contribui para a formação de fibrose renal. A inibição do CXCR4 foi associada a um efeito benéfico em modelos animais experimentais de LRA, tanto por efeitos anti-inflamatórios locais ou quanto por mecanismos sistêmicos dependente da mobilização de células-tronco (ZUK *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015).

Estudos demonstraram que as mitocôndrias renais são alvos da toxicidade pela CP (KUO *et al.*, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2015; HANIF *et al.*, 2020). A CP induz aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) resultando em morte celular (VONEZEWA *et al.*, 2016), associado a uma redução na produção e inibição da atividade dos antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutatona (GSH) (WANG *et al.*, 2016) e catalase (CAT) (JESSE *et al.*, 2014), culminando no estabelecimento do estresse oxidativo, que é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e a remoção de EROs pelo sistema de defesa antioxidante (MARULLO *et al.*, 2013). O estresse oxidativo induzido pelo aumento da produção de EROs e a inflamação tubulointersticial (HOLDITCH *et al.*, 2019) resulta em danos endoteliais, comprometendo o relaxamento vascular dependente do endotélio. O relaxamento dependente do endotélio é dependente do óxido nítrico (NO), logo alterações na sua produção ou biodisponibilidade interferem diretamente nesse processo. Além disso, a função da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é prejudicada quando a produção de EROs não é controlada (COATS; JAIN, 2017). A lesão e a disfunção vascular tem sido associada na patogênese da LRA induzida por CP (WINSTON; SAFIRSTEIN, 1985; OZKOK; EDELSTEIN, 2014). A redução do fluxo sanguíneo renal, vasoconstrição elevada e a autorregulação vascular prejudicada estimulada por danos ao endotélio (PABLA; DONG, 2008), resultam em resistência vascular e constrição das células musculares lisas vasculares, levando à diminuição da TFG e hipóxia das células tubulares renais (OZKOK; EDELSTEIN, 2014; GUO *et al.*, 2018). O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um mediador fundamental para a promoção da vasculogênese e da remodelação angiogênica e exerce seus efeitos através da ativação do receptor tirosina quinase, o receptor VEGF 2 (VEGFR-2) (TAMMELA *et al.*, 2005). O VEGF desempenha um papel fundamental na microcirculação renal (BASILE *et al.*, 2011). Os níveis de VEGF estão reduzidos em muitos modelos de doenças renais, principalmente acometem os túbulos proximais (KANG *et al.*, 2001).

A nefrotoxicidade induzida pela CP é complexa, o diagnóstico precoce é difícil e faltam opções de tratamento eficazes. As abordagens primárias para proteger os rins da nefrotoxicidade induzida pela CP são baseadas em evitar a sua exposição extrema a este medicamento. No entanto, mesmo com hidratação intensa, ocorre toxicidade renal (HAKIMINIA *et al.*, 2019; MILLER *et al.*, 2010). Portanto, estratégias preventivas mais eficazes para atenuação da sua nefrotoxicidade precisam ser desenvolvidas.

1.3 Vitamina D

A vitamina D é um nutriente lipossolúvel, crucial para a absorção intestinal e para a regulação do metabolismo de cálcio e fosfatos (BIKLE, 2012). As isoformas ergocalciferol (vitamina D₂), sintetizado apenas em plantas e fungos, e o colecalciferol (vitamina D₃), produzido endogenamente a partir da fotólise do 7-desidrocolesterol (7-DHC) na pele pela radiação UVB do sol (JÄPELT; CHRISTAKOS, 2020), precisam passar por hidroxilação em duas etapas para se transformarem na forma biologicamente ativa, o 1,25(OH)₂D³ (calcitriol). A radiação UVB ao atingir a pele desencadeia uma reação fotoquímica que converte 7-DHC em pré-vitamina D₃ e após uma série de isomerizações térmicas se torna a vitamina D₃ (BIKLE, 2014). As vitaminas D₂ e D₃ circulantes chegam ao fígado para que os citocromos hepáticos P450 CYP2R1 (microssomal) e CYP27A1 (mitocondrial) hidroxilem seu carbono 25, resultando na produção de 25(OH)D (calcidiol), a forma circulante e mais abundante de vitamina D, que ainda é inativa (JONES *et al.*, 2014).

De volta à circulação, a 25(OH)D é transportada pela proteína de ligação à vitamina D (VDBP) até os rins e é filtrada pelo glomérulo, o complexo VDBP-25(OH)D é endocitado para dentro da célula do túbulo proximal por um complexo de proteínas transmembranas localizado na membrana apical dessa célula, denominado de megalina-cubulina. Uma vez dentro da célula, a 25(OH)D é hidroxilada na posição do carbono 1, pelo CYP27B1 ou 1 α -hidroxilase, resultando na formação de 1,25(OH)₂D³, a forma ativa da vitamina D, também conhecida como calcitriol, que é responsável pelas suas ações biológicas (JONES; PROSSER, 2011; JONES *et al.*, 2014). Os níveis de calcitriol são regulados pela enzima CYP24A1, um citocromo P450 da membrana interna mitocondrial (JONES *et al.*, 2012), que detecta níveis elevados de 1,25(OH)₂D e o catalisa em produtos 24-hidroxilados direcionados para excreção ou produzindo 24,25(OH)₂D diminuindo assim o pool de 25(OH)D (JONES *et al.*, 2012).

A calcitriol ligada a VDBP atinge os órgãos alvo na circulação sistêmica, onde liga-se ao receptor de vitamina D (VDR). O calcitriol exerce a maior parte de suas funções via VDR

nuclear, um receptor que pertence a um amplo grupo de fatores de transcrição nuclear ativados por ligantes e funciona como um heterodímero obrigatório com o receptor retinóide X (RXR) para ativação de genes alvo da vitamina D (ZELLA *et al.*, 2006; PIKE *et al.*, 2010; HAUSSLER *et al.*, 2013). O complexo VDR/RXR, liga-se aos elementos de resposta à vitamina D (VDRE) em genes alvo regulando a transcrição gênica. A via VDR interage com outras vias de sinalização intracelular para exercer seus efeitos biológicos. Em alguns casos, calcitriol exerce sua influência sem afetar a expressão gênica ou a síntese protéica por conta disso, as ações são divididas em genômicas e não genômicas (KHAMMUSSA *et al.*, 2018) (Figura 2).

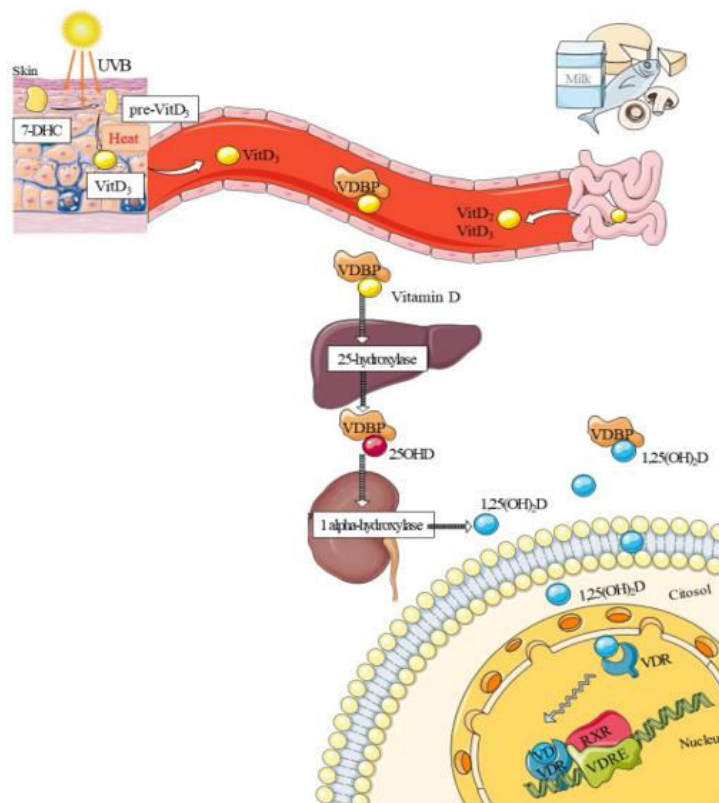


Figura 2. Mecanismo de ativação da vitamina D. A radiação solar converte 7 desidrocolesterol (7-DHC) em pré-vitamina D (pré-vit D3) e isomeriza-o termicamente em vitamina D3 (VitD3). Alguns alimentos são fonte de vitamina D2 e D3 em quantidades menores. A vitamina D é transportada através do plasma pela proteína de ligação à vitamina D (VDBP) e sofre duas hidroxilações; no fígado, é convertido pela enzima 25 hidroxilase em 25-hidroxivitamina D (25OHD), e nos rins, a enzima 1 alfa-hidroxilase o converte em 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)2D), a forma ativa da vitamina D. Fonte: Figura retirada de SILVA *et al.* 2022.

A função primária e mais conhecida do calcitriol é a manutenção dos níveis normais de cálcio e o desenvolvimento ósseo, regulando o metabolismo de fósforo e cálcio (KHAMMUSSA *et al.*, 2018). O calcitriol participa da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio ionizado e fósforo, suas ações envolvem a absorção intestinal, excreção renal e mobilização óssea de cálcio. Os níveis séricos de cálcio diminuídos estimulam a secreção de paratormônio (PTH) e ativam a síntese de calcitriol. Ambos, PTH e calcitriol, estimulam a reabsorção renal e a mobilização do cálcio dos ossos (reabsorção óssea) (CLINCKSPOOR *et al.*, 2013).

A presença de VDRs em vários outros tecidos (próstata, cérebro, mama, pâncreas, cólon e células do sistema imunológico), permitiu a descoberta de que a vitamina D pode fornecer ações não relacionadas a homeostase óssea, conhecidas como ações não clássicas (KHAMMUSSA *et al.*, 2018). A vitamina D pode desempenhar um papel importante na função imunológica e na regulação da proliferação e diferenciação celular em uma variedade de linhagens celulares, como linfócitos, células endoteliais, osteoblastos e queratinócitos (CARLBERG, 2016; KHAMMUSSA *et al.*, 2018). A ação imunomoduladora da vitamina D está associada a ativação da imunidade inata e a inibição da resposta adaptativa, associada a liberação de citocinas. Isso acontece porque os diferentes tipos de células imunológicas, como, células dendríticas, macrófagos e linfócitos T e B expressam VDR, sendo a maioria capaz de sintetizar calcitriol através de uma via de regulação independente, em resposta a uma variedade de agentes pró-inflamatórios como bactérias, lipopolissacarídeos e TNF- α (FELDMAN *et al.*, 2013). Nos macrófagos, a vitamina D aumenta a sua capacidade de defesa induzindo a sua diferenciação, capacidade fagocítica e atividade antimicrobiana. Além disso, inibe a proliferação de monócitos e promove a diferenciação de monócitos em macrófagos. O calcitriol inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , e estimula a produção de IL-10 (DELUCA, 2008; CHRISTAKOS *et al.*, 2016).

Os VDRs também são expressos em células endoteliais, células musculares lisas vasculares e cardiomiócitos (BRANDENBURG *et al.*, 2012). Foi sugerido que a vitamina D e os VDRs poderiam desempenhar um papel fundamental na regulação da síntese de NO através da eNOS (NAPOLI *et al.*, 2006; ANDRUKHOVA *et al.*, 2014), visto que em animais nocautes para VDR em células endoteliais apresentavam biodisponibilidade reduzida de NO (DEDEOGLU *et al.*, 2014). Enquanto o tratamento com vitamina D regulou positivamente a expressão de NO e eNOS (LI *et al.*, 1997). Posteriormente essas descobertas foram testadas em um experimento *in vivo* no qual ratos *Wistar* tratados com calcitriol, via injeção intraperitoneal,

mostraram uma regulação positiva semelhante do conteúdo de NO e eNOS nos tecidos da aorta (LI *et al.*, 1997). As ações não genômicas da vitamina D através do VDR de membrana também pode regular positivamente a atividade intracelular da eNOS através da via intracelular dependente de cálcio. Além disso, foi demonstrado que a vitamina D induz a migração e proliferação endotelial, mecanismos importantes para a angiogênese (GRIENGLING *et al.*, 2000), e a produção de NO induzida pela vitamina D é responsável por parte desse processo fisiológico (MICHELL, 1999). Através de estudos *in vivo* e *ex vivo* as ações pró-angiogênicas do NO foram demonstradas, mostrando que o NO estimula a formação de estruturas semelhantes a capilares em células endoteliais umbilicais humanas e na artéria coronária humana em uma matriz 3D (BABAEI *et al.*, 1998; PIETSCH *et al.*, 2003) A formação de novos vasos sanguíneos mediada por NO envolve a regulação positiva da expressão gênica de fatores de crescimento angiogênico, incluindo o VEGF e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e a supressão de fatores antagonistas da angiogênese, como a angiostatina, um antagonista endógeno (ZICHE *et al.*, 1997; DOROUDI *et al.*, 2015; LUNDWALL *et al.*, 2018).

Estudos demonstraram que a vitamina D tem participação importante no desenvolvimento renal, mas especificamente na modulação angiogênica (ALMEIDA *et al.*, 2016). Além disso, estudos recentes utilizando diferentes modelos de doença renal estabeleceram claramente que os análogos da vitamina D têm efeitos renoprotetores contra lesão renal e progressão da doença renal. Ersan cols. (2017) estudaram o efeito do paricalcitol na expressão de metaloproteinases de matriz, o pré-tratamento com paricalcitol resultou na melhora da IRI-LRA através de um mecanismo antiinflamatório.

Efeito semelhante foi observado por Hamzawy cols., (2019) com o pré-tratamento com 22-oxacalcitriol na IRI-LRA e demonstraram uma melhora da LRA, e este efeito foi associado a: (1) um mecanismo antiinflamatório via inibição do receptor Toll-like-4 (TLR-4) e interferon- γ (IFN- γ), (2) uma ação pró-autofágica elevada (3) uma ação antiapoptóticas, (4) uma ação inibitória na expressão de metaloproteinases de matriz-2. O efeito renoprotetor do pré-tratamento com vitamina D na IRI-LRA também foi demonstrado contra a oxidação e peroxidação lipídica (KAPIL *et al.*, 2013). Por fim, Reis cols. (2019) estudaram o impacto do calcitriol na LRA induzida por rabiomólise e descobriram que a LRA foi melhorada através de um mecanismo anti-inflamatório e antioxidante através da elevação da SOD.

Hipótese

2. HIPÓTESE

A CP é um importante quimioterápico utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos, mas tem uso limitado devido os seus efeitos nefrotóxicos, associados ao desenvolvimento de LRA. A LRA é caracterizada por um rápido declínio da TFG e acúmulo de resíduos metabólicos (creatinina e ureia), além de lesão tubular intensa com a presença de NTA. Devido à complexidade da nefrotoxicidade e a dificuldade do seu diagnóstico precoce, há a necessidade do desenvolvimento de abordagens que protejam os rins da nefrotoxicidade por CP. Nesse sentido, a vitamina D tem surgido como um potencial agente protetor, porém como a vitamina D ativa poderia modular a LRA no modelo de CP ainda não está totalmente esclarecido. Diante disso, nosso objetivo foi testar a hipótese de que o tratamento prévio com a vitamina D na sua forma ativa (calcitriol), atenua ou até mesmo proteger o tecido renal da toxicidade induzida por CP, através das suas ações anti-inflamatórias e de redução do estresse oxidativo, bem a manutenção da função endotelial, eventos envolvidos na LRA.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do tratamento com calcitriol na evolução da lesão renal aguda provocada pela CP e a participação do estresse oxidativo, diferenciação celular, processo inflamatório e da estrutura e função das células endoteliais nesse processo.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento com calcitriol iniciado antes da administração de CP :

- Nas alterações de função renal: creatinina plasmática, taxa de filtração glomerular, e excreção fracional de sódio;
- Nas alterações dos níveis de 25(OH)D e na expressão do receptor VDR;
- Nas alterações de estrutura renal da medula externa em cortes corados com tricrômio de Masson e imunistoquímica para vimentina, PCNA e cubulina;
- No processo inflamatório pela expressão de ED-1 e secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, IL-1 β e IL-10, respectivamente e expressão de CXCR4;
- Nas alterações de capilares peritubulares da medula externa pela imunistoquímica para JG12 e expressão proteica de eNOS, p-eNOS, VEGF e VEGFR2.
- Na modulação da atividade antioxidante de SOD.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os protocolos foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), protocolo nº 115/2018). Neste estudo, foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar Hannover*, pesando em torno de 200-300 gramas, provenientes do Biotério Central da FMRP-USP. Os ratos foram alojados em caixas de acrílico forradas com maravalha, sendo mantidos 4 animais por caixa e condições ambientais controladas, com temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*.

4.2 Protocolo experimental

A suplementação com calcitriol (6 ng / dia, Calcijex, Abbvie Laboratories, EUA) ou veículo (NaCl 0,9%) foram administrados por meio de minibombas osmóticas (modelo 2004, Alzet, EUA) implantadas subcutaneamente no dorso dos animais sob anestesia com isoflurano (Cristalia, Brasil). A utilização dessas mini-bombas permite a manutenção dos níveis de Vit. D plasmáticos dos animais. A dose e a via de administração de calcitriol foram baseadas em estudos anteriores (PANICHI *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2019; DELUQUE *et al.*, 2020). O tratamento com calcitriol foi contínuo por todo o período experimental. O tratamento com calcitriol foi contínuo por todo o período experimental. Após duas semanas do implante das minibombas osmóticas, os animais receberam uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de cisplatina (CP, Fauldcispla5mg/kg) ou salina/veículo (NaCl 0,9%), e foram acompanhados por 5 dias.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- **SAL:** ratos que receberam apenas o veículo (solução de NaCl a 0,9%) pela mini-bomba osmótica + uma única injeção i.p. do veículo (solução de NaCl a 0,9%) n=5;
- **SAL + Calcitriol:** ratos que receberam o tratamento com calcitriol (6 ng/dia) pela mini-bomba osmótica + uma única injeção i. p. do veículo (solução de NaCl a 0,9%) n=5;
- **CP:** ratos que receberam o veículo (solução de NaCl a 0,9%) pela mini-bomba osmótica + uma única injeção i.p. de cisplatina (5 mg/Kg) n=8;

- **CP + Calcitriol:** ratos que receberam o tratamento com calcitriol (6 ng/dia) pela mini-bomba osmótica + uma única injeção i. p. de cisplatina (5 mg/Kg) n=8.

No quarto dia após a injeção de CP, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas (h). No dia seguinte, os animais foram pesados e anestesiados (xilazina 0,1ml/100g e cetamina 0,05ml/100g, i.p.) e a aorta abdominal canulada para coleta de amostras de sangue e então, eutanasiados.

Os rins foram removidos, parte do rim esquerdo foi fixado em Methacarn (metanol à 60%, clorofórmio à 30% e ácido acético a 10%) por 24h e depois a solução foi substituída por álcool 70%, para posterior processamento dos cortes para as análises histológicas e imunoistoquímicas. A outra parte do rim esquerdo foi armazenado em -70°C e posteriormente utilizado para os estudos de *Western Blot* e ELISA.

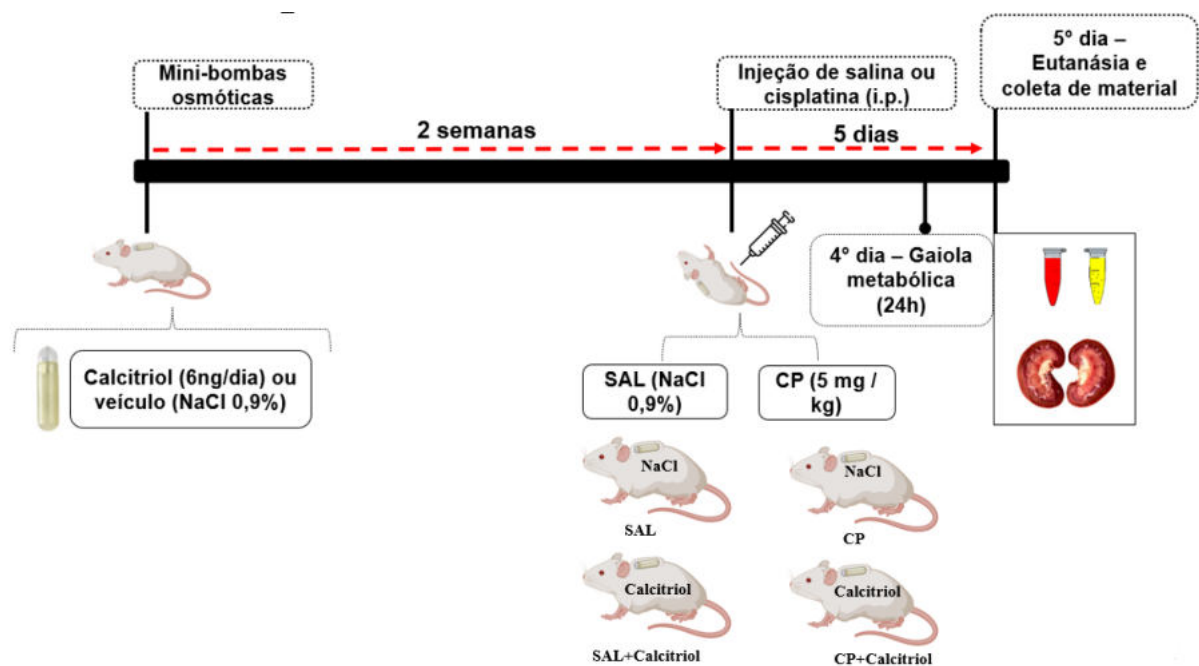


Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental. Ratos Wistar Hannover foram tratados previamente (2 semanas antes) com calcitriol (6ng/dia), antes de receberem uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de CP (5mg/kg). No quarto dia após a injeção, foram colocados em gaiolas metabólicas por 24h e no dia seguintes foram anestesiados e eutanasiados para coleta de sangue (plasma e soro) e tecido renal para análises de imunoistoquímica, Western Blot e ELISA. Figura do próprio autor.

4.3 Dosagem de 25(OH) D sérica

A quantificação de 25(OH)D sérica dos animais foi realizada pelo teste direto competitivo, baseado no princípio de quimioluminescência (CLIA) (Liaison®, Itália)). Esse teste foi realizado nos Laboratórios de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que participam de certificações nacionais e internacionais de garantia de qualidade.

4.4 Avaliação da função renal

A função renal foi avaliada com amostras de urina de 24h e plasma. A creatinina plasmática e a urinária foram determinadas por método colorimétrico usando ácido pícrico como cromógeno (HAUGEN, 1953). O sódio urinário e plasmático foram analisados utilizando a técnica de quantificação de eletrodo seletivo de íons (9180 Electrolyte Analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha, 2004). A excreção fracional de sódio foi calculada dividindo a depuração de sódio pela depuração (*clearance*) de creatinina. Os resultados da quantificação de creatinina plasmática e urinária foram utilizados para estimar a Taxa de Filtração Glomerular (TFG).

4.5 Estudo histológico

Cortes histológicos (3 µm de espessura) foram corados utilizando Tricrômio de Masson e examinados sob microscopia de luz. As alterações tubulointersticiais definidas como desnudamento da membrana basal, dilatação do lúmen tubular e presença de células na luz do túbulo, foram avaliadas com o uso de escores que variaram de 0 a 4 e refletiram a porcentagem da área da medula externa acometida, onde: 0 normal; 1 envolvimento de menos de 10% da medula externa renal; 2 envolvimento de 10-25% da medula externa renal; 3 envolvimento de 25-75% da medula externa renal; 4 acometimento de mais de 75% da medula externa renal (FRANCESCATO *et al.*, 2011). Foram avaliados 30 campos consecutivos de 0,1 mm² e calculados os valores médios por rim. Para a avaliação das alterações histológicas e imunoistoquímica para vimentina foram utilizados os seguintes escores:

Tabela 1. Escores utilizados para análise histológica e imunoistoquímica.

Escores	Análise histológica e imunoistoquímica
0	Entre 0% a 5% da área acometida
1	Entre 5% e 25% da área acometida
2	Entre 25% e 50% da área acometida
3	Entre 50% e 75% da área acometida
4	Entre 75% a 100% da área acometida

Fonte: Kleim et al., 1996.

4.6 Estudo Imunoistoquímico

Para as análises imunoistoquímicas, as secções de tecido renal de 4 µm de espessura foram desparafinizadas com três banhos consecutivos de xilol e, em seguida, os cortes foram hidratados com três banhos de álcool em concentrações decrescentes de água (100%, 95% e 75%). Os cortes hidratados passaram pelo bloqueio da atividade da peroxidase endógena (azida sódica 10% e água oxigenada 30%) e um banho de PBS. Os cortes então foram incubados por 60 minutos em temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários:

- **anti-ED1** (1:1000), monoclonal (Serotec, Reino Unido), Este anticorpo reage apenas contra antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos.

- **anti-PCNA** (1:1000), monoclonal (Sigma Chemical Company, USA). Este anticorpo reage com antígenos presentes nos núcleos de células que estão em fase de proliferação celular.

- **anti-vimentina** (1:500), monoclonal (Dako Corporation, Dinamarca). Este anticorpo é um marcador de lesão da célula tubular recente, as células expressam vimentina apenas quando estão proliferando, evidenciando lesão recente.

- **anti-cubulina** (1:200) policlonal (Santa Cruz Biotechnology, EUA). A cubulina é um receptor endocítico envolvido na reabsorção da Vit. D e de proteínas como a VDBP presentes na luz dos túbulos proximais.

- **anti-aminopeptidase P (JG12)** (1:1000) monoclonal de camundongo (Bioscience, EUA), foi utilizado como marcador de células endoteliais da medula externa renal.

Após a incubação com o anticorpo primário os cortes passaram por três lavagens com PBS e foram submetidos a uma nova incubação, com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo

(1:200 – monoclonal) ou de coelho (1:100 - para os anticorpos primários policlonais). A reação foi detectada com o sistema avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories) e a adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) e cloreto de níquel, juntamente com peróxido de hidrogênio provocou o desenvolvimento de cor e a contra coloração foi realizada com *metilgreen*. Os resultados das reações imunoistoquímicas para os anticorpos anti-JG12, anti-ED1 e anti-PCNA foram avaliados pela contagem de células positivas em 30 campos de medula externa renal consecutivos medindo 0,1 mm². A reação para cubulina foi avaliada pela contagem do número de túbulos íntegros marcados na medula externa renal em 30 campos consecutivos medindo 0,1 mm². Enquanto, que, a reação para vimentina foi avaliada utilizando escore de 0 a 4 (Tabela 1) em 30 campos consecutivos medindo 0,1 mm². Os resultados foram expressos como a média dessas análises para cada rato.

4.7 Western Blot

Para realizar o Western Blot, os tecidos renais não perfundidos foram homogeneizados em tampão de lise: Tris-HCL (50 Mm, pH 7,4), NaCl (150 mM), triton X-100 (1%), dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,1%), aprotinina (1 µg/mL), leupeptina (1 µg/mL), fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 Mm), ortovanato de sódio (1 mM, pH 10), pirofosfato de sódio (1 mM), fluoreto de sódio (25 Mm), ácido etilenodiamino tetra-acético (0,001 M EDTA, pH 8) e centrifugadas (10.000 rpm/15 min) a 4°C (FRANCESCATO *et al.*, 2018). O sobrenadante foi separado para dosagem de proteínas e o método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificação de proteínas.

As expressões renais de eNOS, p-eNOS, EC-SOD, VEGF, VEGFR2, CXCR4, CD34, vimentina e VDR foram avaliadas. Amostras de lisado renal contendo 30, 60 ou 90 µg de proteína foram solubilizadas em tampão de amostra, aquecidas a 100°C por 5 minutos e depois aplicadas a um gel de poliacrilamida a 10 ou 12%. Após a corrida, as amostras foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose e em seguida foram coradas com Ponceau, para melhor visualização da transferência. As membranas foram incubadas ou não por 1h em tampão de bloqueio a 5% (TBSt contendo 5% de leite desnatado). Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBSt e incubadas com os anticorpos primários: anti-eNOS (1/200, policlonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-p-eNOS (1/200, policlonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-EC-SOD (1/500, policlonal, Stressgen, EUA), anti-VEGF (1/500, monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-VEGFR2 (1/200, policlonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-CXCR4 (1/1000, policlonal, LifeSpan BioSciences Inc.,

EUA), anti-VDR (1/500, monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-Vimentina (1/500, monoclonal, Dako, Dinamarca), um anti-CD34 (1/400, policlonal, BIOss, EUA) e/ou anti-GAPDH (1/1000, policlonal, Cell Signaling Technology, EUA), as membranas foram incubadas *overnight* em câmara fria a -4 °C. As membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários anti-coelho (1/10.000) ou de camundongo (1/10.000) anti-IgG ligados ao peróxido (Dako, Dinamarca) por 1h à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente, o resultado da reação foi detectado com ECL (50 ml luminol, 22 ul de ácido cumárico, 3 ul de peróxido de hidrogênio, 1 ml tris e 9 ml miliQ e capturado pelo sistema de imagem Kodak Gel Logic 2200, EUA). A intensidade das bandas identificadas foi quantificada por densitometria com o software de imagem ImageJ software NIH (Research Services Branch, EUA) e expressa em unidades arbitrárias. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à média do grupo SAL, considerada como 100%.

4.8 ELISA

Os níveis de IL-1 β e IL-10 foram medidos em amostras de tecido renal, que foram armazenadas a -70 °C até a análise. O conteúdo foi determinado utilizando-se kits de ELISA de acordo com as diretrizes do fabricante (Alpco, Keewaydin Drive, EUA; Pierce, EUA, respectivamente). Os valores de IL-1 β e IL-10 foram relatados em pg/mg de proteína.

4.9 Análise estatística

Para dados com distribuição normal, foram aplicados a análise de variância (*one way* ANOVA) e os testes de comparação múltipla de Newman–Keuls. Para os dados não distribuídos normalmente, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. O ensaio Kolmogorov-Smirnov investigou a normalidade das variáveis dependentes. Os dados foram expressos em média \pm EPM. O GraphPad Prism versão 9.0 for Windows (GraphPad Software, EUA) foi utilizado para realizar a análise estatística e posterior construção do gráfico. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da função renal

Os animais tratados com cisplatina (grupo CP) apresentaram níveis elevados de creatinina pCr e FENa+, e redução TFG quando comparados aos grupos controle (SAL e SAL + Calcitriol). O grupo CP tratado com calcitriol apresentou melhora da função renal (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de creatinina plasmática (pCr), excreção fracional de sódio (FENa+) e taxa de filtração glomerular (TFG) dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol.

Grupo	SAL	SAL+Calcitriol	CP	CP+Calcitriol
pCr (mg %)	0.54 ± 0.03	0.45 ± 0.01	6.18 ± 0.74 ***; ●●●	1.89 ± 0.43 ■■■
FE _{Na+} (%)	0.25 ± 0.5	0.26 ± 0.02	2.23 ± 1.14 ***; ●●●	1.48 ± 0.24 **; ●
TFG (ml/ min ¹ 100 g ¹)	0.79 ± 0.03	1.46 ± 0.21	0.03 ± 0.01 ***; ●●●	0.52 ± 0.15 **; ●●; ■

Os dados foram expressos em média ± EPM. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. SAL; ●*p* < 0.05, ●●*p* < 0.01, ●●●*p* < 0.001 vs. SAL+Calcitriol.; ■*p* < 0.05, ■■■*p* < 0.001 vs. CP.

5.2 Estudo histológico

As características histológicas típicas da LRA induzida por CP, evidenciadas pela perda da borda em escova, necrose celular, dilatação tubular, descamação e obstrução, foram observadas em ambos os grupos injetados com este quimioterápico. Essas lesões túbulo-intersticiais, avaliadas por escore, estavam atenuadas nos rins dos animais tratados com calcitriol e injetados com CP (grupo CP+Calcitriol), em comparação com o grupo CP (Figura 4).

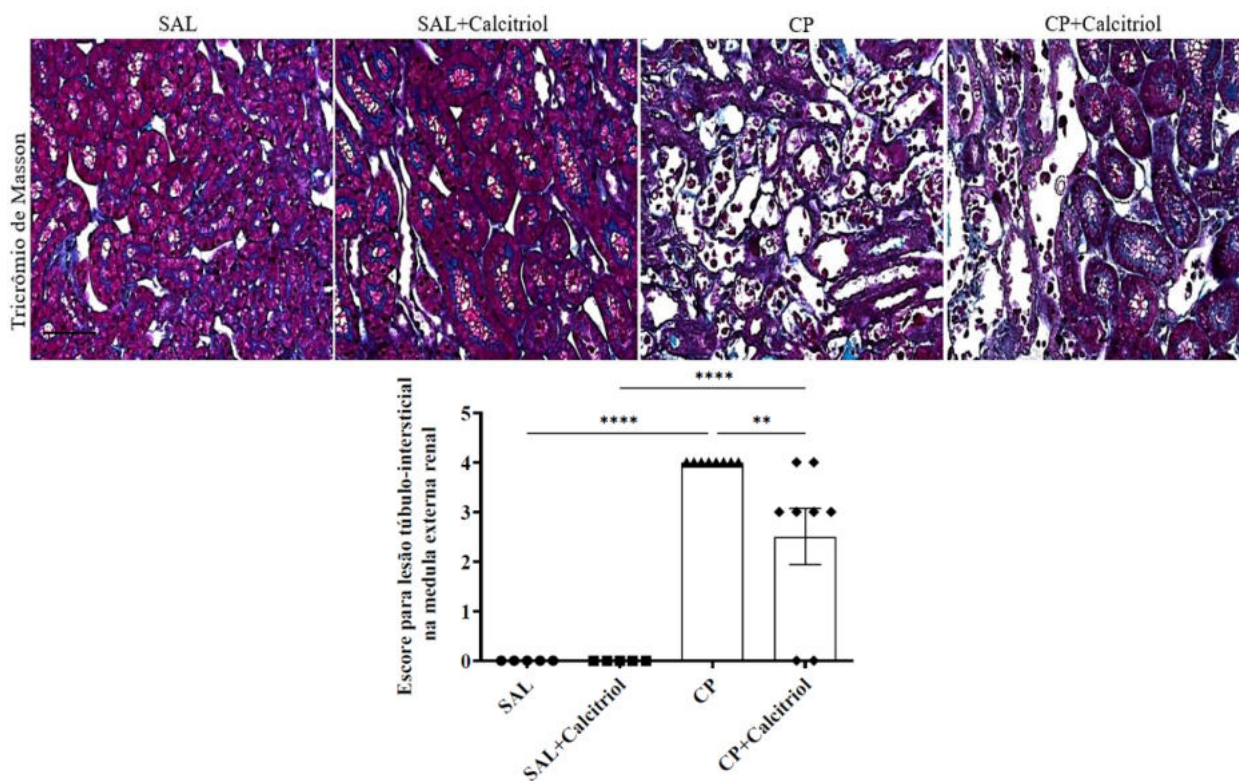


Figura 4. Cortes histológicas representativas da medula externa renal corados com Tricrômio de Masson, em aumento, $\times 400$. (A barra representa 50 μm). Escore para as lesões túbulo-intersticiais (TIL) na medula renal externa. Dados dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol. Os dados são expressos como média \pm EPM. (n = 5–8 para cada grupo). ** p < 0,01, **** p < 0,0001.

5.3 Avaliação de 25-OH vitamina D, VDR e o receptor de cubilina

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à concentração sérica média de 25(OH)D. Na análise de *Western Blot* houve redução da expressão de VDR no tecido renal no grupo CP em comparação com os grupos controles (SAL e SAL+calcitriol). A redução na expressão desta proteína induzida pela CP foi atenuada pelo tratamento com calcitriol. Também observamos na análise imunoistoquímica que o número de túbulos com borda em escova marcada com receptores cubilina foi menor no grupo CP em relação aos grupos controles (SAL e SAL + calcitriol). O tratamento com calcitriol também foi capaz de atenuar essas alterações (Figura 5).

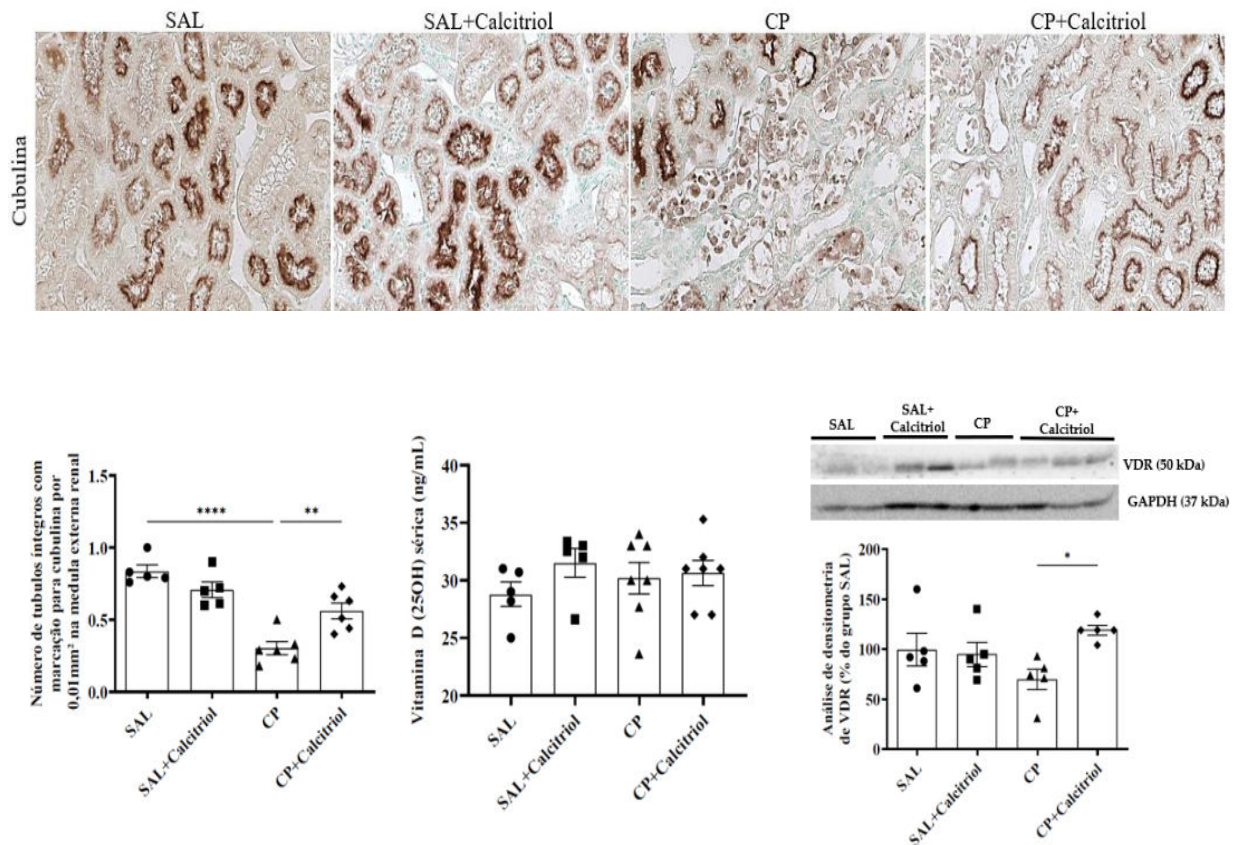


Figura 5. Imunolocalização de cubulina na medula externa renal. Aumento, $\times 400$. (A barra indica $50 \mu\text{m}$). Número de túbulos com borda em escova marcada com cubulina. Níveis séricos de 25(OH)D. Análise de Western blot de VDR e GAPDH no tecido renal. Densitometria de VDR. Dados dos grupos SAL, SAL + Calcitriol, CP e CP + Calcitriol. Os dados são expressos como média \pm EPM. ($n = 5-8$ para cada grupo) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

5.4 Calcitriol atenua a lesão renal provocada por CP

As células epiteliais expressam vimentina antes da diferenciação durante o desenvolvimento ou nos processos de transdiferenciação celular, processo conhecido como transição epitelial-mesenquimal (EMT) (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2013). Durante esse processo, essas células podem proliferar, migrar e produzir matriz extracelular. Portanto, esta proteína pode ser usada como marcador de dano celular (FAUBEL *et al.*, 2007; KLINBERG *et al.*, 2013). A análise imunohistoquímica mostrou aumento da expressão de vimentina na medula externa renal nos animais dos grupos CP e CP+Calcitriol em relação aos grupos controles (SAL e SAL+Calcitriol, respectivamente). O tratamento com calcitriol diminuiu a expressão de

vimentina na medula externa renal desses animais. Na análise densitométrica de tecido inteiro para vimentina, esse resultado foi semelhante. Observamos aumento dessa proteína no grupo CP em relação aos grupos controles SAL e SAL+Calcitriol, enquanto, o tratamento prévio com calcitriol atenuou a expressão de vimentina nos rins dos animais do grupo CP+Calcitriol (Figura 6).

A lesão tubular causada pela CP também foi avaliada através da proliferação celular, utilizando o PCNA como marcador, sendo este indicativo de lesão tubular recente. O número de células PCNA-positivas foi aumentado na medula externa renal dos animais injetados com CP em relação aos grupos controles (SAL e SAL + calcitriol), evidenciando uma intensa lesão tubular nestes animais. No entanto, tais alterações foram atenuadas pelo tratamento com calcitriol (Figura 6).

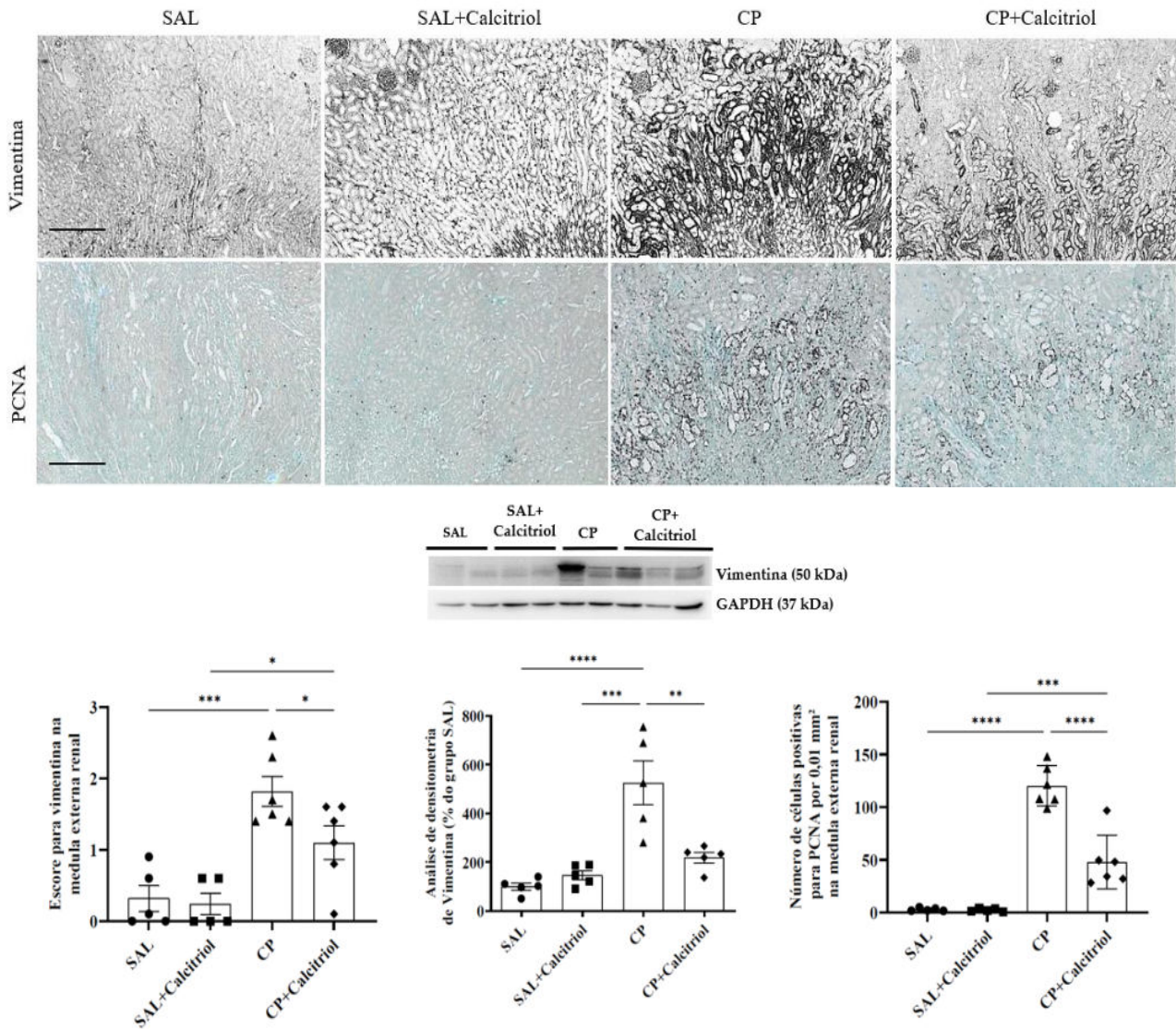


Figura 6. Imunolocalização de Vimentina e PCNA na medula externa renal. Aumento, $\times 200$. (A barra representa 50 μm). A pontuação para vimentina e o número de células PCNA-positivas na medula externa renal nos diferentes grupos. Análise de Western blot de vimentina e GAPDH no tecido renal. Densitometria de vimentina. Dados dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol. Os dados são expressos como média \pm EPM. ($n = 5-8$ para cada grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.5 Calcitriol atenua o processo inflamatório provocado pela CP

Um processo inflamatório evidenciado por uma grande infiltração de macrófagos (células ED1-positivas) no compartimento túbulo-intersticial da medula externa nos rins de ratos tratados com CP também foi observado quando comparados aos grupos controles (SAL e SAL+Calcitriol). no grupo CP+Calcitriol essa alteração foi menos intensa em relação ao grupo CP (Figura 7).

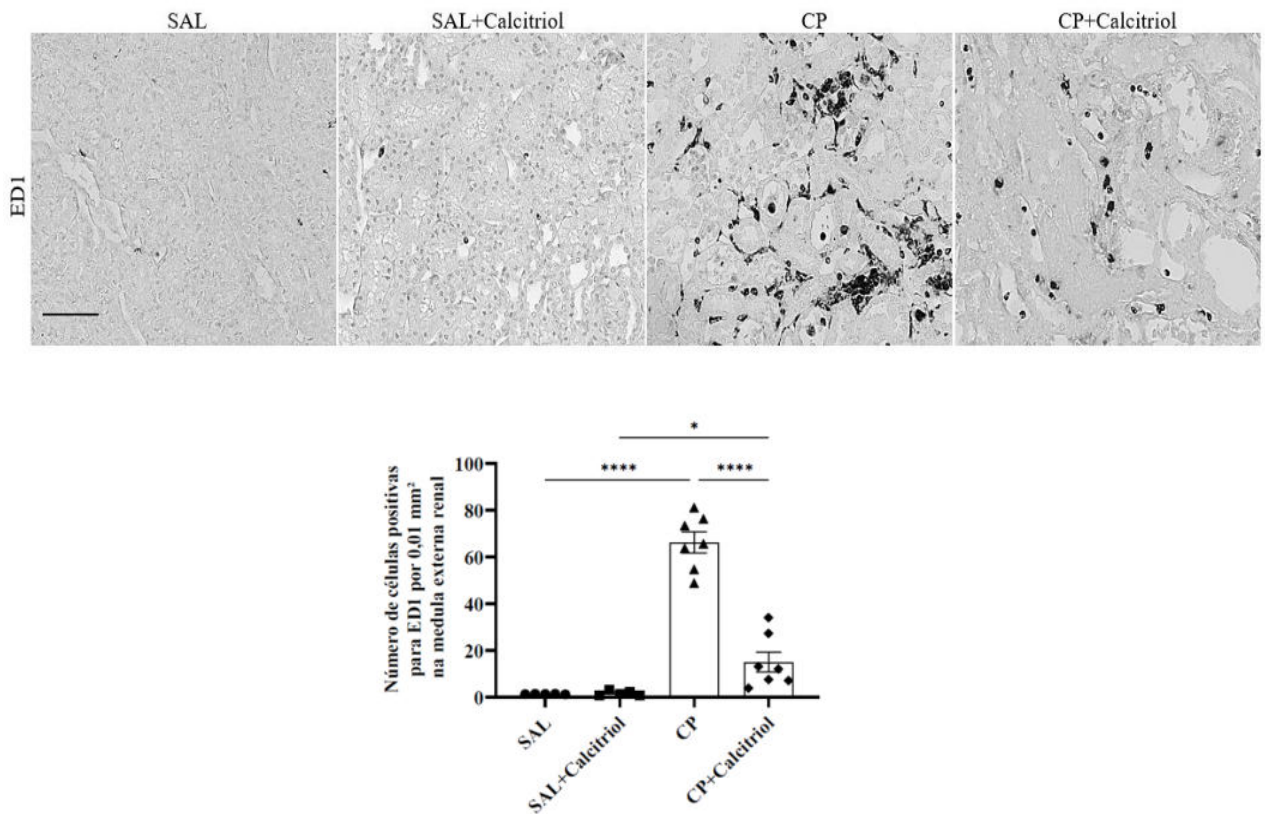


Figura 7. Imunolocalização de células positivas para ED1 (macrófagos) na medula externa renal. Aumento de 400x (A barra representa 50 μ m). O número de células ED1-positivas na medula renal externa de todos os grupos experimentais. Os dados são expressos como média \pm EPM. (n = 5–8 para cada grupo). * p < 0,05, **** p < 0,0001.

A análise da expressão de IL-1 β no tecido renal mostrou níveis mais elevados desta citocina no grupo CP em relação ao grupo SAL, o que foi atenuado pelo tratamento com calcitriol no grupo CP+Calcitriol. A IL-10 uma citocina com funções anti-inflamatórias e imunomoduladoras, apresentou regulação negativa no grupo CP, enquanto no grupo que recebeu tratamento com o calcitriol (CP+Calcitriol) foi observado aumento expressivo dessa citocina em relação aos grupos CP e SAL+Calcitriol, demonstrando a regulação positiva (Figura 9). Em relação a análise da expressão de CXCR4, observamos que os animais do grupo

CP apresentaram aumento da expressão renal desse receptor em relação ao grupo controles (SAL). Este aumento na expressão foi atenuado no grupo CP + calcitriol, sendo este grupo diferente de CP e SAL+Calcitriol (Figura 8).

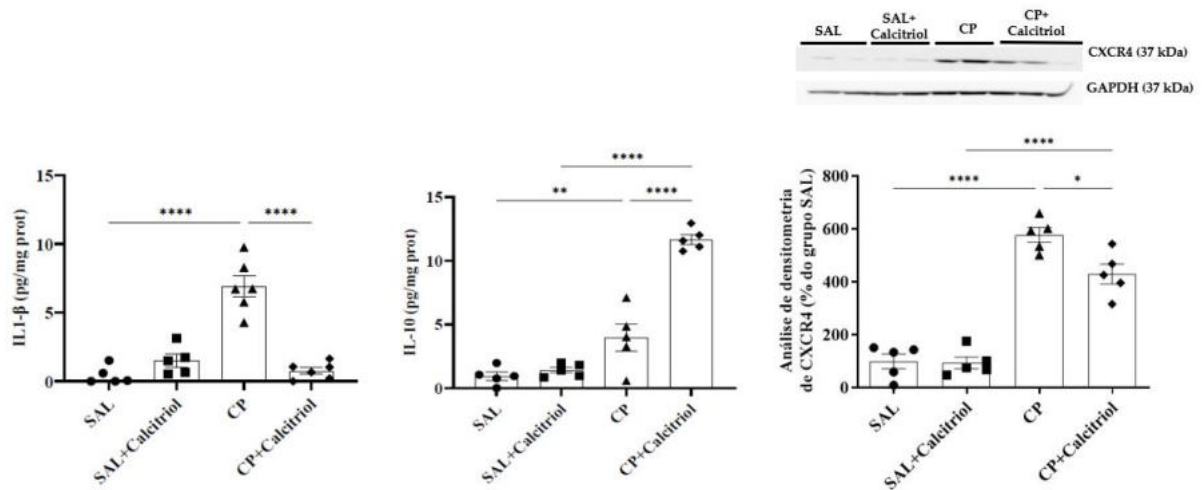


Figura 8. Níveis no tecido renal de IL (interleucina)-1 β e IL (interleucina)-10. Análise de Western blot de CXCR4 e GAPDH no tecido renal. Densitometria de CXCR4. Dados dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol. Os dados são expressos como média \pm EPM. (n = 5–8 para cada grupo). * p<0,05, ** p < 0,01, **** p<0,0001.

5.6 Calcitriol atenua o dano endotelial induzido pela CP

O estudo imunoistoquímico para JG12, um marcador de células endoteliais, mostrou redução do número de capilares peritubulares na medula externa nos animais do grupo CP em relação ao grupo SAL. O efeito da CP sobre o endotélio renal, avaliado por *Western Blot* utilizando um marcador específico para células endoteliais (CD34), mostrou expressão reduzida nos grupos CP em relação ao grupo controle (SAL). O tratamento com calcitriol atenuou as alterações tanto de JG12 na medula externa quanto de CD34 no tecido inteiro de animais do grupo CP+Calcitriol (Figura 9).

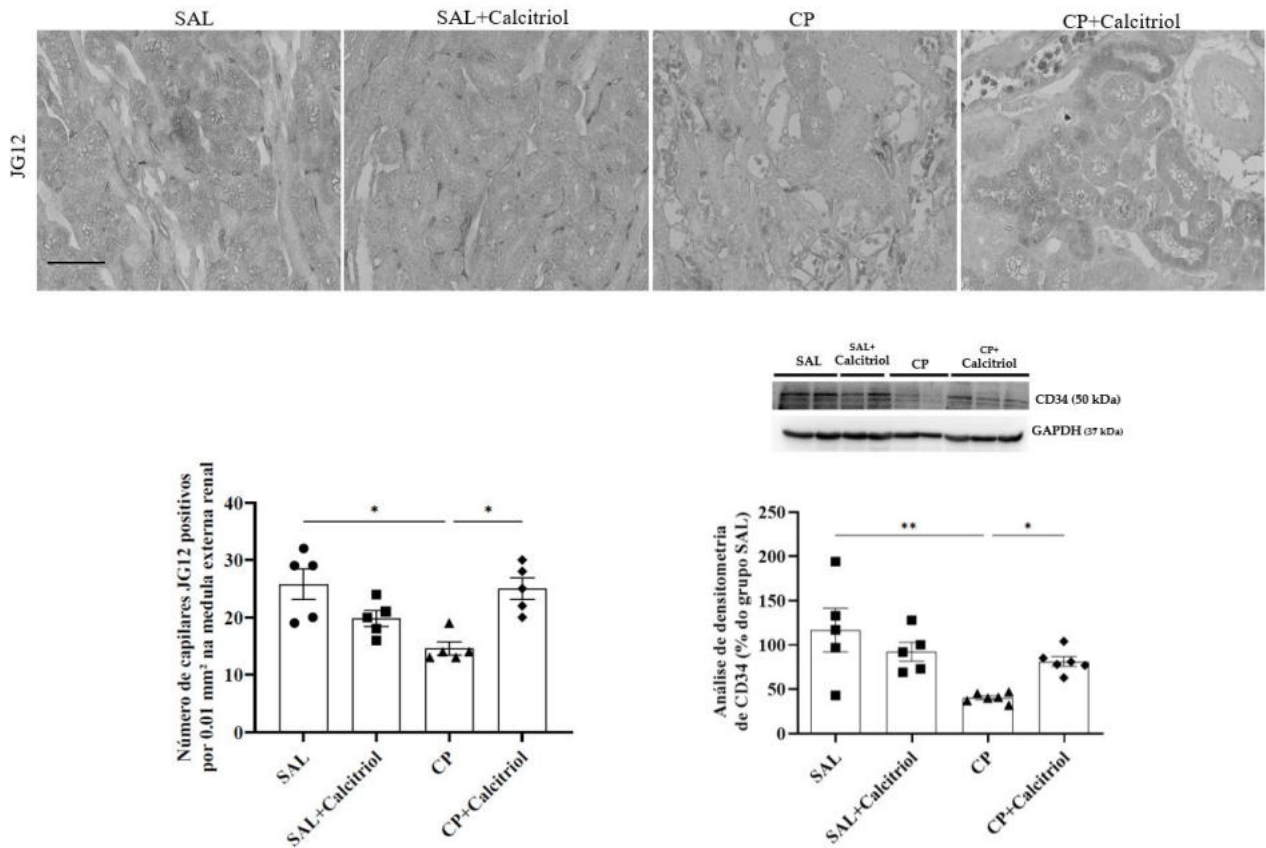


Figura 9. Imunolocalização de JG12 na medula externa renal. Aumento de 400x (A barra indica 50 μ m). O número de capilares JG12-positivos na medula externa renal. Análise de Western blot de CD34. Densitometria de CD34. Dados dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol. Os dados são expressos como média \pm EPM. (n = 5–8 para cada grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Ainda sobre parâmetros endoteliais, observados aumento da expressão tecidual de eNOS no tecido renal de ratos tratados com CP e calcitriol quando comparados ao grupo CP. Para a proteína p-eNOS, foi visto uma redução de sua expressão no grupo CP em relação ao grupo SAL, enquanto os animais do grupo CP+Calcitriol apresentou quando comparado ao grupo CP (Figura 10).

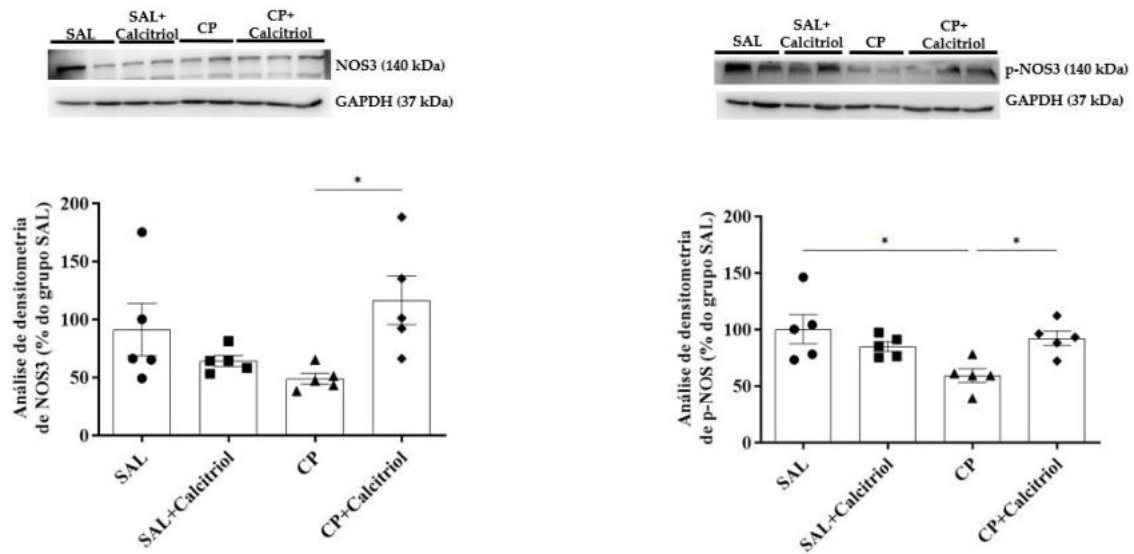


Figura 10. Análise de Western blot de NOS3 e p-NOS no tecido renal. Densitometria de NOS3 e p-NOS. Dados dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol. Os dados são expressos como média \pm EPM. (n = 5–8 para cada grupo). * $p < 0,05$.

O VEGF é um fator pró-angiogênico significativo na angiogênese. Observamos que o grupo que recebeu o tratamento com calcitriol, apresentou um aumento na expressão de VEGF em relação aos controles (SAL e SAL + Calcitriol) e CP. O VEGF exerce suas ações por meio de seu receptor VEGFR 2 nas células-endoteliais. Observamos que os animais do grupo CP+calcitriol também apresentaram aumento da expressão de VEGFR 2 no tecido renal em relação ao grupo SAL+Calcitriol e CP (Figura 11).

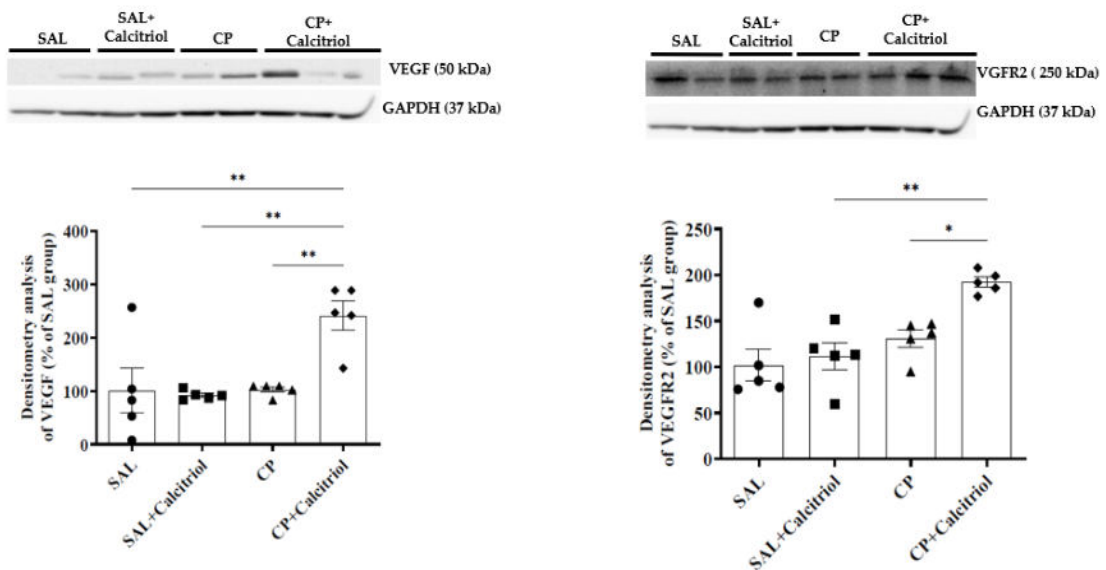


Figura 11. Análise de Western blot de VEGF e VEGFR2 no tecido renal. Densitometria de VEGF e VEGFR2.

Dados dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol. Os dados são expressos como média ± EPM. (n = 5–8 para cada grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ***, **** $p < 0,0001$.

A redução das enzimas antioxidantes é um dos mecanismos de geração do estresse oxidativo desencadeado pela CP, e o aumento do estresse oxidativo leva ao dano endotelial. Para avaliar a participação desse mecanismo, analisamos a expressão da enzima antioxidante EC-SOD no tecido renal. Observamos que o CP teve uma tendência de reduzir a expressão de EC-SOD, e a ação antioxidante do calcitriol foi confirmada pelo aumento da expressão de EC-SOD nos grupos SAL + calcitriol e CP + calcitriol comparado aos seus respectivos controles (Figura 12).

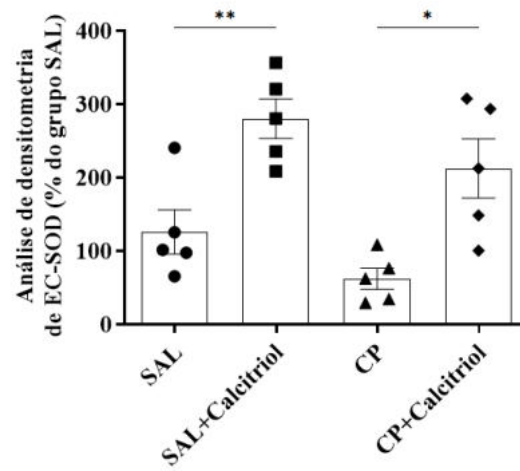


Figura 12. Análise de Western blot de EC-SOD no tecido renal. Densitometria de EC-SOD. Densitometria de EC-SOD. Dados dos grupos SAL, SAL+Calcitriol, CP e CP+Calcitriol. Os dados são expressos como média \pm EPM.

(n = 5–8 para cada grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ***, **** $p < 0,0001$.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos do tratamento prévio com calcitriol nas alterações características de LRA induzida por CP. Nossos resultados demonstraram que o calcitriol atenuou a lesão de células epiteliais e endoteliais, assim como reduziu a inflamação e o estresse oxidativo induzidos por CP. Esse efeito foi associado a regulação positiva da expressão de VDR no tecido renal, juntamente com maior ativação de vias relacionadas a manutenção e sobrevivência endotelial, evidenciadas pelo reequilíbrio de p-NOS, do eixo VEGF-VEGFR2 e de CXCR4. Adicionalmente, o calcitriol regulou a secreção de citocinas como pró e anti-inflamatórias, IL-10 e IL-1 β , respectivamente. Por fim, o tratamento com a vit. D ativa ainda teve efeitos antioxidantes, regulando a expressão de enzima antioxidante EC-SOD. Nossos resultados reforçam que o calcitriol pode ser uma terapia importante para reduzir as alterações induzidas por CP em pacientes em tratamento de câncer.

O declínio da função renal, caracterizada pela queda da TFG e acúmulo de creatinina, são as alterações funcionais presentes na LRA (KDIGO, 2012). Alterações estas que foram reproduzidas pelo nosso estudo após o tratamento com CP. Evidências acumuladas já demonstraram a correlação entre o declínio da função renal e o dano tubulointersticial (RISDON *et al.*, 1968; BOHLE *et al.*, 1979; MACKENSEN-HEAEN *et al.*, 1981). A CP acumula-se no tecido renal, preferencialmente no segmento S3 das células epiteliais do túbulo proximal, resultando em uma lesão tubular intensa conhecida como NTA (ARANY; SAFIRSTEIN, 2003; ZANETTI *et al.*, 2009). As alterações morfológicas observadas na NTA incluem dilatação tubular, perda da borda em escova tubular proximal (WEN *et al.*, 2020), descolamento da membrana basal e a presença de células em necrose na luz tubular (BASILE *et al.*, 2012; BERGER; MOELLER, 2014). Na análise histológica todas essas alterações foram observadas e o tratamento com calcitriol atenuou todas elas, com diminuição nas áreas de lesão, e conseqüentemente, atenuou o declínio da função renal, preservando a TFG e evitando o acúmulo de creatinina plasmática. Estudo anteriores, utilizando análogos da vitamina D observaram efeitos semelhantes e associaram a manutenção da função renal à atenuação da lesão tubular por CP (PARK *et al.*, 2012; HAMZAWY *et al.*, 2018).

As respostas biológicas do calcitriol são mediadas pelo VDR (HAUSSLER; NORMAN, 1969). Para avaliar o efeito do tratamento prévio com calcitriol na LRA induzida por CP, optamos por um método que garante a liberação constante e fisiológica de calcitriol, para obtenção dos efeitos benéficos sem a necessidade de overdose e efeito colateral de calcificação. Nossos resultados mostraram que os níveis séricos de 25(OH)D não foram alterados pelo

tratamento com CP e nem pela suplementação com calcitriol, ressaltando que a interação do calcitriol-VDR foi capaz de atenuar as alterações provocadas pela CP, sem alterar os níveis de 25(OH)D, evidenciando os mecanismos diretos do calcitriol.

A captação renal de 25 (OH) D para a sua ativação é realizada através da associação entre dois receptores presente na membrana apical da célula epitelial tubular, são eles megalina e cubulina (NYKJAER *et al.*, 2001). Observamos que as lesões na medula externa renal induzidas por CP levaram à diminuição da expressão do receptor de cubulina na região apical das células tubulares no grupo CP. Apesar da diminuição na expressão de cubulina, não observamos diminuição nos níveis de 25(OH)D no grupo CP, isso porque a redução no número de túbulos que expressam cubulina na borda em escova da célula pode levar a distúrbios na ativação da vitamina D e conseqüentemente afetar as suas ações (LI *et al.*, 2017; LUCHI *et al.*, 2017), mas não interfere diretamente nos níveis de 25(OH)D, uma vez que a sua síntese ocorre no fígado. Esse resultado reforça que a utilização da vitamina D ativa no tratamento é o mais indicado, pois garante as suas ações diretas aconteçam. Além disso, o tratamento com calcitriol resultou na preservação dos receptores de cubulina, demonstrando o papel renoprotetor do calcitriol.

Resultados anteriores de estudos clínicos e em modelos animais sugeriram que a ativação do VDR tem efeitos benéficos em várias doenças renais (NYKJAER *et al.*, 2001; JEAN *et al.*, 2017) e o status da vitamina D e a preservação dos túbulos renais são fatores que podem interferir na expressão do VDR nos rins (SIMI *et al.*, 2007). Encontramos uma menor expressão de VDR nos animais do grupo CP, enquanto o grupo CP que recebeu calcitriol apresentou um aumento na sua expressão. A redução do VDR no grupo CP pode estar relacionada principalmente a menor ativação do receptor pelo seu ligante, isso porque em estudos com suplementação de vitamina D é possível observar o aumento na expressão de VDR (HU *et al.*, 2020), enquanto na deficiência de vitamina D há uma diminuição na expressão (DE BRAGANÇA *et al.*, 2018), sugerindo um feedback na expressão de VDR associado a quantidade de vitamina D. O VDR é altamente expresso em células epiteliais tubulares renais, é a sua modulação tem sido associada a efeitos benéficos e de agravamento em vários modelos de doenças renais. Por exemplo, a deficiência de VDR agravou a inflamação e a fibrose do tecido renal em camundongos diabéticos induzidos por STZ (LI *et al.*, 2021), já a sua ativação atenuou a inflamação e a necrose tubular em camundongos com LRA induzida por CP e LPS (DU *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2020; JIAN *et al.*, 2021).

Após a lesão, os túbulos renais têm uma capacidade notável de regenerar suas células perdidas (TOBACK, 1992) e é sugerido pela literatura que a restauração das células tubulares

renais perdidas é secundária à regeneração do epitélio tubular (BONVANTRE, 2003). No presente estudo, utilizamos a imunistoquímica para alguns marcadores, para determinar a localização e distribuição da lesão tubular, como a vimentina, sendo um marcador de fenótipo mesenquimal e de desdiferenciação de células tubulares (FURIUCHI *et al.*, 2009; MALIK *et al.*, 2015) e o PCNA, um fator crucial na síntese e reparo do DNA (MOLDOVAN *et al.*, 2007), presente no núcleo de células em proliferação. Apesar de ambos serem marcadores associados ao reparo renal após lesão, consideramos eles como marcadores de lesão, uma vez que a ativação de ambos pressupõe uma lesão recente. A expressão aumentada de vimentina foi observada em lesões de células tubulares na medula externa renal de ratos injetados com CP, assim como o aumento do número de células PCNA-positivas. Tan *et al.* (2006) observaram que o tratamento com paricalcitol (um análogo sintético da vitamina D) reduziu significativamente a expressão de PCNA, atenuando a fibrose intersticial renal em um modelo de nefropatia obstrutiva. Também foi observado o tratamento com vitamina D restaurou a expressão do receptor VDR, bloqueou a transição epitélio-mesenquimal e inibiu a proliferação celular, demonstrando que a vitamina D desempenha um papel protetor na integridade celular contra esse processo de lesão celular (YE *et al.*, 2016).

O papel imunomodulador da vitamina D já foi reconhecido em diversos estudos e os seus efeitos protetores foram relacionados a ação direta nas próprias células imunológicas ou no seu recrutamento para o local da inflamação (HAMZAWY *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020). Estudos anteriores revelaram que vitamina D/VDR afeta tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, em grande parte através da inibição da ativação/proliferação de células imunológicas (VON ESSEN *et al.*, 2010; HART *et al.*, 2011). Conforme indicado pelos resultados da análise imunistoquímica para ED1 (marcador de macrófagos), nosso estudo demonstrou que a CP provocou um infiltrado significativo de macrófagos no tecido renal, e que os níveis dessas células foram significativamente reduzidos nos rins dos animais que receberam o calcitriol. Este resultado sugere que o calcitriol pode reduzir a infiltração de células inflamatórias causada pela CP. Além disso, em macrófagos, o calcitriol demonstrou ser capaz de inibir o início da ativação do inflamassoma, interferindo na sinalização de NF κ B, levando a redução na liberação dos níveis de IL-1 β (WÖBKE *et al.*, 2014; ZWICKER *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, também observamos o aumento da citocina pró inflamatória IL-1 β e redução dos níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória). Em concordância com nossos dados, estudos anteriores mostraram que a nefrotoxicidade da CP foi associada ao aumento da expressão de IL-1 β (SAXENA *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2020; VEIRAS *et al.*, 2022). A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória crucial para a resposta inflamatória contra infecções e lesões

(DINARELLO, 1996). Um estudo recente revelou que a IL-1 β derivada de células epiteliais tubulares renais polariza os macrófagos renais em direção a um fenótipo pró-inflamatório (AKHARI *et al.*, 2001). Esses achados corroboram com os nossos resultados, uma vez que o tratamento com calcitriol reduziu significativamente os níveis de IL-1 β , associado a uma redução na infiltração de macrófagos na medula externa de animais com LRA induzida por CP.

A participação de citocinas antiinflamatórias na patogênese da LRA induzida pela CP vem sendo investigada (DENG *et al.*, 2001; FAUBEL *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2008) e a IL-10 parece ter uma importante ação na atenuação da LRA induzida por CP e a inflamação associada (SAMPAIO *et al.*, 2007; SHENOY *et al.*, 2013; RABELO *et al.*, 2016). Estudos, tanto *in vitro* quanto estudos *in vivo*, já demonstraram que a vitamina D induz a expressão de IL-10 em cultura de células (KORF *et al.*, 2012) e suprime a inflamação em modelos de diabetes, esse efeito foi relacionado a expressão aumentada de IL-10 (CANTORNA, 2012; OOI *et al.*, 2012; CANTORNA *et al.*, 2014). No nosso estudo observamos exatamente essa ação do calcitriol, uma vez que os níveis de IL-10 estavam aumentados no grupo tratado com calcitriol. Um dos mecanismos sugeridos para a vitamina D induzir um aumento na secreção de IL-10 é a sua ação direta nas células T reguladoras, importantes secretoras de IL-10, aumentando a secreção de IL-10 por estas células (AZAK *et al.*, 2013).

A inibição do CXCR4 foi associada a um efeito benéfico em modelos animais experimentais de LRA, tanto por efeitos anti-inflamatórios locais ou quanto por mecanismos sistêmicos dependente da mobilização de células-tronco (ZUK *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015). Observamos um aumento da expressão de CXCR4 após o tratamento com CP, efeito que contribuiu para o dano celular epitelial e endotelial. Sabendo que os macrófagos expressam CXCR4 (DE FILIPPO, 2018; SUSEK *et al.*, 2018), esse aumento da expressão de CXCR4 pode ser associado ao intenso infiltrado macrófagos no tecido renal que relatamos anteriormente. Em trabalho recente, Chang cols. (2021) observaram que a supressão da via SDF-1/CXCR4 resultou em aumento da regeneração de células tubulares, redução da morte celular e atenuação da rarefação microvascular em rins de camundongos IR-AKI. Esse achado é consistente com nossos dados, que mostram que o calcitriol suprimiu a expressão de CXCR4, seguido pela melhora do endotélio e disfunção das células epiteliais.

A nefrotoxicidade induzida por CP deve-se em parte ao dano vascular e à vasoconstrição associada à disfunção endotelial e autorregulação vascular anormal (SUN *et al.*, 2012). A lesão vascular resulta em diminuição do fluxo sanguíneo renal e da TFG, causando danos tubulares hipóxicos (YOO *et al.*, 2018). Já mostramos anteriormente a participação do endotélio no desenvolvimento da LRA induzida pela CP, uma vez que a perda de capilares peritubulares foi

associado ao agravamento da lesão tubulointersticial e a preservação a melhora das alterações induzidas por CP (FRANCESCATO *et al.*, 2018). Evidências relatam que a vitamina D desempenha papel fundamental na homeostase vascular e na modulação da função endotelial (MELAKU; MOSSI, 2018). Para avaliar as mudanças na densidade capilar na medula externa renal, utilizamos o JG12, por ser um marcador específico para o endotélio dos vasos sanguíneos e é expresso pelas células endoteliais dos vasos tubulointersticiais renais (SUN *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2019). Além disso, analisamos também a expressão de CD34, uma glicofosfoproteína expressa na parede dos vasos sanguíneos, sendo utilizada como um marcador de células endotelial (KRAUSE *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2018). A imunistoquímica para JG12 revelou menor expressão de capilares peritubulares positivos para JG12 na região da medula externa renal, assim como uma expressão reduzida de CD34, demonstrando a intensa perda de densidade vascular atribuída a lesão por CP. O tratamento com calcitriol preservou os capilares peritubulares, evidenciado pela manutenção dos capilares positivos para JG12 e a expressão de CD34 pelas células endoteliais. Resultado semelhante foi observado em um estudo anterior do nosso laboratório, demonstrando que a ativação de VDR foi capaz de atenuar as alterações da microvasculatura renal no modelo de lesão renal progressiva induzida por adriamicina. Esses efeitos estavam associados ao reequilíbrio de fatores pró e antiangiogênicos, assim como o aumento da biodisponibilidade de NO para o tecido renal pela ativação de NOS3 e expressão de VEGFR2 (DELUQUE *et al.*, 2022).

Os efeitos renoprotetores da vitamina D foram determinados pela regulação positiva de eNOS e à atenuação da remodelação vascular e condições isquêmicas devido à fibrose renal (ARFIAN *et al.*, 2017). Além da menor expressão dos capilares peritubulares, o grupo CP também apresentou diminuição na produção de eNOS e na sua ativação p-eNOS. A vitamina D é um regulador transcricional direto da eNOS e está envolvida na ativação não genômica da eNOS, para promover a produção endotelial de NO (ANDRUKHOVA *et al.*, 2014) e o efeito do calcitriol na eNOS dependente da ativação de VDR (MARTÍNEZ-MIGUEL *et al.*, 2014). Um estudo *in vitro* também relatou que a vitamina D induz a expressão de VEGF e leva à melhoria das propriedades angiogênicas das células progenitoras endoteliais (GRUNDMANN *et al.*, 2012). O aumento da expressão de VEGF e VEGFR2 que observamos com o tratamento com calcitriol reforça o seu papel como promotor do endotélio. Já foi relatado que a transição endotélio-mesenquimal leva a deposição intersticial e lesão vascular após a LRA e o tratamento com VEGF contribuiu para a manutenção da integridade vascular, apesar de não aumentar o número de células endoteliais, o VEGF bloqueou a transição endotélio-mesenquimal e protegeu da rarefação vascular após LRA (BASILE *et al.*, 2011).

A disfunção mitocondrial gerada pela CP leva ao aumento dos níveis de EROs (MILLER *et al.*, 2010), associado a ação prejudicada das enzimas antioxidante e este desequilíbrio é determinante para o estabelecimento do estresse oxidativo (HUSAIN *et al.*, 1998). A SOD extracelular (EC-SOD) é uma enzima antioxidante, localizada nas regiões extracelulares da célula (FOLZ; CRAPO, 1994), responsável pelo controle dos níveis de EROs e é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Atribuídos a sua função, estudos recentes tem focado nos níveis de antioxidantes para aliviar os efeitos na lesão renal (MAPUSKAR *et al.*, 2021). Estudos experimentais demonstraram que a vitamina D pode ter importantes propriedades antioxidantes (WIMALAWANSA, 2019) e esse efeito pode estar associado a regulação positiva de enzimas antioxidantes, como a SOD e consequente redução do estresse oxidativo (SARDAR *et al.*, 1996). Além disso, níveis e atividade reduzidos de SOD foram relatados em indivíduos com deficiência de vitamina D e ratos diabéticos (TARCIN *et al.*, 2009; WEE *et al.*, 2021). Nossos resultados mostraram que o tratamento prévio com calcitriol regulou positivamente a expressão de EC-SOD em ambos os grupos tratados com calcitriol e que esse efeito foi responsável, pelo menos em parte, pela atenuação da LRA induzida por CP. Efeito semelhante foi observado por Li cols. (2017), onde o pré-tratamento com colecalciferol, uma forma inativa da vitamina D3, protegeu parcialmente contra a LRA induzida por isquemia-reperfusão através da regulação de enzimas oxidantes e supressão do estresse oxidativo (LI *et al.*, 2017).

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados mostram que o calcitriol atenua as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem na LRA induzida por CP, esse efeito foi associado a: (1) um mecanismo anti-inflamatório através da diminuição de IL-1 β e aumento de IL-10 (2) um mecanismo antioxidante através da elevação da SOD (3) redução da vimentina, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (4) elevação de fatores pró angiogênicos. Estudos futuros são necessários para avaliar como o calcitriol pode acelerar a resolução da lesão das células epiteliais.

Referências

8. REFERÊNCIAS

- ABD EL-KADER, M. & TAHA, R.I. Comparative nephroprotective effects of curcumin and etoricoxib against cisplatin-induced acute kidney injury in rats. **Acta Histochem**, 122, 151-534, 2020.
- ABDELRAHMAN, A. M. *et al.* Effect of levosimendan, a calcium sensitizer, on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Toxicol. Rep.** 2019, 6, 232–238.
- AKBARI, O.; DEKRUYFF, R.H. & UMETSU, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nat. Immunol.** 2, 725–731, 2001.
- AKBARI, O.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nat. Immunol.** 2, 725–731, 2001.
- ALMEIDA, L. F. *et al.* Calcitriol effect on the disturbances in renal development induced by losartan exposure during lactation in rats. **Scientific Reports** 7, 11472:1598-017, 2017.
- ALMEIDA, L. F. *et al.* Renal developmental disturbances and their long-term consequences in female pups from vitamin D-deficient mothers: Involved mechanisms. **J. Develop. Orig. Health Dis.** 10, 497–501, 2019.
- ANDRIANOVA, N. V. *et al.* Kidney cells regeneration: dedifferentiation of tubular epithelium, resident stem cells and possible niches for renal progenitors. **Int J Mol Sci.** 20, 6326, 2019.
- ANDRUKHOVA, O. *et al.* Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. **Mol. Endocrinol.** 2014.
- ANSARI, M.A. Sinaptic acid modulates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Biomed. Pharmacother.** 93, 646–653, 2017.
- ARFIAN, N. *et al.* Vitamin D Upregulates Endothelin-1, ETBR, eNOS mRNA Expression and Attenuates Vascular Remodelling and Ischemia in Kidney Fibrosis Model in Mice. **Physiol. Res.** 67, 137-147, 2018

AZAK, A. *et al.* Effect of novel vitamin D receptor activator paricalcitol on renal ischaemia/reperfusion injury in rats. **Ann. R. Coll. Surg. Engl.** 95, 489–494, 2013.

BABAEI, S. *et al.* Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. **Circ. Res.** 1998.

BELLOMO, R., KELLUM, J. A. & RONCO, C. Acute kidney injury. **Lancet.** 380, 756–766, 2012.

BENNIS, Y. Cisplatin dose adjustment in patients with renal impairment, which recommendations should we follow? **Int. J. Clin. Pharm.** 36, 420–429, 2014.

BEN-YEHUDA, G. M. Skin redox balance maintenance: The need for a Nrf2-activator delivery system. **Cosmetics.** 3, 1, 2016.

BERGER, K.; MOELLER, M. J. Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury. **Semin Nephrol.** 34: 394-403, 2014.

BIKLE D. D. Vitamin D and the skin: physiology and pathophysiology. **Rev Endocr Metab Disorders** 13, 3–19, 2012.

BIKLE, D. D. Vitamin D and the Skin: Physiology and Pathophysiology. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** 13, 3–19, 2012.

BONVENTRE J. V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 Suppl 1: S55-61

BONVENTRE, J.V. & YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J. Clin. Invest.** 121, 4210–4221, 2011.

BOULIKAS T. & VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). **Oncol Rep.** 6, 1663-1682, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, 1976.

BRANDENBURG, V. M.; VERVLOET, M. G. & MARX, N. The role of vitamin D in cardiovascular disease: From present evidence to future perspectives. **Atherosclerosis**. 225, 253–263, 2012.

BRODSKY, S.V. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: Rescue by transplanted endothelial cells. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** 282, 1140–1149, 2002.

BUSSE, R. & FLEMING, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. **Ann. Med.** 1995.

CAO, S. S. & KAUFMAN R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. **Antioxidants & Redox Signaling**. 21, 396–413, 2014.

CAO, Z. Angiotensin type 2 receptor antagonism confers renal protection in a rat model of progressive renal injury. **J. Am. Soc. Nephrol.** 13, 1773–1787, 2002.

CARLBERG, C. Molecular approaches for optimizing vitamin D supplementation. **Vitam Horm.** 100, 265–272, 2016.

CHAI, Y. *et al.* Dexmedetomidine alleviates cisplatin-induced acute kidney injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via the α 2AR/PI3K/AKT pathway. **Mol. Med. Rep.** 21, 1597–1605, 2020.

CHAN, B.A. & COWARD, J. I. G. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. **J. Thorac. Dis.** 5, 565–578, 2013.

CHANG, H.M. *et al.* FGF23 ameliorates ischemia-reperfusion induced acute kidney injury via modulation of endotelial progenitor cells: Targeting SDF-1/CXCR4 signaling. **Cell Death Disease**. 12, 409, 2021.

CHEN, C.H. & HENRY, P.D. Atherosclerosis as a microvascular disease: Impaired angiogenesis mediated by suppressed basic fibroblast growth factor expression. **Proc. Assoc. Am. Physicians**. 109, 351–361, 1997.

CHEN, M. F. *et al.* Vitamin C protects against cisplatin-induced nephrotoxicity and damage without reducing its effectiveness in C57BL/6 mice xenografted with Lewis lung carcinoma. **Nutr. Cancer**. 66, 1085–1091, 2014.

CHRISTAKOS, S. *et al.* Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiol Rev.** 96, 365–408, 2016.

CHUN, R. F. *et al.* Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. **J Steroid Biochem Mol Biol** 144, 132–137, 2014.

CIARIMBOLI, G. Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Side-effects. **Anticancer Research.** 1, 547-550, 2014.

CLINCKSPOOR, I. Vitamin D in thyroid tumorigenesis and development. **Prog Histochem Cytochem.** 48, 65–98, 2013.

COATS, A.; JAIN, S. Protective effects of nebivolol from oxidative stress to prevent hypertension-related target organ damage. **J. Hum. Hypertens.** 31, 376–381, 2017.

COHEN, S. M.; LIPPARD, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** 67, 93–130, 2001.

COOPER, A. J.; PINTO, J. T. Cysteine S-conjugate beta-lyases. **Amino Acids.** 30, 1–15, 2006.

COOPER, A. J. *et al.* Cysteine Sconjugate beta-lyases: Important roles in the metabolism of naturally occurring sulfur and seleniumcontaining compounds, xenobiotics and anticancer agents. **Amino Acids,** 41, 7–27, 2011.

COURBEBAISSSE, M.; LANSKE, B. Biology of fibroblast growth factor 23: from physiology to pathology. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 03, 1260, 2017.

DALAL, R.; BRUSS, Z. S.; SEHDEV, J. S. Physiology, renal blood flow and filtration. In StatPearls [Internet]; StatPearls Publishing: Treasure Island, 2019.

DARWISH, M. A. *et al.* Vitamin E mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity due to reversal of oxidative/nitrosative stress, suppression of inflammation and reduction of total renalplatinum accumulation. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 31, 1–9, 2017.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur. J. Pharmacol.** 5, 364–378, 2014.

DEDEOGLU, M.; GARIP, Y.; BODUR, H. Osteomalacia in Crohn's disease. **Arch. Osteoporos.** 2014.

DELUCA, H. F. Evolution of our understanding of vitamin D. **Nutr Rev.** 66, 73–87, 2008.

DELUQUE, A. L. *et al.* Effect of Calcitriol on the Renal Microvasculature Differentiation Disturbances Induced by AT1 Blockade During Nephrogenesis in Rats. **Front. Med.** 7, 23, 2020.

DENG, J. *et al.* Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. **Kidney Int.** 60, 2118–2128, 2001.

DENTINO M. Lawrence H. Einhorn. Long term effect of Cis-Diamminedichloride platinum (CDDP) on renal function and structure in man. **Cancer.** 41, 1274-1281, 1978.

DHANDE, I.; ALI, Q.; HUSSAIN, T. Proximal tubule angiotensin AT2 receptors mediate an anti-inflammatory response via interleukin- 10: Role in renoprotection in obese rats. **Hypertension.** 61, 1218–1226, 2013.

DHANDE, I.; MA, W.; HUSSAIN, T. Angiotensin AT 2 receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production. **Hypertens. Res.** 38, 21–29, 2015.

DI LIBERTO, D. *et al.* Vitamin D increases the production of IL-10 by regulatory T cells in patients with systemic sclerosis. **Clin. Exp. Rheumatol.** 37, 76–81, 2019.

DIBONA, G. F.; KOPP, U.C. Neural control of renal function. **Physiol. Rev.** 77, 75–197, 1997.

DINARELLO C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood.** 87, 2095–2147, 1996.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future Cancer Chemother. **Pharmacol.** 77, 1103-24, 2016.

DOROUDI, M.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Membrane-mediated actions of 1,25-dihydroxy vitamin D3: A review of the roles of phospholipase A2 activating protein and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 147, 81–84, 2015.

DOS SANTOS, N.A.G. *et al.* Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. **Arch. Toxicol.** 86, 1233–1250, 2012.

DWIVEDI, P.P. *et al.* A role for the phosphatidylinositol 3-kinase Protein kinase C zeta Sp1 pathway in the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induction of the 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene in human kidney cells. **Cell. Signal.** 22, 543–552, 2010.

DWIVEDI, P. P. *et al.* Role of MAP kinases in the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced transactivation of the rat cytochrome P450C24 (CYP24) promoter. Specific functions for ERK1/ERK2 and ERK5. **J. Biol. Chem.** 277, 29643–29653, 2002.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr. Opin Cell Biol.** 16, 663–669, 2004.

EINHORN, L. H.; DONOHUE, J. Cis-Diamminedichloroplatinum, Vinblastine, and Bleomycin Combination Chemotherapy in Disseminated Testicular Cancer. **Ann. Intern. Med.** 87, 293–298, 1977.

ERSAN, S. *et al.* Pretreatment with paricalcitol attenuates level and expression of matrix metalloproteinases in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. **Clin Nephrol.** 88, 231–8, 2017.

FAUBEL, S. *et al.* Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 322, 8–15, 2007.

FELDMAN, D.; KRISHNAN, A.; SWAMI S. Vitamin D: biology, actions, and clinical implications; in Marcus R, Feldman D, Dempster D, Luckey M, Cauley J (eds): Osteoporosis, ed 4. Waltham, **Academic Press.** 283–328, 2013.

FILIPSKI, K. K. *et al.* Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. **Clin Pharmacol Ther.** 86, 396–402, 2009.

FLEET, J. C. Rapid, Membrane-Initiated Actions of 1,25 Dihydroxyvitamin D: What Are They and What Do They Mean? **J. Nutr.** 2004.

FLOREA A. M.; BUSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers (Basel)**. 3, 1351–1371, 2011.

FOLZ, R. J.; CRAPO, J. D. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): Tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. **Genomics**. 22, 162–171, 1994.

FOUNTAIN, J. H.; LAPPIN, S. L. Physiology, Renin Angiotensin System. In StatPearls [Internet]; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2017.

FRANCESCATO, H. D. C. *et al.* Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. **Arch Toxicol**. 85:1597-1606, 2011.

FRANCESCATO, H. D. C. *et al.* Previous exercise training protects against cisplatin 361 induced renal and endothelial lesions in rats. **Kidney Blood Press. Res.** 43, 582–593, 2018.

FURUICHI, K.; KANEKO, S.; WADA, T. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. **Clin. Exp. Nephrol**. 13, 9–14, 2009.

GATELY, D.P. HOWELL, S.B. Howell, Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. **Br. J. Cancer**. 67, 1171–1176, 1993.

GARLAND, C. F. The role of vitamin D in cancer prevention. **Am J Public Health** 2006; 96:252–261.

GENG, H. *et al.* Inhibition of autoregulated TGFbeta signaling simultaneously enhances proliferation and differentiation of kidney epithelium and promotes repair following renal ischemia. **Am J Pathol**. 174, 1291–1308, 2009.

GILLESPIE, S. K.; ZHANG, X. D.; HERSEY, P. Ingenol 3-angelate induces dual modes of cell death and differentially regulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in melanoma cells. **Mol. Cancer**. 3, 1651–1658, 2004.

GOMEZ-RUIZ, S. *et al.* On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. **Bioinorg. Chem. Appl.** 2012, 140- 284, 2012.

GÓMEZ-SIERRA, T., *et al.* Role of food-derived antioxidants against cisplatin induced-nephrotoxicity. **Food and Chemical Toxicology** Volume 120, October 2018, Pages 230-242

GREEN, D.R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 7, 60-80, 2015.

GRIENDLING, K. K. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 20, 2175–2183, 2000.

GRGIC, I. *et al.* Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. **Kidney International.** 82, 172-183, 2012.

GRUNDMANN, M. *et al.* Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** 303, 954-962, 2012.

GUO, Y. Pretreatment of Huaiqihuang extractum protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Sci. Rep.** 8, 1–10, 2018.

GUPTA, S.; WRIGHT, H. M. Nebivolol: A highly selective β 1-adrenergic receptor blocker that causes vasodilation by increasing nitricoxide. **Cardiovasc. Ther.** 26, 189–202, 2008.

GUTIERREZ, S. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. **J Biol Chem.** 277, 1316–1323, 2002.

GUZIK, T. J. *et al.* Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. **Hypertension.** 39, 1088–1094, 2002.

GWO Y. H., Natasha Woodward, Jermaine I.G. Coward, Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 102 (2016) 37–46.

HAKIMINIA, B.; GOUDARZI, A. & MOGHADDAS, A. Has vitamin E any shreds of evidence in cisplatininduced toxicity. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.** 3, 22349, 2019.

HANIF, M. O.; BALI, A.; RAMPHUL, K. Acute renal tubular necrosis. In StatPearls [Internet]; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.

HANIGAN, M. H.; PITOT, H. C. Gamma-glutamyl transpeptidase--its role in hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**. 6, 165-72, 1985.

HANIGAN, M.H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: Molecular mechanisms. **Cancer Ther.** 1, 47, 2003.

HANNON, M. J. Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology, **Pure Appl. Chem.** 79, 2243–2261, 2007.

HARADA S. *et al.* Daily administration of eldecalcitol (ED71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. **J Bone Miner Res.** 27, 461–73, 2012.

HAUGEN, H. N. The determination of endogenous creatinine in plasma and urine. **Scan. J. Clin. Lab. Investig.** 5, 48–57, 1953.

HAUSHEER, F. H. *et al.* Mechanistic study of BNP7787-mediated cisplatin nephroprotection: Modulation of human aminopeptidase N. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 67, 381–391, 2011.

HAUSSLER, M. R. Molecular mechanisms of vitamin D action. **Calcified Tissue Int.** 92, 77–98, 2013.

HEANEY, R. P. *et al.* Vitamin D distribution and status in the body. **J Am Coll Nutr.** 28, 252-256, 2009.

HOFFMANN, E.K. *et al.* Role of volume-regulated and calcium-activated anion channels in cell volume homeostasis, cancer and drug resistance. **Channels.** 9, 380–396, 2015.

HOLDITCH, S. J. *et al.* Recent Advances in Models, Mechanisms, Biomarkers, and Interventions in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. **Int. J. Mol. Sci.** 20, 3011, 2019.

HU, S. *et al.* Identification of OAT1/OAT3 as contributors to cisplatin toxicity. **Clin. Transl. Sci.** 10, 412–420, 2017.

HU, Z. *et al.* VDR activation attenuate cisplatin induced AKI by inhibiting ferroptosis. **Cell Death Dis.** 11, 1–11, 2020.

HUANG, S. J. *et al.* The renoprotective effect of curcumin against cisplatin-induced acute kidney injury in mice: Involvement of miR-181a/PTEN axis. **Ren. Fail.** 42, 350–357, 2020.

HUMANES, B. *et al.* Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection. **Nephrol. Dial. Transplant.** 32, 1645–1655, 2017.

HUSSAIN, S. *et al.* A study of split-dose cisplatin-based neo-adjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. **Oncol. Lett.** 3, 855–859, 2012.

Iman W. Achkar. *et al.* Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathways. **J. Transl. Med.** 16, 96, 2018.

IDERAABDULLAH, F. Y. *et al.* Maternal vitamin D deficiency and developmental origins of health and disease (DOHaD). **J Endocrinol.** 2020.

IMOGEN, L. *et al.* Chapter-1: cisplatin and oxaliplatin: our current understanding of their actions, in: Astrid Sigel, Helmut Sigel, Eva Freisinger, Roland K.O. Sigel (Eds.), **Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents.** 1–42, 2018.

J. R.; FERRARIO, C. M. Nebivolol reduces cardiac angiotensin II, associated oxidative stress and fibrosis but not arterial pressure in salt-loaded spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.** 30, 1766, 2012.

JÄPELT, R.B.; JAKOBSEN, J. Vitamin D in Plants: A Review of Occurrence, Analysis, and Biosynthesis. **Front. Plant Sci.** 4, 136, 2013.

JARDINAUD F. *et al.* Ontogenic and adult whole body distribution of aminopeptidase N in rat investigated by in vitro autoradiography. **Biochimie.** 86, 105–113, 2004.

JEAN, G.; SOUBERBIELLE, J.C.; CHAZOT, C. Vitamin D in Chronic Kidney Disease and 339 Dialysis Patients. **Nutrients.** 9, 328, 2017.

JESSE, C. R. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone protects against cisplatin-induced renal damage in mice. **J. Appl. Toxicol.** 34, 25–32, 2014.

JONES G, PROSSER DE, KAUFMANN M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. **Arch Biochem Biophys.** 523, 9–18, 2012.

JONES, G.; PROSSER, D. E.; KAUFMANN, M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. **J Lipid Res.** 55: 13–31, 2014.

JONES G., PROSSER D. G. The activating enzymes of vitamin D. **Vitamin D.** 23–42, 2011.

JORDAN, P.; CARMO-FONSECA, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. **Cell. Mol. Life Sci.** 57, 1229–1235, 2000.

KADIR, A.; SHER, S.; SIDDIQUI, R. A.; MIRZA, T. Nephroprotective role of eugenol against cisplatin-induced acute kidney injury in mice. **Pak. J. Pharm. Sci.** 33, 1281–1287, 2020.

KANG, D. H. *et al.* Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. **J Am Soc Nephrol.** 12, 1434-1447, 2001.

KAPIL A. *et al.* Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vitamin D-mediated protection against acute kidney injury in rats. **J Surg Res.** 2013.

KELLUM, J. A., *et al.* Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. **Kidney International Supplements.** 2, 1-138, 2012.

KHAMMISSA, R. A. G. *et al.* The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. **Biomed. Res. Int.** 2018, 9276380., 2018.

KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes. Acute Kidney Injury Work Group. Kdigo clinical practice guideline for acute kidney injury. **Kidney Int Suppl.** 2, 1– 138, 2012.

KIM, H. J. *et al.* NLRP3 inflammasome knockout mice are protected against ischemic but not cisplatin-induced acute kidney injury. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 346, 465–472, 2013.

KITCHING, A. R. *et al.* Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. **Clin. Exp. Immunol.** 128, 36–43, 2002.

KITCHING, A.R. *et al.* Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. **Kidney Int.** 57, 518–525, 2000.

KOBORI, H. *et al.* Angiotensin II blockade and renal protection. **Curr. Pharm. Des.** 19, 3033–3042, 2013.

KORF, H. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin d(3) curtails the inflammatory and t cell stimulatory capacity of macrophages through an il-10-dependent mechanism. **Immunobiology.** 217, 1292–1300, 2012.

KUCHUK N. O., *et al.* Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: global perspective. **J Bone Miner Res.** 24: 693–701, 2009.

KUO, M.T., *et al.* The roles of copper transporters in cisplatin resistance. **Cancer Metastasis Rev.** 26, 71–83, 2007.

LAMEIRE, N. H. *et al.* Acute kidney injury: an increasing global concern. **Lancet.** 382, 170–9, 2013.

LAN R. *et al.* PTEN loss defines a TGF- β -induced tubule phenotype of failed differentiation and JNK signaling during renal fibrosis. **Am J Physiol Renal Physiol.** 302, 1210–1223, 2012

LI, J. *et al.* Pretreatment with Cholecalciferol Alleviates Renal Cellular Stress Response during Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury. **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2019, 13, 2017.

LI, Q. *et al.* Ondansetron can enhance cisplatin-induced nephrotoxicity via inhibition of multiple toxin and extrusion proteins (MATEs). **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 273, 100–109, 2013.

- LI, Y. C. *et al.* Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1997.
- LI, Z. *et al.* Cisplatin-based chemoradiotherapy with 5-fluorouracil or pemetrexed in patients with locally advanced, unresectable esophageal squamous cell carcinoma: A retrospective analysis. **Mol. Clin. Oncol.** 6, 743–747, 2017.
- LIANG, H. *et al.* CXCL16 regulates cisplatin-induced acute kidney injury. **Oncotarget.** 7, 31652, 2016.
- LIN, X. *et al.* The Copper Transporter CTR1 Regulates Cisplatin Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Pharmacol.** 62, 1154–1159, 2002.
- LIU, M. *et al.* A pathophysiologic role for T lymphocytes in murine acute cisplatin nephrotoxicity. **J. Am. Soc. Nephrol.** 17, 765–774, 2006.
- LIU, Q. *et al.* The protective effects of Zhen-Wu-Tang against cisplatin-induced acute kidney injury in rats. **PLoS ONE.** 12, e0179137, 2017.
- LIU, B. C. *et al.* Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. **Kidney Int.** 93, 568–79, 2018.
- LIU, X. Q. Rutaecarpine Derivative Cpd-6c Alleviates Acute Kidney Injury by Targeting PDE4B, a Key Enzyme Mediating inflammation in Cisplatin Nephropathy. **Biochem. Pharmacol.** 180, 114-132, 2020.
- LU, L. H. *et al.* Increased macrophage infiltration and fractalkine expression in cisplatin-induced acute renal failure in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 324, 111–117, 2008.
- LUCHI, W. M. Vitamin D deficiency is a potential risk factor for contrast-induced nephropathy. **J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 309, 215–222, 2017.
- LUNDWALL, K. *et al.* Treating endothelial dysfunction with vitamin D in chronic kidney disease: A meta-analysis. **BMC Nephrol.** 19, 1–7, 2018.

MA, Q. *et al.* Astragalus polysaccharide attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing oxidative damage and mitochondrial dysfunction. **Biomed. Res. Int.** 2020, 2851349, 2020.

MALIK, S. *et al.* Telmisartan ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting MAPK mediated inflammation and apoptosis. **Eur. J. Pharm.** 748, 54–60, 2015.

MANDIC, A. **et al.** Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. **J. Biol. Chem.** 278, 9100–9106, 2003.

MANOHAR S.; LEUNG, N. Cisplatin nephrotoxicity: A review of the literature. **Journal of Nephrology.** 31, 15–25, 2018.

MARTINA, M. N. *et al.* Double- negative T cells are early responders to AKI and are found in human kidney. **J. Am. Soc. Nephrol.** 7, 1113–1123, 2016.

MARULLO, R. *et al.* Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PLoS One.** 8, 81162, 2013.

MELAKU, L.; MOSSIE, A. “Molecular mechanism of vasoprotective effects of Vitamin D,” **International Journal of Health & Allied Sciences.** 3, 127, 2018.

MICHELL, B. J. *et al.* The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. **Curr. Biol.** 1999.

MILLER, R.P. *et al.* Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. **Toxins (Basel).** 2, 2490–2518, 2010.

MOLLMAN, J. E. Cisplatin neurotoxicity. **N. Engl. J. Med.** 322 (2), 126–127, 1990.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** 19, 683–765, 2001.

MUNGER, K. A.; KOST, C K.; JR BRENNER, B. M. The renal circulation and glomerular ultrafiltration. In: Taal, M, Chertow, G, Marsden, P, Shorecki, K, Yo, A, Brenner, B, editors. *Brenner and Rector’s the kidney.* **Saunders Elsevier.** 94–103, 2012.

- MUKHOPADHYAY, P. *et al.* P. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 is a key mediator of cisplatin-induced kidney inflammation and injury. **Free Radic. Biol. Med.** 51, 1774–1788, 2011.
- MURALI, S. K. FGF23 Regulates bone mineralization in a 1,25(OH)₂ D₃ and klotho-independent manner. **J Bone Miner Res.** 31, 129–142, 2016.
- NAKAMICHI Y. *et al.* Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 30334-5, 2017.
- NAPOLI, C. *et al.* Nitric oxide and atherosclerosis: An update. **Nitric Oxide Biol. Chem.** 15, 265–279, 2006.
- NAVEH, M. T. *et al.* Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the parathyroid in vivo. **J Clin Invest.** 86, 1968–1975, 1990.
- NI, J. *et al.* 3-deazaneplanocin A protects against cisplatin-induced renal tubular cell apoptosis and acute kidney injury by restoration of E-cadherin expression. **Cell Death Dis.** 10, 355, 2019.
- NING, Y. *et al.* Necrostatin-1 attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through suppression of apoptosis and oxidative stress and retains klotho expression. **Front. Pharmacol.** 9, 384, 2018.
- NORIS, M.; REMUZZI, G. Translational mini-review series on complement factor H: Therapies of renal diseases associated with complement factor H abnormalities: Atypical haemolytic uraemic syndrome and membranoproliferative glomerulonephritis. **Clin. Exp. Immunol.** 151, 199–209, 2008.
- NORMAN, A.W. Minireview: Vitamin D receptor: New assignments for an already busy receptor. **Endocrinology.** 147, 5542–5548, 2006.
- NUTCHEY, B.K. *et al.* Molecular action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol ester on the activation of the rat cytochrome P450C24 (CYP24) promoter: Role of MAP kinase activities and identification of an important transcription factor binding site. **Biochem. J.** 389, 753–762, 2005.

NYKJAER, A. *et al.* Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH)vitamin D. **Proc Natl Acad Sci.** 98, 13895–13900, 2001.

NYKJAER, A. *et al.* Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D3. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98, 13895–13900, 2001.

OHYAMA Y. *et al.* Structural characterization of the gene encoding rat 25-hydroxyvitamin D 24-hydroxylase. **Biochemistry** 32: 76–82, 1993.

OZKOK, A.; EDELSTEIN C. L. Pathophysiology of cisplatininduced acute kidney injury. **Biomed Res Int.** 2014, 967826, 2014.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney Int.** 73, 994–1007, 2008.

Pabla, N., Murphy, R. F., Liu, K., and Dong, Z. (2009) The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. **Am. J. Physiol.: Renal Physiol.** 296, F505–F511.

PERES, L. A., DA CUNHA JR., A. D. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. **J. Bras. Nefrol.** 35, 332–340, 2013.

PEYROU, M.; HANNA, P. E.; CRIBB, A. E. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. **Toxicol. Sci.** 99, 346–353, 2007.

PIETSCH, E. C. *et al.* Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. **J. Biol. Chem.** 2003.

PIKE J. W.; MEYER M. B. Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression. **J Steroid Biochem Mol Biol.**144: 5–11, 2014.

PINTO, A. L.; LIPPARD, S. J. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. **Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer.** 780, 167–180, 1985.

PRASAJA, Y.; SUTANDYO, N.; ANDRAJATI, R. Incidence of cisplatin-induced nephrotoxicity and associated factors among cancer patients in Indonesia. **Asian Pac J Cancer Prev.** 16, 1117–1122, 2015.

PRICE, P. M. Dependence of cisplatin-induced cell death in vitro and in vivo on cyclin-dependent kinase 2. **J. Am. Soc. Nephrol.** 17, 2434–2442, 2006.

RABELO, L. A. *et al.* Genetic Deletion of ACE2 Induces Vascular Dysfunction in C57BL/6 Mice: Role of Nitric Oxide Imbalance and Oxidative Stress. **PLoS ONE.** 11, 150-255, 2006.

RAHMAN, M.; SHAD, F.; SMITH, M.C. Acute kidney injury: A guide to diagnosis and management. **Am. Fam. Physician.** 86, 631–639, 2012.

RAMESH, G.; REEVES, W.B. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. **J. Clin. Investig.** 110, 835–842, 2002.

REIS, N. G., *et al.*, Protective effect of calcitriol on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats. **Sci Rep.** 9, 1–10, 2019.

RIDZUAN, N. R. A. Protective role of natural products in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry.** 19, 1134–1143, 2019.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature.** 205, 698, 1965.

RUBERA, I. *et al.* Role of CFTR in oxidative stress and suicidal death of renal cells during cisplatin-induced nephrotoxicity. **Cell Death Dis.** 4, 817, 2013.

SAITO, Y. *et al.* point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. **Free Radic. Res.** 40, 619–630, 2006.

SALOMONSSON, M.; ARENDSHORST, W. J. Calcium recruitment in renal vasculature: NE effects on blood flow and cytosolic calcium concentration. **Am. J. Physiol. Ren. Physiol.** 276, 700–710, 1999.

SAMPAIO, W. O. *et al.* Angiotensin-(1-7)through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension.** 49, 185–192, 2007.

SANCHO-MARTÍNEZ, S. M. *et al.* Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. **Toxicol. Sci.** 122, 73–85, 2011.

SARDAR, S.; CHAKRABORTY, A.; CHATTERJEE, M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague–Dawley rats. **Int J Vitam Nutr Res.** 66, 39-45, 1996.

SASAKI, A. *et al.* Dimethyl fumarate ameliorates cisplatin-induced renal tubulointerstitial lesions. **J. Toxicol. Pathol.** 32, 79–89, 2019.

SAXENA, A. *et al.* Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine.** 74, 27–34, 2015.

SCAFFIDI, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **Embo J.** 17, 1675–1687, 1998.

SHENOY, V. *et al.* Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 187, 648–657, 2013.

SHINKI T. *et al.* Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D -24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D in rat kidney but not in intestine.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene.** 22, 7265–7279, 2003.

SILVA, I. C. J.; LAZARETTI-CASTRO, M. Vitamin D metabolism and extraskeletal outcomes: an update. **Arch Endocrinol Metab.** 66, 748-55, 2022.

SIMI, A. *et al.* Mechanisms of regulation for interleukin—1 β in neurodegenerative disease. **Neuropharmacology.** 52, 1563–1569, 2007.

SLEIGHTHOLM, R. L. *et al.* Emerging roles of the CXCL12/CXCR4 axis in pancreatic cancer progression and therapy. **Pharmacol Ther.** 179,158–170, 2017.

SUN, D. *et al.* Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. **Life Sci.** 90, 900–909, 2012.

SZTURZ, P. *et al.* Low-dose vs. high-dose cisplatin: Lessons learned from 59 chemoradiotherapy trials in head and neck cancer. **Front. Oncol.** 9, 86, 2019.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell.** 140, 805–820, 2010.

TAMMELA T. *et al.* The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovasc Res.** 65, 550–563, 2005.

TAN, R. Z. *et al.* Quercetin protects against cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting Mincle/Syk/NF- κ B signaling maintained macrophage inflammation. **Phytother. Res.** 34, 139–152, 2020.

TAN, X. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.** 17, 3382–3393, 2006.

TRIMMER, E. E.; ESSIGMANN, J. M. Cisplatin. **Essays Biochem.** 34, 191–211, 1999.

TOGNA, G. I. *et al.* Cisplatin triggers platelet activation. **Thromb. Res.** 99, 503–509, 2000.

TÖGEL, F. *et al.* Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. **Kidney Int.** 67, 1772–1784, 2005.

TOWNSEND, D. M. *et al.* Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Biomed. Pharmacother.** 63, 79–85, 2009.

VANDENABEELE, P. *et al.* Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 11, 700–714, 2010.

VARAGIC, J. *et al.* Influence of nebivolol and metoprolol on inflammatory mediators in human coronary endothelial or smooth muscle cells. Effects on neointima formation after balloon denudation in carotid arteries of rats treated with nebivolol. **Cell. Physiol. Biochem.** 19, 129–136, 2007.

VEIRAS, L. C. Tubular IL-1 β Induces Salt Sensitivity in Diabetes by Activating Renal Macrophages. **Circ. Res.** 131, 59–73, 2022.

VENKATACHALAM M. A., *et al.*, Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. **J Am Soc Nephrol.** 26, 1765-76, 2015.

VISACRI, M. B. Adverse drug reactions and kinetics of cisplatin excretion in urine of patients undergoing cisplatin chemotherapy and radiotherapy for head and neck cancer: a prospective study. **Daru.** 25, 12, 2017.

VOLAREVIC, V. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: A balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. **J. Biomed. Sci.** 26, 25, 2019.

VOLAREVIC, V. *et al.* Galectin 3 protects from cisplatin-induced acute kidney injury by promoting TLR-2-dependent activation of IDO1/Kynurenine pathway in renal DCs. **Theranostics.** 9, 5976, 2019.

WAGNER, M. J. *et al.* Chemotherapy for Bone Sarcoma in Adults. **J. Oncol. Pract.** 12, 208–216, 2016.

WALSH, M. P. Regulation of vascular smooth muscle tone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 72, 919–936, 1994.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat. Rev. Drug Discovery** 4, 307–320, 2005.

WANG, S. *et al.* Cisplatin suppresses the growth and proliferation of breast and cervical cancer cell lines by inhibiting integrin β 5-mediated glycolysis. **Am. J. Cancer Res.** 6, 1108–1117, 2016.

WANG, Y.; XIE, Y.; OUPICKÝ, D. Potential of CXCR4/CXCL12 Chemokine Axis in Cancer Drug Delivery. **Curr Pharmacol Rep.** 2, 1–10, 2016.

WANG, W. W. *et al.* IL-10 from dendritic cells but not from T regulatory cells protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. **PLoS ONE.** 15, e0238816, 2020.

WASEEM, M.; PARVEZ, S. Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: Modulatory role of curcumin. **Food and Chemical Toxicology**. 53, 334–342, 2013.

WIMALAWANSA S. J. Vitamin D deficiency: effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation, and aging. **Biology**. 8, 30, 2019.

Winston, J.A.; Safirstein, R. Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Am. J. Physiol.* 1985, 249, F490–F496.

WOBKE, T. K.; SORG, B. L.; STEINHILBER, D. Vitamin D in inflammatory diseases. **Front. Physiol.** 5, 244, 2014.

XU, Y. *et al.* A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*. 26, 2647–2658, 2015.

YANG, S. *et al.* Mitochondria-targeted peptide SS-31 prevent on cisplatin-induced acute kidney injury via regulating mitochondrial ROS-NLRP3 pathway. **Biomed. Pharmacother.** 130, 110521, 2020.

YAO, X. *et al.* Cisplatin nephrotoxicity: a review. **Am J Med Sci**. 334, 115–124, 2007.

KIDERA, Y. *et al.* Risk factors for cisplatin-induced nephrotoxicity and potential of magnesium supplementation for renal protection. **PLoS One**. 9, 2014.

YE, Z. W. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1850, 1607–1621, 2015.

YE, J. J. Levels of vitamin D receptor and CYP24A1 in patients with end-stage renal disease. **Afr. Health Sci**. 16, 462–467, 2016.

YIN, Z. *et al.* IL-10 regulates murine lupus. **J. Immunol**. 169, 2148–2155, 2002.

YONEZAWA, A. *et al.* Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1–3 and multidrug and toxin extrusion family). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 319, 879–886, 2006.

YOO, K.H. *et al.* Capillary rarefaction and altered renal development: The imbalance between pro- and anti-angiogenic factors in response to angiotensin II inhibition in the developing rat kidney. **J. Mol. Histol.** 49, 219–228, 2018.

YUAN, A. *et al.* Chemokine receptor Cxcr4 contributes to kidney fibrosis via multiple effectors. **Am J Physiol Renal Physiol.** 308, 459–472, 2015.

ZANETTI, E. *et al.* Evaluation of aging influence on renal toxicity caused by segment-specific nephrotoxics of the proximal tubule in rat. **J Appl Toxicol.** 30, 42–50, 2010.

ZELLA L. A. *et al.* Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D. **Mol Endocrinol.** 20, 1231–1247, 2006.

ZHANG, L. *et al.* Cisplatin-induced toxicity is associated with platinum deposition in mouse kidney mitochondria in vivo and with selective inactivation of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in LLC-PK1 cells. **Biochemistry.** 45, 8959–8971, 2006.

ZHANG, B. *et al.* Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- α produced by renal parenchymal cells. **Kidney Int.** 72, 37–44, 2007.

ZHANG, C. *et al.* Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. **Circ. Res.** 2003, 92, 322–329, 2003.

ZHANG, D. W. *et al.* RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. **Science.** 325, 332, 2009.

ZHAO H. *et al.* CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. **Oncotarget.** 6, 5022–5040, 2015

ZHANG, Y. *et al.* The effect of monotropein on alleviating cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting oxidative damage, inflammation and apoptosis. **Biomed. Pharmacother.** 129, 110-408, 2020.

ZHU, S. *et al.* DNA damage response in cisplatin induced nephrotoxicity. **Arch. Toxicol.** 89, 2197–2205, 2015.

ZICHE, M. *et al.* Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. **Circ. Res.** 1997.

ZLOTNIK, A.; BURKHARDT, A. M.; HOMEY, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. **Nat Rev Immunol.** 11, 2011.

ZUK, A. *et al.* Antagonism as a therapeutic approach to prevent acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol.** 307, 783–797, 2014.

ZWICKER, S. *et al.* Th17 micro-milieu regulates NLRP1-dependent caspase-5 activity in skin autoinflammation, **PLoS One.** 12, e0175153, 2017.

Apêndices

9. APÊNDICES

Comitê de ética

	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>	
		
<h3 style="margin: 0;">CERTIFICADO</h3>		
<p>Certificamos que o Protocolo intitulado "<i>Influência da Vitamina D na evolução da lesão renal provocada pela cisplatina em ratos</i>", registrado com o número 115/2018, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao <i>filo Chordata, subfilo Vertebrata</i> (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 27 de agosto de 2018.</p> <p>Este Protocolo prevê a utilização de 50 ratos Wistar-OLD machos pesando 200g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do <i>Campus</i> de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/08/2018 a 15/06/2022.</p> <p>We certify that the Protocol n° 115/2018, entitled "<i>Influence of Vitamin D on the evolution of renal injury caused by cisplatin in rats</i>", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for 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 08/27/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from <i>phylumChordata, subphylumVertebrata</i> (except humans) for research purposes, and includes the use of 50 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 06/15/2022.</p>		
<p>Ribeirão Preto, 27 de agosto de 2018</p> <div style="text-align: center;">  Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho Coordenador da CEUA-FMRP - USP </div>		
<hr style="border: 0.5px solid black;"/> <p style="font-size: 8px; margin: 0;">Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3000 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14048-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315-3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br</p>		

Artigo publicado como primeiro autor (2022)

Article

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

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

¹ Department of Physiology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto 140490-900, Sao Paulo, Brazil

² Department of Medical Clinic, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto 140490-900, Sao Paulo, Brazil

* Correspondence: tmcoimbr@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*, 15877. <https://doi.org/10.3390/ijms232415877>

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

superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) [16]. The generation of oxidative stress results from this imbalance [17]. Oxidative stress caused by CP has been associated with endothelial damage that results in increased production of ROS which interferes with the activity of vasoactive substances [18].

The role of inflammation in the pathogenesis of CP-induced AKI has already been demonstrated by several studies [11,19–22]. CP activates the expression of critical proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , which is crucial for responses to infection and injury [23]. IL-1 β is expressed in a wide range of tissues and various cells, especially in macrophages during the inflammatory process. It is also expressed in the glomeruli, in the outer cortical areas of the kidney and in many specific cell types, including endothelial and epithelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells [24,25].

The active form of vitamin D (calcitriol or 1,25-dihydroxy vitamin D₃), a fat-soluble nutrient, is known for regulating the metabolism of calcium and phosphorus, essential factors in bone remodeling [26]. Studies have also shown that calcitriol acts through the vitamin D receptor (VDR) of most cells. It can regulate the transcription of over 200 genes and directly or indirectly influence cell proliferation, differentiation and the immune system [27]. Calcitriol is vital in maintaining the structure and cell integrity and preserving renal function [28]. In addition, our research group showed that calcitriol played an essential role in the oxidative damage caused by AKI in a rhabdomyolysis model by decreasing oxidative damage markers [29].

In the present study, we explored the effects of calcitriol administration on the pathophysiology of cisplatin-induced AKI that involved four main mechanisms: (1) proximal tubular injury, (2) oxidative stress, (3) inflammation and (4) renal vascular damage. We hypothesized that treatment with calcitriol could modulate or even attenuate activation of these mechanisms, protecting the kidney from changes in function and structure induced by CP.

2. Results

2.1. Studies of Renal Function

Rats injected with cisplatin showed increased levels of plasma creatinine (Pcreat), fractional excretion of sodium (FENa+) and decreased glomerular filtration rate (GFR) when compared to control groups (SAL and SAL + calcitriol). The CP group treated with calcitriol showed an improvement in renal function (Table 1).

Table 1. Plasma creatinine (Pcreat), fractional sodium excretion (FENa+) and glomerular filtration rate (GFR) 5 days after injection of CP or vehicle of the SAL ($n = 6$), SAL + calcitriol ($n = 6$), CP ($n = 8$) and CP + calcitriol ($n = 8$) groups.

Group	SAL	SAL + Calcitriol	CP	CP + Calcitriol
Pcreat (mg %)	0.54 \pm 0.03	0.45 \pm 0.01	6.18 \pm 0.74 ***; ●●●	1.89 \pm 0.43 ■■■■
FE+ Na (%)	0.25 \pm 0.5	0.26 \pm 0.02	2.23 \pm 1.14 ***; ●●●	1.48 \pm 0.24 **; ●
GFR (mL/min ¹ 100 g ¹)	0.79 \pm 0.03	1.46 \pm 0.21	0.03 \pm 0.01 ***; ●●●	0.52 \pm 0.15 **; ●●; ■

Data are expressed as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. SAL; ● $p < 0.05$, ●● $p < 0.01$, ●●● $p < 0.001$ vs. SAL + calcitriol; ■ $p < 0.05$, ■■■ $p < 0.001$ vs. CP.

2.2. Cisplatin Provoked Renal Injury and Inflammation That Was Ameliorated by Calcitriol Treatment

The typical histological features of CP-induced AKI (characterized by loss of the brush border, cell necrosis, tubular dilation, sloughing and obstruction) and a higher tubular damage score were observed following the CP treatment. Nevertheless, these abnormalities were markedly reduced by treatment with calcitriol (CP + calcitriol group) (Figure 1A–E).

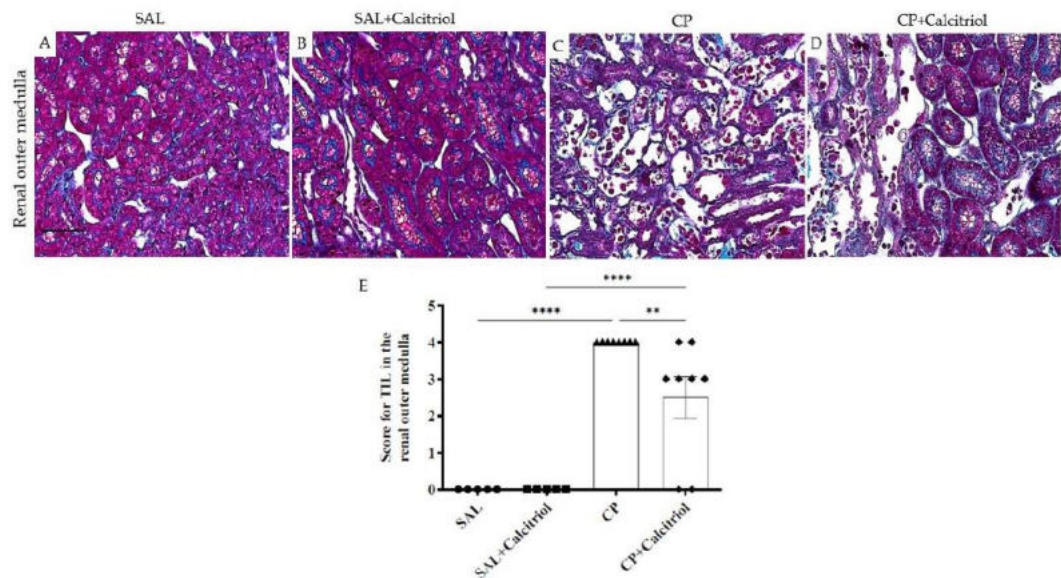


Figure 1. Histological sections stained with Masson's Trichrome representative of the renal outer medulla of groups SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) (bar represents 50 μ m). The score for TIL in the renal outer medulla (E) of all experimental groups. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$ for each group). ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001 \times 400$.

The epithelial cells express vimentin before differentiation or in the transdifferentiation processes that occur through a process known as the epithelial–mesenchymal transition (EMT) [30]. During this process, these cells can proliferate, migrate and produce an extracellular matrix. Therefore, this protein can be used as a marker of cellular damage [27,28]. The immunohistochemical analysis showed an increase in the expression of vimentin in the renal outer medulla in the animals in the CP group compared to the control groups (SAL and SAL + calcitriol) (Figure 2A–D). Treatment with calcitriol decreased vimentin expression in the renal outer medulla of these animals (Figure 2I–K). The tubular injury caused by CP was also evaluated through the cell proliferation. The number of PCNA-positive cells was analyzed in the renal outer medulla (Figure 2E–H). PCNA is an antigen in the nucleus of cells present in the proliferation phase that are indicative of recent tubular injury. The number of PCNA-positive cells was increased in the renal outer medulla of the animals injected with CP compared to the control groups (SAL and SAL + calcitriol), showing an intense tubular lesion in these animals. However, such alterations were attenuated by treatment with calcitriol (Figure 2H–L).

An inflammatory process evidenced by a large infiltration of macrophages (ED1-positive cells) in the tubulointerstitial of the outer medulla from the kidneys in the cisplatin-treated rats was also observed (Figure 3A–D). Calcitriol treatment prevented macrophage infiltration in this tubulointerstitial area (Figure 3E). Analysis of IL-1 β expression in renal tissue showed higher levels of this cytokine in the CP group than in the controls (Figure 3F), which was attenuated by calcitriol treatment. Interleukin-10 (IL-10), a cytokine with anti-inflammatory and immunomodulatory functions, showed a downregulation in the CP group, while in the calcitriol group, upregulation was observed (Figure 3G).

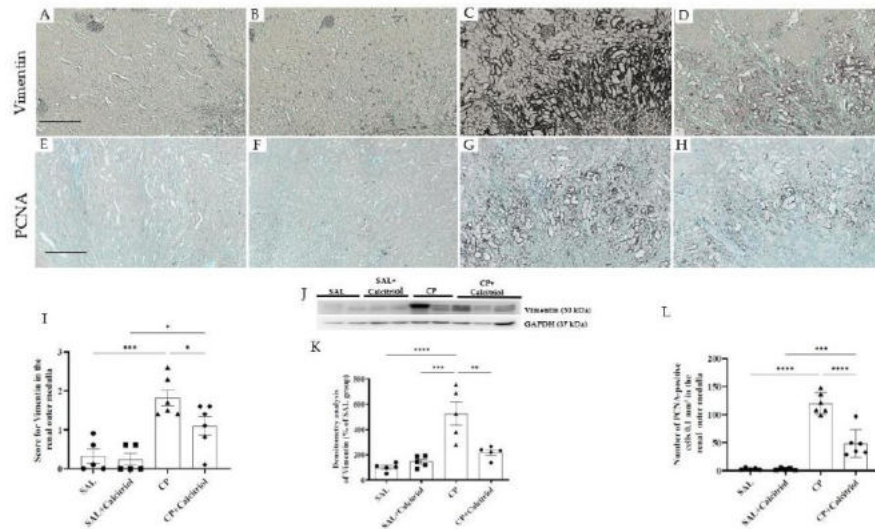


Figure 2. Immunolocalization of vimentin (A–D) and PCNA (E–H) in the renal outer medulla of the SAL (A,E), SAL + calcitriol (B,F), CP (C,G) and CP + calcitriol (D,H) groups. The bar indicates 200 μ m. The score for vimentin (I) and the number of PCNA+ cells (L) in the renal outer medulla in the different groups. Western blot analysis of vimentin and GAPDH (J) in the renal tissue from all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol). Vimentin densitometry (K). The densitometric ratio between vimentin and GAPDH was calculated, and data are expressed in comparison with the control group, with the mean control value (\pm SEM) designated as 100% and expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$ for each group). Blots are representative images of independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; magnification, $\times 100$.

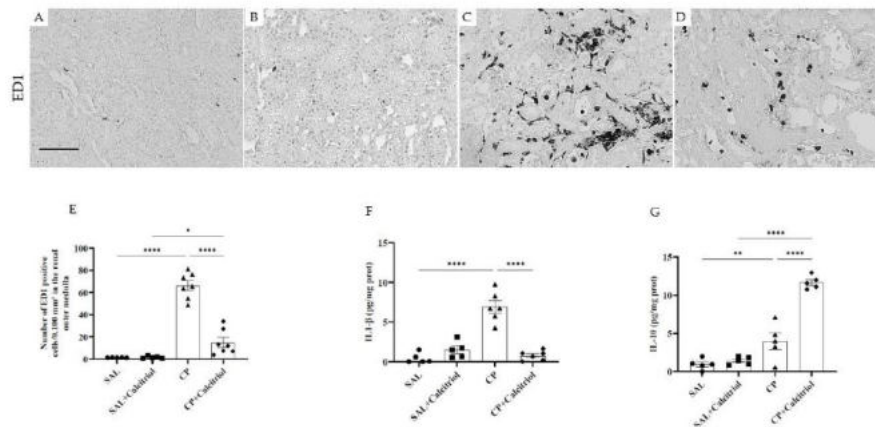


Figure 3. Immunolocalization of ED1-positive cells (macrophages) in the outer renal medulla of the SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) groups (bar represents 50 μ m). The number of ED1-positive cells in all experimental groups' outer renal medulla (E). Values are given as the mean \pm SEM. Renal tissue levels of IL (interleukin)-1 β (F) and IL (interleukin)-10 (G) from control (SAL and SAL + calcitriol) and experimental (CP and CP + calcitriol) groups. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$ for each group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; magnification, $\times 400$.

2.3. Evaluation of 25-OH Vitamin D, VDR and the Cubilin Receptor

There was no significant difference between groups either concerning the mean serum concentration of 25-OH vitamin D or the classification of levels as deficient (levels < 20 ng/mL) or sufficient (levels > 30 ng/mL) (Figure 4F). However, the Western blot analysis demonstrated reduced VDR expression in renal tissue from the CP group compared with the control groups (SAL and SAL + calcitriol) (Figure 4G,H). The reduction in the expression of this protein induced by CP was attenuated by treatment with calcitriol. We also observed in immunohistochemical analysis that the number of tubules with a brush border marked with cubilin receptors was smaller in the CP group compared with the control groups (SAL and SAL + calcitriol) (Figure 4A–D). Calcitriol treatment attenuated these alterations (Figure 4E).

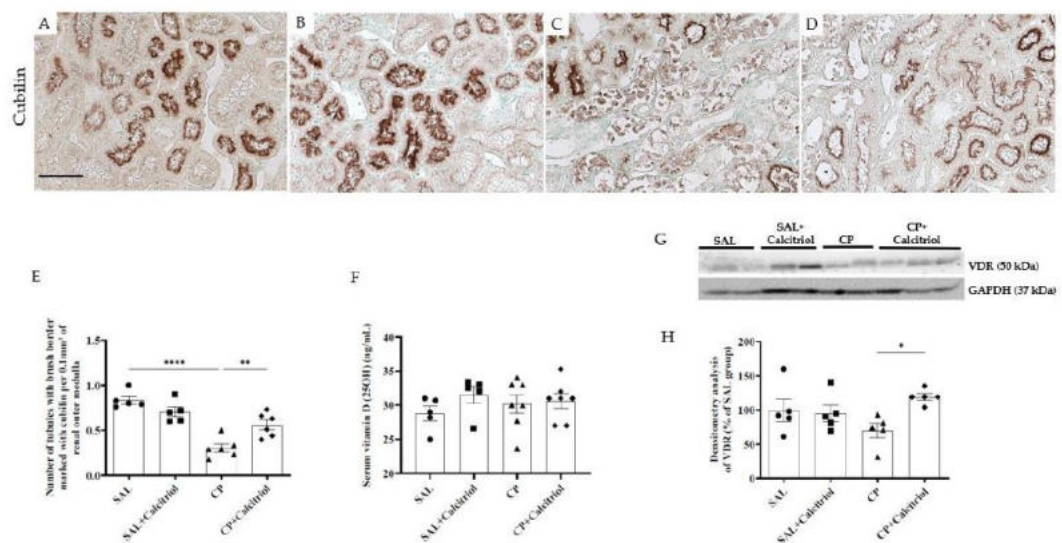


Figure 4. Immunolocalization of cubilin in the renal outer medulla of the SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) groups (bar indicates 50 μ m). The number of tubules with a brush border marked with cubilin (E) from all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol). Serum levels of 25(OH)D of all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol) (F). Western blot analysis of vitamin D receptor (VDR) and GAPDH (G) in the renal tissue from all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol). VDR densitometry (H). The densitometric ratio between VDR and GAPDH was calculated, and data are expressed in comparison with the control group, with the mean control value (\pm SEM) designated as 100% and expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$ for each group). Blots are representative images of independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; magnification, $\times 400$.

2.4. The Endothelial Damage Induced by CP Was also Improved by Calcitriol

The immunohistochemistry studies with JG12, a marker of endothelial cells, showed that CP animals had fewer capillaries in the renal cortex and outer medullae (Figure 5A–D). The effect of CP on the renal endothelium, evaluated by Western blot using a specific marker for endothelial cells (CD34), showed that the CD34 expression was reduced in the CP groups compared to the control groups (SAL and SAL + calcitriol) (Figure 5F). The calcitriol treatment improved these alterations (Figure 5E,G). Western blot analysis also demonstrated a reduction in tissue NOS3 (Figure 5H,I) and p-NOS (Figure 5J,K) expression in the CP group compared to the CP + calcitriol group.

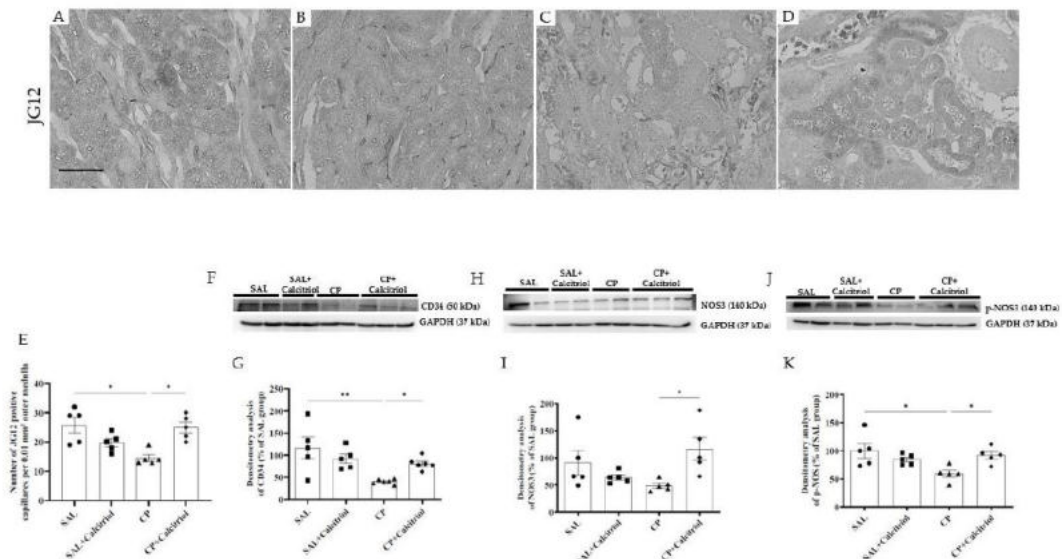


Figure 5. Immunolocalization of JG12 (A–D) in the renal outer medulla of the SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) animals. The bar indicates 50 μ m. The number of JG12-positive capillaries in all experimental groups' outer renal medulla (E). Western blot analysis of CD34 (F), NOS3 (H) and p-NOS (J) in the renal tissue from all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol). Densitometry of CD34 (G), NOS3 (I) and p-NOS (K). The densitometric ratio between CD34, NOS3, p-NOS and GAPDH was calculated, and the data are expressed in comparison with the control group, with the mean control value (\pm SEM) designated as 100% and expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ –8 for each group). Blots are representative images of independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a significant proangiogenic factor in angiogenesis. We observed that the expression of VEGF was reduced in the animals of the CP group compared with that in the control rats (SAL and SAL + calcitriol) (Figure 6A,B). This alteration was reversed by treatment with calcitriol, evidenced by the increase in the expression of VEGF in the CP + calcitriol group. VEGF exerts its actions through its VEGFR2 receptor on target cells. We observed that those in the CP + calcitriol group also showed an increase in the expression of VEGFR2 in the kidney tissue (Figure 6C,D).

CXCR4 is a receptor present on endothelial cells and pericytes of hypoxic tissues. We observed that the animals in the CP group showed an increase in the renal expression of this receptor compared to controls (SAL and SAL + calcitriol) (Figure 6E,F). This increase in expression was attenuated in the CP + calcitriol group. Reducing antioxidant enzymes is one of the mechanisms of generating oxidative stress triggered by CP, and the increase in oxidative stress leads to endothelial damage. To assess the participation of this mechanism, we analyzed the expression of the antioxidant enzyme EC-SOD in kidney tissue (Figure 6F–H). We observed that CP reduced the expression of EC-SOD, and the antioxidant action of calcitriol was confirmed by the increased expression of EC-SOD in the SAL + calcitriol group. This action was also observed in the animals of the CP + calcitriol group, evidenced by the maintenance of EC-SOD levels in this group.

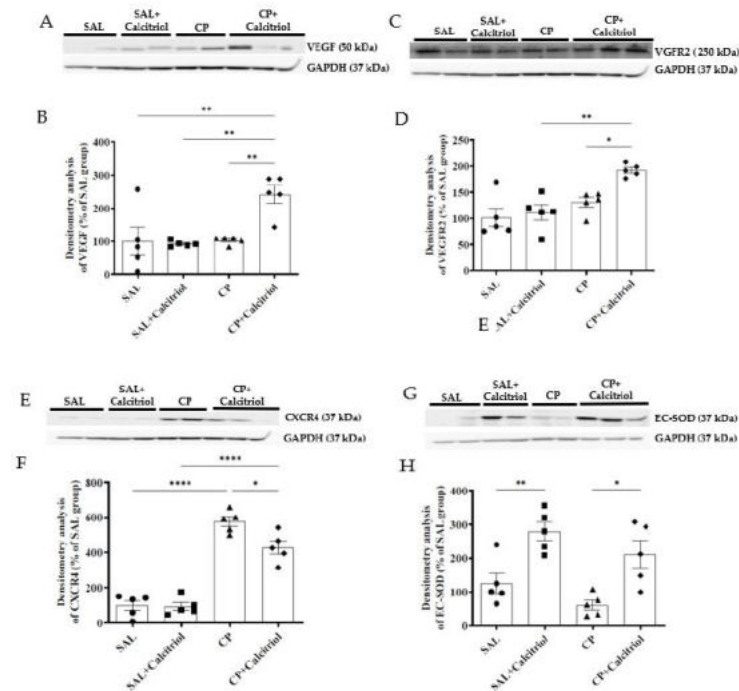


Figure 6. Western blot analysis of VEGF (A), VEGFR2 (C), CXCR4 (E) and EC-SOD (G) in the renal tissue from all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol). Densitometry of VEGF (B), VEGFR2 (D), CXCR4 (F) and EC-SOD (H). The densitometric ratio between VEGF, VEGFR2, CXCR4, EC-SOD and GAPDH was calculated, and the data are expressed in comparison with the control group, with the mean control value (\pm SEM) designated as 100% and expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$ for each group). Blots are representative images of independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

3. Discussion

The data presented in this manuscript provide evidence that calcitriol can attenuate inflammation, endothelial injury, oxidative stresses and epithelial cell injury in cisplatin-induced AKI. In addition, our study demonstrates that calcitriol also may display an anti-inflammatory action through modulation of IL-1 β and IL-10, leading to a downregulation of IL-1 β and upregulation of IL-10. Consistent with our data, previous studies have shown that cisplatin (CP) nephrotoxicity was associated with increased expression of IL-1 β [31–33], and its inhibition alone does not protect against CP-induced AKI [31]. A recent study revealed that renal tubular epithelial cell-derived IL-1 β polarizes renal macrophages toward a proinflammatory phenotype that stimulates salt sensitivity through the increase of renal IL-6 [34]. IL-10 is a cytokine known for its anti-inflammatory actions [35] and is produced by many immune cells [36,37]. Its anti-inflammatory actions are attributed to its ability to inhibit the infiltration of monocytes and neutrophils and the production of inflammatory cytokines [38–40]. A reduction in IL-10 levels has already been observed in CP nephrotoxicity [31]. Its increased expression has been suggested to be protective against CP-induced kidney injury [41,42]. Amirshahrokhi et al. (2015) observed that the reduction in renal toxicity caused by CP might be related to inhibiting proinflammatory cytokines [32]. Our results showed that this exact mechanism could be involved in calcitriol's downregulation of IL-1B and reduced inflammation. In addition, vitamin D induces an

increase in IL-10 secretion by regulatory T cells, an effect observed in a study with a patient with systemic sclerosis [43].

The increased vimentin expression was also observed in tubular cell injuries in the renal outer medulla from CP-injected rats. Tubular cells only express vimentin when proliferating, demonstrating recent lesions of these cells. The increased number of PCNA-positive cells confirmed this result. Calcitriol treatment decreased tubular cell injury and the expression of vimentin and PCNA in the animals injected with CP. Tan et al. (2006) observed that treatment with paricalcitol (a synthetic vitamin D analog) significantly reduced the expression of PCNA and attenuated renal interstitial fibrosis in a model of obstructive nephropathy [44]. The authors also observed that vitamin D treatment restored the expression of the VDR receptor, blocked epithelial–mesenchymal transition and inhibited cell proliferation, demonstrating that vitamin D plays a protective role in cellular integrity against this cell injury process.

Previous results from clinical and animal studies have suggested that VDR activation has beneficial effects on various renal diseases [45,46]. To address this question, we examined the VDR in kidney tissue and found a lower expression in the animals from the CP group, while the CP group that received calcitriol showed an increase in its expression.

In the present study, we observed that the lesions in the renal outer medulla were associated with decreased cubilin receptor expression in the apical region of the tubule cells in the CP group. The reduction in the number of tubules expressing cubilin in the cell brush border could lead to disturbances in vitamin D activation [47,48]. Our results showed that calcitriol-treated rats present preserved cubilin receptors, demonstrating the renoprotective role of calcitriol. Additionally, studies have shown that vitamin D deficiency is a risk factor for contrast-induced AKI due to an imbalance in intrarenal vasoactive substances and oxidative stress [49]. Our results showed that decreased expression of EC-SOD (an antioxidant enzyme) induced by CP was attenuated by calcitriol treatment. A similar effect was observed by Li et al. (2017), where pretreatment with cholecalciferol, an inactive form of vitamin D3, partially protected against ischemia-reperfusion-induced AKI through regulation of oxidant enzymes and suppression of oxidative stress [50].

CP-induced nephrotoxicity is due in part to vascular damage and the vasoconstriction associated with endothelial dysfunction and abnormal vascular self-regulation [51]. Vascular injury results in decreased renal blood flow and GFR, causing hypoxic tubular damage [52]. We have previously shown the participation of the endothelium in the development of AKI induced by CP [53].

We used JG12 to assess changes in capillary density in the outer medulla of the kidney. JG12 is a specific marker for the blood vessel endothelium and discs, and is instinctively expressed by the endothelial cells of tubulointerstitial vessels in the kidney [54,55]. Using a unilateral ureteral obstruction model, Sun et al. (2012) observed an alteration in peritubular capillary density detected using JG12 immunostaining [56]. In the present study, we observed that JG12-positive peritubular capillaries were markedly diminished from the outer medulla regions with significant interstitial expansion and tubular atrophy.

Following the loss of the peritubular capillaries, the CP group also presented with decreased production of NOS3 and p-NOS. In the vascular endothelium, NOS3, which is also known as nitric oxide synthase (eNOS), is an enzyme that produces NO. The decreased p-NOS expression in the renal tissues in our study may be due to decreased NOS3 expression, which can lead to increased vasoconstriction and contribute to alterations in blood pressure [57].

Renal vasculature quiescence is tightly regulated by the balance between pro- and antiangiogenic factors in healthy kidneys. However, this quiescence can be disrupted during AKI, resulting in an antiangiogenic environment with the loss of peritubular capillaries [58]. The increase in the expression of VEGF and VEGFR in the calcitriol group reinforces the role of calcitriol as an endothelium promoter since several studies demonstrate that VEGF promotes the growth of endothelium and protects the endothelial cells from apoptosis.

We next evaluated the effects of CP on CXCR4 expression in the kidney tissue. The increased expression of CXCR4 observed in the CP group could also contribute to epithelial and endothelial cell damage. In recent work, Chang et al. (2021) observed that suppression of the SDF-1/CXCR4 pathway resulted in increased tubular cell regeneration and reduced cell death and attenuation of microvascular rarefaction in IR-AKI mice kidneys [59]. This finding is consistent with our data, which show that calcitriol suppressed CXCR4 expression in the CP + calcitriol group, which was followed by the amelioration of endothelium and epithelial cell dysfunction.

In this study, we demonstrate that calcitriol attenuates the morphological and functional changes that occur in CP-induced AKI. However, some limitations must be recognized. First, studies through *in vitro* experiments using primary kidney endothelial cells and angiogenesis assays should be performed to better evaluate these events on the renal microvasculature. Second, we measured plasma creatinine levels with routine clinical laboratory methods but not with high-performance liquid chromatography, a more reliable method for evaluating plasma creatinine levels. Third, studies are needed to evaluate how calcitriol can reduce inflammatory cell infiltration and epithelial cell proliferation and accelerate the resolution and repair of epithelial cell injury. Despite these limitations involving experimental models, the present study adds to the literature concerning the participation of calcitriol administration on proximal tubular injury, oxidative stress, inflammation and vascular injury observed in CP-induced AKI.

In conclusion, our study suggests that calcitriol attenuates tubular injury, endothelial damage, reductions in antioxidant enzymes and the inflammatory process observed in the renal outer medulla observed in CP-induced AKI.

4. Materials and Methods

4.1. Animal Model and Experimental Design

The protocols were performed by the Animal Experimentation Committee of the University of São Paulo at the Ribeirão Preto Medical School (COBEA/CETEA/FMRP-USP, protocol no. 115/2018). This study used male Hannover rats (200–300 g). The rats were housed four per cage according to the groups, with a room temperature of 22 ± 2 °C, a 12 h light/dark cycle with a chow diet and water *ad libitum*. The animals were divided into four groups: (1) SAL (0.9% saline, $n = 6$), (2) SAL + calcitriol (0.9% saline + calcitriol, $n = 6$), (3) CP (cisplatin 5mg/kg, $n = 8$) and (4) CP + calcitriol (cisplatin 5mg/kg + calcitriol, $n = 8$). Calcitriol (6 ng/day, Calcijex, Abbvie Laboratories, North Chicago, IL, USA) or vehicle (0.9% NaCl) was administered using miniosmotic pumps (model 2004, Alzet, Cupertino, CA, USA) implanted subcutaneously under isoflurane anesthesia (Cristalia, Brazil). Calcitriol or vehicle supplementation was started two weeks before the injection of CP and was maintained five days later, corresponding to the period evaluated. The dose of calcitriol treatment was selected according to previous studies [27,28,60]. None of the rats died after cisplatin administration. All animals were used in the study.

4.2. Renal Function Studies

On the fourth day after CP injection, the animals were placed in metabolic cages for 24 h to collect urine samples. On the fifth day after CP injection, the animals were anesthetized (xylazine 0.1 mL/100 g and ketamine 0.05 mL/100 g, *i.p.*), the aorta was cannulated and blood samples were collected. Renal function was assessed using 24 h urine and blood samples. Plasma and urinary creatinine were determined by the colorimetric method using picric acid as a chromogen [61]. Urinary and plasma sodium were analyzed using the ion-selective electrode quantification technique (9180 Electrolyte Analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 2004). Fractional sodium excretion was calculated by dividing sodium clearance by creatinine clearance. The results of the plasmatic and urinary creatinine quantification were used to determine the glomerular filtration rate (GFR).

4.3. Serum 25 Hydroxyvitamin D (25 OHD) Levels

We assessed 25(OHD) with a direct competitive test based on the chemiluminescence principle (CLIA) (DiaSorin, Liaison®, Saluggia, Italy); this test was performed in the clinical analysis laboratories at the School of Medicine of Ribeirao Preto Hospital and Clinics, which participates in national and international quality assurance certification.

4.4. Histological Studies

Histological sections (4 µm thick) were stained using Masson's Trichrome and examined under light microscopy (Axion Vision Rel. 4.3; Zeiss, Oberkochen, Germany). Tubulointerstitial changes interstitial infiltration of inflammatory cells, atrophy of the cells of the renal tubules and dilation of the tubular lumen were evaluated.

Lesions in the renal outer medulla were graded [53] on a scale of 0–4 as follows (0 = normal; 0.5 = small focal areas; 1 = involvement of <10% of the renal outer medulla; 2 = 10–25%; 3 = 25–75%; 4 = extensive damage involving more than 75% of the renal outer medulla). Thirty grid fields measuring 0.1 mm² were evaluated in the renal outer medulla of each kidney (Axion version 4.8.3, Zeiss, Oberkochen, Germany), and the mean values per kidney were calculated.

4.5. Immunohistochemical Studies

For immunohistochemical analysis, kidney sections were deparaffinized and hydrated. Nonspecific antigen binding was blocked by incubation for 20 min with normal goat serum. The sections were incubated with anti-ED1 (1:1000, Serotec, Oxford, UK), anti-vimentin (1:500, Dako Corporation, Glostrup, Denmark), anti-PCNA (1:1000, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), α-SMA (1:100, Dako Corporation, Glostrup, Denmark), cubilin (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-aminopeptidase P (JG12) (1:1000, Bioscience, San Diego, USA) antibodies for one hour at room temperature for reaction of the primary antibody. The avidin–biotin–peroxidase complex (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) was used to detect the reaction product. The color reaction, in turn, was developed with DAB (3,3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical Company, Burlington, VT, USA) and nickel chloride in the presence of H₂O₂. Counterstaining of the sections was then performed with methyl green, which was followed by dehydration and mounting. The immunoperoxidase staining for ED1 and PCNA was determined by counting the number of positive cells in the renal outer medulla. JG12 was determined by the number of positive peritubular capillaries in the outer renal medulla. The reaction to cubilin was evaluated by counting the number of intact tubules with a cubilin-marked brush border in the tubules of the renal outer medulla. Vimentin and α-SMA were semiquantitatively graded in the outer medulla, and the mean score per kidney was calculated. The scores depended on the percentage of a grid field showing positive staining as follows: 0 = absent or <5% staining, 1 = 5–25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75% and 4 = >75% staining. Thirty consecutive fields (0.1 mm² each) for the outer medulla were evaluated. The average score per kidney was calculated. All fields were analyzed under 400× magnification.

4.6. Western Blot Studies

To perform the Western blot, the nonperfused kidney tissues were homogenized in lysis buffer: Tris-HCL (50 Mm, pH 7.4), NaCl (150 mM), triton X-100 (1%), dodecyl sulfate sodium (SDS; 0.1%), aprotinin (1 µg/mL), leupeptin (1 µg/mL), sodium fluoride (25 Mm), sodium ethylenediamine acid tetrapyrophosphate (1mM), sodium fluoride (25 Mm) and ethylene diamine tetraacetic acid (0.001 M EDTA, pH 8) at 4 °C [56]. Bradford's method (1976) measured the proteins in lysate samples. Renal expressions of eNOS, p-eNOS, EC-SOD, VEGF, VEGFR2, CXCR4, CD34, vimentin and VDR were evaluated [62]. Renal lysate samples containing 30, 60 or 90 µg of protein were solubilized in sample buffer, heated to 100 °C for 5 min and then applied to a 10% or 12% polyacrylamide gel. After the run, the samples were transferred from the gel to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated or not for one hour in a 5% molecular blocking buffer. Subsequently, the

membranes were washed in TBSt and incubated with the primary antibodies: anti-NOS3 (1/200, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-p-eNOS (1/200, Santa Cruz Biotechnology), anti-EC-SOD (1/500, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology), anti-VEGF (1/500, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology), anti-VEGFR2 (1/200, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology), anti-CXCR4 (1/1000, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology), anti-VDR (1/500, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology), anti-Vimentina (1/500, monoclonal, Dako, Denmark), anti-CD34 (1/400, polyclonal, BIOss, Boston, MA, USA) and/or anti-GAPDH (1/1000, monoclonal, Sigma Chemical Company, Burlington, NJ, USA). The membranes were washed and incubated with anti-rabbit (1/10,000) or mouse (1/10,000) anti-IgG secondary antibodies linked to peroxide (Dako, Denmark) for one hour at room temperature. The result of the reaction was detected with luminol and captured in a computerized system. The intensity of the identified bands was quantified by densitometry with NIH Image J software (Research Services Branch, USA) and reported in arbitrary units. Protein estimates were evaluated by the Bradford method.

4.7. ELISA Studies

Levels of IL-1 β and IL-10 were measured in kidney tissue samples, which were stored at -70°C until analysis. The content was determined using ELISA kits according to the manufacturer's guidelines (Alpco, Keewaydin Drive, Tulane, USA; Pierce, Waltham, MA, USA, respectively). IL-1 β and IL-10 values are reported in picograms/milligrams (pg/mg) of protein.

4.8. Statistical Analyses

For data with a normal distribution, analysis of variance and the Newman-Keuls multiple comparison tests were applied. For data not normally distributed, the Kruskal-Wallis nonparametric test followed by Dunn's posttest was used. The Kolmogorov-Smirnov test investigated the normality of the dependent variables. Data are presented as mean \pm SEM. GraphPad Prism version 9.0 for Windows (GraphPad Software 9.0, San Diego, CA, USA) was used to perform the statistical analysis and subsequent graph construction. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

Author Contributions: B.M.O., A.L.D., H.D.C.F., C.S.S., A.L.D.M. and C.G. conducted the experiments; B.M.O. and T.M.C. designed the experimental protocol; B.M.O., L.F.d.A. and T.M.C. wrote the manuscript; R.S.C. was responsible for histopathological analysis. F.J.A.d.P. was responsible for the dosage of 25(OH) vitamin D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (finance code 141959/2018-5) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) (finance code 001).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dasari, S.; Tchounwou, P.B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharm.* **2014**, *740*, 364–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pabla, N.; Dong, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* **2008**, *73*, 994–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dos Santos, N.A.G.; Rodrigues, M.A.C.; Martins, N.M.; Dos Santos, A.C. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 1233–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Qin, Y.; Stokman, G.; Yan, K.; Ramaiahgari, S.; Verbeek, F.; De Graauw, M.; Van de Water, B.; Price, L.S. cAMP signalling protects proximal tubular epithelial cells from cisplatin-induced apoptosis via activation of Epac. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 1137–1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kdigo, A.; Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Notice. *Kidney Int.* **2012**, *2*, 1–138.
6. Yonezawa, A.; Masuda, S.; Nishihara, K.; Yano, I.; Katsura, T.; Inui, K. Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1823–1831. [[CrossRef](#)]
7. Volarevic, V.; Djokovic, B.; Jankovic, M.G.; Harrell, C.R.; Fellabaum, C.; Djonov, V.; Arsenijevic, N. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: A balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *J. Biomed. Sci.* **2019**, *26*, 25. [[CrossRef](#)]
8. Ma, Q.; Xu, Y.; Tang, L.; Yang, X.; Chen, Z.; Wei, Y.; Shao, X.; Shao, X.; Xin, Z.; Cai, B. Astragalus polysaccharide attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing oxidative damage and mitochondrial dysfunction. *Biomed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 2851349. [[CrossRef](#)]
9. Soni, H.; Kaminski, D.; Gangaraju, R.; Adebiyi, A. Cisplatin-induced oxidative stress stimulates renal Fas ligand shedding. *Ren. Fail.* **2018**, *40*, 314–322. [[CrossRef](#)]
10. Ozkok, A.; Edelstein, C.L. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 967826. [[CrossRef](#)]
11. Liu, P.; Li, X.; Lv, W.; Xu, Z. Inhibition of CXCL1-CXCR2 axis ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury by mediating inflammatory response. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *122*, 109693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ni, J.; Hou, X.; Wang, X.; Shi, Y.; Xu, L.; Zheng, X.; Liu, N.; Qiu, A.; Zhuang, S. 3-deazaneplanocin A protects against cisplatin-induced renal tubular cell apoptosis and acute kidney injury by restoration of E-cadherin expression. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wang, S.; Xie, J.; Li, J.; Liu, F.; Wu, X.; Wang, Z. Cisplatin suppresses the growth and proliferation of breast and cervical cancer celllines by inhibiting integrin $\beta 5$ -mediated glycolysis. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 1108–1117.
14. Li, Z.; Zhang, P.; Ma, Q.; Wang, D.; Zhou, T. Cisplatin-based chemoradiotherapy with 5-fluorouracil or pemetrexed in patients with locally advanced, unresectable esophageal squamous cell carcinoma: A retrospective analysis. *Mol. Clin. Oncol.* **2017**, *6*, 743–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gomez-Ruiz, S.; Maksimović-Ivanić, D.; Mijatović, S.; Kaluderović, G.N. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2012**, *2012*, 140–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jesse, C.R.; Bortolatto, C.F.; Wilhelm, E.A.; Roman, S.S.; Prigol, M.; Nogueira, C.W. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone protects against cisplatin-induced renal damage in mice. *J. Appl. Toxicol.* **2014**, *34*, 25–32. [[CrossRef](#)]
17. Holditch, S.J.; Brown, C.N.; Lombardi, A.M.; Nguyen, K.N.; Edelstein, C.L. Recent Advances in Models, Mechanisms, Biomarkers, and Interventions in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3011. [[CrossRef](#)]
18. Coats, A.; Jain, S. Protective effects of nebulivol from oxidative stress to prevent hypertension-related target organ damage. *J. Hum. Hypertens.* **2017**, *31*, 376–381. [[CrossRef](#)]
19. Furuichi, K.; Kaneko, S.; Wada, T. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* **2009**, *13*, 9–14. [[CrossRef](#)]
20. Mukhopadhyay, P.; Horváth, B.; Kechrid, M.; Tanchian, G.; Rajesh, M.; Naura, A.S.; Boulares, A.H.; Pacher, P. Poly (ADP-ribose)polymerase-1 is a key mediator of cisplatin-induced kidney inflammation and injury. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1774–1788. [[CrossRef](#)]
21. Malik, S.; Suchal, K.; Gamad, N.; Dinda, A.K.; Arya, D.S.; Bhatia, J. Telmisartan ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting MAPK mediated inflammation and apoptosis. *Eur. J. Pharm.* **2015**, *748*, 54–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tan, R.Z.; Wang, C.; Deng, C.; Zhong, X.; Yan, Y.; Luo, Y.; Lan, H.Y.; He, T.; Wang, L. Quercetin protects against cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting Mincle/Syk/NF- κ B signaling maintained macrophage inflammation. *Phytother. Res.* **2020**, *34*, 139–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhang, Y.; Chen, Y.; Li, B.; Ding, P.; Jin, D.; Hou, S.; Cai, X.; Sheng, X. The effect of monotropein on alleviating cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting oxidative damage, inflammation and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, 110–408. [[CrossRef](#)]
24. Simi, A.; Lerout, D.; Pinteaux, E.; Brough, D. Mechanisms of regulation for interleukin—1 β in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* **2007**, *52*, 1563–1569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Takács, L.; Kovacs, E.J.; Smith, M.R.; Young, H.A.; Durum, S.K. Detection of IL-1 alpha and IL-1 beta gene expression by in situ hybridization. Tissue localization of IL-1 mRNA in the normal C57BL/6 mouse. *J. Immunol.* **1988**, *141*, 3081–3095. [[PubMed](#)]
26. Kaneko, N.; Kurata, M.; Yamamoto, T.; Morikawa, S.; Masumoto, J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm. Regen.* **2019**, *39*, 12. [[CrossRef](#)]
27. Holick, M.F. Vitamin D: Extraskeletal health. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2010**, *39*, 381–400. [[CrossRef](#)]
28. Ramagopalan, S.V.; Heger, A.; Berlanga, A.J.; Maugeri, N.J.; Lincoln, M.R.; Burrell, A.; Handunnetthi, L.; Handel, A.E.; Disanto, G.; Orton, S.; et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and Evolution. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1352–1360. [[CrossRef](#)]
29. Almeida, L.F.; Franciscato, H.D.C.; Silva, C.G.; Silva, R.S.; Coimbra, T.M. Calcitriol effect on the disturbances in renal development induced by losartan exposure during lactation in rats. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11472. [[CrossRef](#)]

30. Reis, N.G.; Francescato, H.D.C.; de Almeida, L.F.; Silva, C.G.A.D.; Costa, R.S.; Coimbra, T.M. Protective effect of calcitriol on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7090. [[CrossRef](#)]
31. Klingberg, F.; Boris Hinz, B.; White, E.S. The myofibroblast matrix: Implications for tissue repair and fibrosis. *J. Pathol.* **2013**, *229*, 298–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Faubel, S.; Lewis, E.C.; Reznikov, L.; Ljubanovic, D.; Hoke, T.S.; Somerset, H.; Oh, D.J.; Lu, L.; Klein, C.L.; Dinarello, C.A.; et al. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 8–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Amirshahrokhi, K.; Khalili, A. Thalidomide Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Renal Inflammation in an Experimental Model. *Inflammation* **2015**, *38*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yang, S.; Han, Y.; He, J.; Yang, M.; Zhang, W.; Zhan, M.; Li, A.; Li, L.; Song, N.; Liu, Y.; et al. Mitochondria-targeted peptide SS-31 prevent on cisplatin-induced acute kidney injury via regulating mitochondrial ROS-NLRP3 pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *130*, 110521. [[CrossRef](#)]
35. Veiras, L.C.; Bernstein, E.A.; Cao, D.Y.; Okwan-Duodu, D.; Khan, Z.; Gibb, D.R.; Roach, A.; Skelton, R.M.; Bernstein, K.E.; Giani, J.F. Tubular IL-1 β Induces Salt Sensitivity in Diabetes by Activating Renal Macrophages. *Circ. Res.* **2022**, *131*, 59–73. [[CrossRef](#)]
36. Saxena, A.; Khosraviani, S.; Noel, S.; Mohan, D.; Donner, T.; Hamad, A.R. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* **2015**, *74*, 27–34. [[CrossRef](#)]
37. Akbari, O.; DeKruyff, R.H.; Umetsu, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 725–731. [[CrossRef](#)]
38. Moore, K.W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R.L.; O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 683–765. [[CrossRef](#)]
39. Kitching, A.R.; Tipping, P.G.; Timoshanko, J.R.; Holdsworth, S.R. Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **2000**, *57*, 518–525. [[CrossRef](#)]
40. Kitching, A.R.; Katerelos, M.; Mudge, S.J.; Tipping, P.G.; Power, D.A.; Holdsworth, S.R. Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* **2002**, *128*, 36–43. [[CrossRef](#)]
41. Yin, Z.; Bahtiyar, G.; Zhang, N.; Liu, L.; Zhu, P.; Robert, M.E.; McNiff, J.; Madaio, M.P.; Craft, J. IL-10 regulates murine lupus. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 2148–2155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Martina, M.N.; Noel, S.; Saxena, A.; Bandapalle, S.; Majithia, R.; Jie, C.; Arend, L.J.; Allaf, M.E.; Rabb, H.; Hamad, A.R. Double-negative T cells are early responders to AKI and are found in human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *7*, 1113–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wang, W.W.; Wang, Y.; Li, K.; Tadagavadi, R.; Friedrichs, W.E.; Budatha, M.; Reeves, W.B. IL-10 from dendritic cells but not from T regulatory cells protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0238816. [[CrossRef](#)]
44. Di Liberto, D.; Scazzone, C.; La Rocca, G.; Cipriani, P.; Lo Pizzo, M.; Ruscitti, P.; Agnello, L.; Ciaccio, M.; Dieli, F.; Giacomelli, R.; et al. Vitamin D increases the production of IL-10 by regulatory T cells in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2019**, *37*, 76–81.
45. Tan, X.; Li, Y.; Liu, Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 3382–3393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Azak, A.; Huddam, B.; Haberal, N.; Koçak, G.; Ortobozkoyun, L.; Şenes, M.; Akdoğan, M.F.; Denizli, N.; Duranay, M. Effect of novel vitamin D receptor activator paricalcitol on renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **2013**, *95*, 489–494. [[CrossRef](#)]
47. Ye, J.J.; Zhou, T.B.; Zhang, Y.F.; Wang, Q.; Su, Y.Y.; Tang, J.M.; Li, H.Y. Levels of vitamin D receptor and CYP24A1 in patients with end-stage renal disease. *Afr. Health Sci.* **2016**, *16*, 462–467. [[CrossRef](#)]
48. Nykjaer, A.; Fyfe, J.C.; Kozyraki, R.; Leheste, J.R.; Jacobsen, C.; Nielsen, M.S.; Verroust, P.J.; Aminoff, M.; de la Chapelle, A.; Moestrup, S.K.; et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13895–13900. [[CrossRef](#)]
49. Jean, G.; Souberbielle, J.C.; Chazot, C. Vitamin D in Chronic Kidney Disease and 339 Dialysis Patients. *Nutrients* **2017**, *9*, 328. [[CrossRef](#)]
50. Luchi, W.M.; Shimizu, M.H.M.; Canale, D.; Gois, P.H.F.; de Bragança, A.C.; Volpini, R.A.; Girardi, A.C.C.; Seguro, A.C. Vitamin D deficiency is a potential risk factor for contrast-induced nephropathy. *J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2017**, *309*, 215–222. [[CrossRef](#)]
51. Li, J.; Xu, S.; Zhu, J.B.; Song, J.; Luo, B.; Song, Y.P.; Zhang, Z.H.; Chen, Y.H.; Zhang, Z.Q.; Xie, D.D.; et al. Pretreatment with Cholecalciferol Alleviates Renal Cellular Stress Response during Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2019*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Noris, M.; Remuzzi, G. Translational mini-review series on complement factor H: Therapies of renal diseases associated with complement factor H abnormalities: Atypical haemolytic uraemic syndrome and membranoproliferative glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *151*, 199–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Togna, G.I.; Togna, A.R.; Franconi, M.; Caprino, L. Cisplatin triggers platelet activation. *Thromb. Res.* **2000**, *99*, 503–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Francescato, H.D.C.; Almeida, L.F.; Reis, N.G.; Faleiros, C.M.; Papoti, M.; Costa, R.S.; Coimbra, T.M. Previous exercise training protects against cisplatin 361 induced renal and endothelial lesions in rats. *Kidney Blood Press. Res.* **2018**, *43*, 582–593. [[CrossRef](#)]

55. Yoo, K.H.; Yim, H.E.; Bae, E.S.; Hong, Y.S. Capillary rarefaction and altered renal development: The imbalance between pro- and anti-angiogenic factors in response to angiotensin II inhibition in the developing rat kidney. *J. Mol. Histol.* **2018**, *49*, 219–228. [[CrossRef](#)]
56. Sun, D.; Wang, Y.; Liu, C.; Zhou, X.; Li, X.; Xiao, A. Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Life Sci.* **2012**, *90*, 900–909. [[CrossRef](#)]
57. Almeida, L.F.; Francescato, H.D.C.; Silva, R.S.; Silva, C.G.A.; Antunes-Rodrigues, J.; de Paula, F.J.A.; Coimbra, T.M. Renal developmental disturbances and their long-term consequences in female pups from vitamin D-deficient mothers: Involved mechanisms. *J. Develop. Orig. Health Dis.* **2019**, *10*, 497–501. [[CrossRef](#)]
58. Brodsky, S.V.; Yamamoto, T.; Tada, T.; Kim, B.; Chen, J.; Kajiya, F.; Goligorsky, M.S. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: Rescue by transplanted endothelial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2002**, *282*, 1140–1149. [[CrossRef](#)]
59. Chang, H.M.; Peng, K.Y.; Chan, C.K.; Sun, C.Y.; Chen, Y.Y.; Chang, H.M.; Huang, C.L.; Liu, P.C.; Chen, P.Y.; Wang, K.C.; et al. FGF23 ameliorates ischemia-reperfusion induced acute kidney injury via modulation of endothelial progenitor cells: Targeting SDF-1/CXCR4 signaling. *Cell Death Disease.* **2021**, *12*, 409. [[CrossRef](#)]
60. Deluque, A.L.; de Almeida, L.F.; Francescato, H.D.C.; da Silva, C.G.A.; Costa, R.S.; Antunes-Rodrigues, J.; Coimbra, T.M. Effect of Calcitriol on the Renal Microvasculature Differentiation Disturbances Induced by AT₁ Blockade During Nephrogenesis in Rats. *Front. Med.* **2020**, *7*, 23. [[CrossRef](#)]
61. Haugen, H.N. The determination of endogenous creatinine in plasma and urine. *Scan. J. Clin. Lab. Investig.* **1953**, *5*, 48–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]