



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

LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA RENAL



AMANDA LIMA DELUQUE

**Efeito do tratamento com paricalcitol (vitamina D ativa) na lesão renal
progressiva induzida por adriamicina em ratos**

Ribeirão Preto
2023

AMANDA LIMA DELUQUE

**Efeito do tratamento com paricalcitol (vitamina D ativa) na lesão renal
progressiva induzida por adriamicina em ratos**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. 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

Deluque, Amanda Lima

Efeito do tratamento com paricalcitol (vitamina D ativa) na lesão renal progressiva induzida por adriamicina em ratos. Ribeirão Preto, 2023.

152 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Machado, Terezila Coimbra.

1. Paricalcitol. 2. Diferenciação Celular. 3. Angiogênese. 4. Inflamação. 5. Fibrose.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

DELUQUE, Amanda Lima.

Efeito do tratamento com paricalcitol (vitamina D ativa) na lesão renal progressiva induzida por adriamicina em ratos.

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

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Sandra Lima, avó Dona Fia, e esposa, Karolyne Magalhães, com amor e gratidão por sua compreensão e apoio ao longo desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha mãe, Sandra Lima, a mulher mais forte que já passou pela minha vida. Obrigada pela paciência durante esses 28 anos de vida, em especial os últimos quatro que foram repletos de loucuras. Você é meu porto seguro, meu chão, meu céu. Obrigada por cada luta diária que passou para eu pudesse estar aqui para realizar mais essa etapa da minha formação acadêmica. Obrigada pelo amor incondicional, por acreditar nesse sonho junto comigo. Aproveito para agradecer à minha avó Dona Fia, que sempre me incentivou nessa jornada. À minha irmã, Alessandra Lima pelo suporte e incentivo, muitas vezes psicológicos para chegar a essa fase final.

À minha esposa, Karolyne Magalhães. Obrigada por me enxergar como a melhor fisiologista renal do mundo, por acreditar, as vezes mais do que eu mesma, nessa trajetória. Obrigada por compartilhar tanto conhecimento e amadurecimento comigo. Obrigada por ser a parceira mais incrível que eu poderia ter. Obrigada por ser meu lar. A fisiologia me trouxe você, o que a torna ainda mais fantástica. Agradeço também a minha sogra Regininha, que me permitiu fazer parte de sua família e que contribuiu imensamente para que esses sonhos fossem realizados.

Gratidão à minha orientadora Prof^a Dr^a Terezila Machado Coimbra, por todas as oportunidades, sabedoria e ensinamentos. Obrigada pela dedicação e empenho nessa jornada, mesmo nos momentos mais difíceis. Por todo incentivo e confiança dados para o meu crescimento acadêmico e científico. Por não abrir mão dos seus objetivos e independência. Admiro e respeito a mulher que és.

Ao laboratório de Fisiologia Renal e às minhas meninas Heloísa Francescato, Cleonice Giovanini, Beatriz Magalhães, Cláudia Souza e Ana Livia que sempre com muita paciência e acolhimento, tiveram disposição para auxiliar nos experimentos. Elas sabem de cada dificuldade para a realização deste trabalho. Obrigada por cada ombro e ouvido amigo de vocês. Aproveito para agradecer ao Lucas, colega e colaborador que mesmo de longe não deixa de apostar as fichas em nossos trabalhos. Obrigada por compartilhar tanto conhecimento.

Aos meus amigos de vida, em especial, Aline Zanatta, Flávia Resende, Ionara Lima, Keyser Mariano, Thaís Costa, João Vitor Gil, Dani Gil, Karoline Martins, Júlio

César Pascoaloti, Thaís Marques e minhas mochilinhas, Juliana Avelino e Gabriela Galdino. Obrigada por cada palavra amiga, carinho, vibração positiva, cerveja e bons drinks durante todos esses anos. Vocês, com toda certeza, fizeram esse caminho muito melhor.

Aos amigos e colegas que fiz no departamento durante esses seis anos e meio de USP, meu muito obrigada a vocês. Vocês fizeram esse período muito mais leve e divertido.

Aos mestres do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP que contribuíram com os ensinamentos e sabedoria. Sou grata a cada um de vocês em minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa e técnicos Guilherme de Paula Lemos e Flávio Henrique Leite, pelo suporte e processamento dos materiais histológicos.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Paula e a técnica Marta Nakao pelas análises de níveis de vitamina D no Hospital das Clínicas.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues e técnica Milene Mantovani, pelo auxílio com a dosagem de óxido nítrico.

Ao Prof. Dr. Guilherme Lucas e a técnica Sônia Zanon pelo suporte e disponibilidade com o fotodocumentador/revelador para membranas.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia, pelo todo o suporte dado durante esses anos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

Aos Departamentos de Fisiologia e Clínica Médica, pela oportunidade de trabalhar com pessoas tão comprometidas com a ciência e o conhecimento.

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

EPÍGRAFE

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”

(Friedrich Nietzsche, 2010)

RESUMO

DELUQUE, Amanda Lima. **Efeito do tratamento com paricalcitol (vitamina D ativa) na lesão renal progressiva induzida por adriamicina 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.

A lesão renal progressiva é caracterizada pela lesão das células endoteliais (CE) e epiteliais renais por processos denominados de transição endotelial-mesenquimal (EndoMT) e transição epitélio-mesenquimal (TEM), respectivamente, resultando em fibrose e inflamação tecidual. A nefropatia induzida por adriamicina (ADR) é um modelo experimental de lesão renal progressiva em roedores amplamente utilizado para o estudo de mecanismos relacionados à progressão da glomerulosclerose segmentar e focal (GESF), que ocorre em humanos. A ativação do receptor de vitamina D (VDR) pelo paricalcitol, um análogo da vitamina D (vit. D) ativa, desempenha um papel crucial para a redução da progressão da lesão renal, mediadas pela modulação da função endotelial e epitelial nos processos de fibrose e inflamação renal. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento prévio com paricalcitol na lesão renal induzida por adriamicina em ratos e explorar os mecanismos relacionados a angiogênese, fibrose e inflamação renal. Ratos Sprague-Dawley machos foram submetidos ao implante de minibomba osmótica contendo paricalcitol (Zemplar®, 6 ng/dia) ou salina (veículo; NaCl 0,9%). Dois dias após o implante, os ratos receberam injeção intravenosa (i.v.) de adriamicina (Fauldoxo®, 3,5 mg/kg) ou salina (veículo; NaCl 0,9%). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: **controle**: ratos que receberam o veículo pela minibomba osmótica e por i.v., n=6; **paricalcitol**: ratos que receberam paricalcitol pela minibomba osmótica e injeção i.v. de veículo, n=6; **ADR**: ratos que receberam o veículo pela minibomba osmótica e administração i.v. da adriamicina, n=7; **ADR + paricalcitol**: ratos que receberam paricalcitol pela minibomba osmótica e administração i.v. da adriamicina, n=7. A ativação do VDR em nosso estudo foi demonstrada pelo aumento da expressão proteica desse receptor bem como a maior disponibilidade de vit. D tecidual, avaliada pela CYP24A1 no tecido renal após o tratamento com paricalcitol. Os resultados mostraram que o paricalcitol atenuou a lesão renal induzida pela ADR, reduzindo as alterações de função e estrutura renal, tanto glomerular quanto tubular. Os efeitos benéficos da ativação do VDR nos animais tratados com ADR podem estar associados a manutenção da produção de óxido nítrico (NO), diminuição da expressão da angiopoietina-2 (Ang-2; fator antiangiogênico) e aumento da expressão do receptor tirosina quinase endotélio-específico (Tie-2) observadas nas CE glomerulares, corticais e medulares externas desses animais. A expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do seu receptor 2 (VEGFR2), fatores próangiogênicos, também estavam desregulados nos animais com lesão renal induzida por ADR, sugerindo um efeito modulador da angiogênese renal pelo paricalcitol via Ang-2/Tie-2 e VEGF/VEGFR2. A ativação do VDR foi capaz ainda de suprimir a expressão dos marcadores mesenquimais no tecido renal [desmina, alfa-actina de músculo liso (α -SMA), vimentina, colágeno I, fibronectina] e aumentar a expressão de podocina e *zonula occludens* (ZO-1) pela atenuação da proliferação celular associada ao antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e redução da ativação da via do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1)/Smad_{2/3}-dependente e independente; por redução da expressão do receptor para angiotensina II tipo 1 (AT₁) e de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK). O paricalcitol reduziu o processo inflamatório observado pela menor secreção de citocinas e de infiltrado de macrófagos pró-

inflamatórios e maior expressão de macrófagos reparadores, processos relacionados a maior inibição da translocação nuclear do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) e redução da via do fator 1 alfa derivado de células estromais (SDF-1 α) /receptor tipo 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) / β -Catenina. Diante disso, nossos resultados mostraram que o paricalcitol foi capaz de exercer papel renoprotetor pela modulação da angiogênese, redução da inflamação e fibrose, evidenciando novos e potenciais alvos para o tratamento da doença renal progressiva.

Palavras-chave: paricalcitol; diferenciação celular; angiogênese; inflamação; fibrose; doença renal progressiva.

ABSTRACT

DELUQUE, Amanda Lima. **Paricalcitol (activate vitamin D) treatment effects on adriamycin-induced progressive kidney injury in rats**. 2023. Thesis (Doctorate in Sciences, area of concentration: Physiology) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

Progressive kidney injury is characterized by damage to endothelial cells (EC) and renal epithelial cells by processes called endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) and epithelial-mesenchymal transition (EMT), respectively, resulting in fibrosis and tissue inflammation. Adriamycin-induced nephropathy (ADR) is an experimental rodent model of CKD widely used to study mechanisms related to the progression of focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) in humans. Activation of the vitamin D receptor (VDR) by paricalcitol, an analog of active vitamin D (vit. D), plays a crucial role in reducing the progression of renal injury, mediated by modulation of endothelial and epithelial function in the processes of fibrosis and renal inflammation. This study aimed to evaluate the effect of prior treatment with paricalcitol on ADR-induced kidney injury in rats and explore the mechanisms related to angiogenesis, fibrosis and renal inflammation. Male Sprague-Dawley rats were implanted with an osmotic minipump containing paricalcitol (Zemplar®, 6 ng/day) or saline (vehicle; 0.9% NaCl). Two days after implantation, the rats received an intravenous (i.v.) injection of adriamycin (Fauldoxo®, 3.5 mg/kg) or saline (vehicle; NaCl 0.9%). The animals were divided into 4 experimental groups: **control**: rats that received the vehicle via osmotic minipump and i.v., n=6; **paricalcitol**: rats that received paricalcitol via osmotic minipump and i.v. injection of vehicle, n=6; **ADR**: rats that received the vehicle via osmotic minipump and i.v. administration of adriamycin, n=7; **ADR + paricalcitol**: rats that received paricalcitol by osmotic minipump and i.v. administration of adriamycin, n=7. Activation of the VDR was demonstrated by increased protein expression of this receptor as well as increased availability of tissue vit. D, assessed by CYP24A1, in renal tissue after treatment with paricalcitol. The results showed that paricalcitol attenuated ADR-induced kidney damage, reducing alterations in renal function and structure, both glomerular and tubular. The beneficial effects of VDR activation in ADR-treated animals may be associated with the maintenance of nitric oxide (NO) production, decreased expression of angiopoietin-2 (Ang-2; anti-angiogenic factor), and increased expression of the endothelium-specific tyrosine kinase receptor (Tie-2) observed in the glomerular, cortical and outer medullary ECs of these animals. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor 2 for VEGF (VEGFR2), pro-angiogenic factors, were also downregulated in animals with ADR-induced CKD, suggesting a modulating effect of renal angiogenesis by paricalcitol via Ang-2/Tie-2 and VEGF/VEGFR2. VDR activation was also able to suppress the expression of mesenchymal markers in renal tissue [desmin, alpha-smooth muscle actin (α -SMA), vimentin, collagen I, fibronectin] and increase of podocin and zonula occludens (ZO-1) expressions by attenuating cell proliferation associated with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and reducing the activation of the transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)/Smad_{2/3}-dependent and independent pathway; by reducing the expression of the receptor for angiotensin II type 1 (AT₁) and mitogen-activated protein kinases (MAPK). Paricalcitol reduced the inflammatory process observed by lower secretion of cytokines and infiltration of pro-inflammatory macrophages and greater expression of repair macrophages, processes related to greater inhibition of nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and reduction of the stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 α)/chemokine C-X-C receptor type 4 (CXCR4)/ β -Catenin pathway. Therefore, the results showed that

paricalcitol was able to play a renoprotective role by modulating angiogenesis, reducing inflammation and fibrosis, and highlighting new and potential targets for the treatment of progressive kidney disease.

Keywords: paricalcitol; cell differentiation; angiogenesis; inflammation; fibrosis; progressive kidney disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Equilíbrio entre fatores pró- e antiangiogênicos	27
Figura 2 - Sinalização canônica de TGF- β /Smad	29
Figura 3 - Metabolismo da vitamina D	32
Figura 4 - Representação esquemática do delineamento experimental	42
Figura 5 - Análise da expressão de VDR e CYP24A1 no tecido renal	50
Figura 6 - Excreção urinária de albumina no 7 ^o , 15 ^o e 25 ^o dia após injeção de adriamicina/salina.....	51
Figura 7 - Análise histológica nas seções renais e volume glomerular	52
Figura 8 - Análise de JG12 no tecido renal	53
Figura 9 - Análise da função endotelial	55
Figura 10 - Análise de fatores pró- e antiangiogênicos no tecido renal	57
Figura 11 - Análise de desmina e podocina no tecido renal	58
Figura 12 - Análise de α -SMA no tecido renal	60
Figura 13 - Análise de vimentina no tecido renal.....	62
Figura 14 - Análise de colágeno I e fibronectina no tecido renal	64
Figura 15 - Análise da expressão de ZO-1 e PCNA no tecido renal.....	65
Figura 16 - Via canônica pró-fibrótica dependente de Smad.....	67
Figura 17 - Vias de ativação pró-fibrótica independente de Smad	69
Figura 18 - Análise de células positivas para CD68 (macrófagos) no tecido renal...	70
Figura 19 - Citocinas e perfil de macrófagos no tecido renal.....	72
Figura 20 - Análise de vias pró-inflamatórias no tecido renal	74
Figura 21 - Resumo gráfico dos possíveis mecanismos celulares da ativação do VDR na nefropatia induzida por ADR	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados na análise imunoistoquímica	45
Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados na análise por Western blot	46
Tabela 3 - Parâmetros fisiológicos ao final do experimento	49
Tabela 4 - Parâmetros de função renal ao final do experimento.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25 (OH ₂ D ₃)	1,25-dihidroxitamina D ₃ /Calcitriol
19-nor-1,25 (OH ₂ D ₂)	paricalcitol
25 (OHD)	25-hidroxitamina D/calcidiol
ADR	adriamicina ou Doxorrubicina
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
AKT	proteína quinase B (PKB)
Ang II	angiotensina II
Ang-1	angiopoietina-1
Ang-2	angiopoietina-2
ANOVA	análise de variância
AT ₁	receptor para angiotensina II tipo 1
BSA	soro de albumina bovina
CD31	grupo de diferenciação 31
CD68	grupo de diferenciação 68
CE	células endoteliais
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CLIA	método de quimiluminescência
Col I	colágeno tipo 1
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CXCR4	receptor tipo 4 de quimiocina C-X-C
CYP24A1	24-hidroxilase.
D ₂	ergocalciferol
D ₃	colecalfiferol
DAB	3,3-diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRC	doença renal crônica
ECL	quimiluminescência aprimorada
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
EndoMT	transição endotélio-mesenquimal
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPM	erro padrão da média

ERK _{1/2}	proteína quinase regulado por sinal extracelular _{1/2}
EROS	espécies reativas de oxigênio
EUA	excreção urinária de albumina
FE _{Na}	excreção fracional de sódio
FGF23	fator de crescimento de fibroblastos 23
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GESF	glomeruloesclerose segmentar e focal
GSK-3 β	glicogênio sintase quinase-3beta
HCl	ácido clorídrico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPTS	hiperparatireoidismo secundário
HUVECs	células endoteliais de veia umbilical humana
i.v.	injeção intravenosa
IL-10	interleucina 10
IL-1 β	interleucina 1 beta
I κ B α	inibidor de fator nuclear-kappa B alfa
I κ B β	inibidor de fator nuclear-kappa B beta
JG12	aminopeptidase P
JNK	c-Jun N-terminal quinase
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
MAPK	proteínas ativadas por mitógeno
MCP-1	proteína quimioatrativa para monócitos-1
MEC	matriz extracelular
NaCl	cloreto de sódio
NF- κ B	fator nuclear-kappa B
NO	óxido nítrico
PAGE	eletroforese de gel de poliacrilamida
PBS	tampão fosfato-salina (NaCl 0,15 M e tampão PO ₄ , pH=7,4)
P _{Ca}	concentração plasmática de cálcio
PCNA	antígeno nuclear de células em proliferação
P _{creat.}	creatinina plasmática
p-eNOS	fosfo-óxido nítrico sintase endotelial
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase

P _K	concentração plasmática de potássio
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
P _P	concentração plasmática de fósforo
p-p38	fosfo-p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno)
p-Smad _{2/3}	fosfo- <i>small mothers against decapentaplegic</i> _{2/3} (Smad _{2/3})
PTH	paratormônio
RXR	receptor retinóide X
SDF-1 α	fator 1 derivado de células estromais
SDS	dodecil sulfato de sódio
SRA	sistema renina-angiotensina
TBSt	tampão Tris-salina com tween [trizma base (0,05 M), NaCl (0,15 M), tween 20 (pH 7,6)]
TEM	transição epitélio-mesenquimal
TFG	taxa de filtração glomerular
TGF- β 1	fator de crescimento transformador beta 1
Tie-2/TEK	receptor tirosina quinase com domínios semelhantes à imunoglobulina e ao fator de crescimento epidermal-2 (específico da célula endotelial)
TM	tricrômio de Masson
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
T β RI/T β RII	receptor de TGF- β tipo I/ tipo II
U _{creat.}	creatinina urinária
USP	Universidade de São Paulo
UUO	obstrução ureteral unilateral
VDBP	proteína carreadora de vitamina D
VDR	receptor de vitamina D
VDRA	ativadores do receptor de vit. D
VDRE	elemento responsivo a vitamina D
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR2	receptor tipo 2 para fator de crescimento endotelial vascular
vit. D	vitamina D
ZEB	<i>zinc finger E-box-binding homeobox</i>
ZO-1	<i>zonula occludens</i>
ZONAB	ácido nucleico associado a ZO-1
α -SMA	α -actina de músculo liso

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
$\times g$	força centrífuga
°c	grau celsius
μg	microgramas
μM	micrômetro
μM	micromolar
dL	decilitro
h	horas
kDa	quilodalton
kg	quilograma
L	litro
M	molar
mA	miliampere
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	Milimolar
mm ²	milímetro quadrado
N	Normal
n	número amostral
ng	nanograma
nm	nanômetro
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
PO ₄	fosfato
rpm	rotação por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	<i>Doença renal crônica</i>	22
1.2	<i>Nefropatia induzida por adriamicina</i>	23
1.3	<i>Participação do endotélio na lesão renal progressiva</i>	25
1.4	<i>Processo fibrótico e inflamatório durante a lesão renal progressiva</i>	28
1.5	<i>Vitamina D ativa e seus mecanismos</i>	31
2	HIPÓTESE	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	39
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	<i>Animais e delineamento experimental</i>	41
4.2	<i>Coleta de amostras e avaliação da função renal</i>	42
4.3	<i>Quantificações séricas de 25 hidroxivitamina D (25 OHD), de paratormônio (PTH), e plasmáticas de cálcio (P_{Ca}) e fósforo (P_P)</i>	43
4.4	<i>Óxido nítrico (NO) na urina, plasma e tecido renal</i>	43
4.5	<i>Fator de crescimento transformador beta 1 ($TGF-\beta 1$), fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e interleucina-1 beta ($IL-1\beta$)</i>	44
4.6	<i>Análise histológica</i>	44
4.7	<i>Análise imunoistoquímica</i>	44
4.8	<i>Análise por western blot</i>	45
4.9	<i>Análise estatística</i>	47
5	RESULTADOS	49
5.1	<i>O tratamento com paricalcitol modulou a expressão de VDR e CYP24A1 na nefropatia induzida por ADR</i>	49
5.2	<i>O tratamento com paricalcitol reduziu as alterações de função renal induzidas por ADR</i>	50
5.3	<i>O tratamento com paricalcitol atenuou a lesão da estrutura renal induzida por ADR</i>	52
5.4	<i>O tratamento com paricalcitol atenuou as alterações da estrutura e função do endotélio renal induzidas por ADR</i>	53

5.5	<i>O tratamento com paricalcitol atenuou o desequilíbrio entre os fatores pró- e antiangiogênicos induzido por ADR</i>	56
5.6	<i>O tratamento com paricalcitol atenuou a expressão de marcadores mesenquimais e a deposição de MEC induzidas por ADR</i>	58
5.7	<i>O tratamento com paricalcitol atenuou as alterações nas expressões de ZO-1 e PCNA induzidas por ADR</i>	65
5.8	<i>O tratamento com paricalcitol modulou a via canônica TGF-β1-Smad dependente</i>	66
5.9	<i>O tratamento com paricalcitol também regulou as vias TGF-β1-Smad independentes</i>	68
5.10	<i>O tratamento com paricalcitol atenuou a infiltração de macrófagos induzida por ADR</i>	69
5.11	<i>O tratamento com paricalcitol regulou a secreção de citocinas pró-inflamatórias e induziu o fenótipo de macrófagos reparadores</i>	71
5.12	<i>O tratamento com paricalcitol atenuou vias pró-inflamatórias induzidas por ADR</i>	72
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A - Artigo publicado na revista Nutrients	106
	APÊNDICE B - Artigo publicado como coautora na revista International Journal of Molecular Science	125
	APÊNDICE C - Artigo publicado como coautora na revista Nutrition & Diabetes 139	
	ANEXO A - Comitê de ética 194/2017	151
	ANEXO B - Adendo do comitê de ética	152

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal crônica

A lesão renal progressiva ou Doença Renal Crônica (DRC) é um problema de saúde pública, com morbimortalidade elevada, sendo esta associada ao maior risco para doenças cardiovasculares (PAPAZOVA et al., 2015; TOMINO, 2014). A DRC é definida como alterações da estrutura ou de função renal presentes a mais de 3 meses, identificadas pela presença de albuminúria significativa e persistente, anormalidades dos sedimentos urinários, distúrbios de eletrólitos relacionados à lesão tubular, alterações histológicas e histórico de transplante renal, associados com a queda de taxa de filtração glomerular (TFG) (“CHRONIC KIDNEY DISEASE WORK GROUP, KDIGO 2012 CLINICAL PRACTICE GUIDELINE FOR THE EVALUATION AND MANAGEMENT OF CHRONIC KIDNEY DISEASE, 2012”, 2013), ou seja, é uma lesão progressiva e irreversível da função glomerular e tubular.

De 1990 a 2019, a DRC subiu da 19^a para a 11^a posição entre as principais causas de morte mundial, gerando números impressionantes de mais de 1,4 milhões de mortes em 2019 (FENG et al., 2023). Entre as causas são apontados envelhecimento e aumento dos fatores de risco da lesão renal, incluindo diabetes e hipertensão, que contribuem com mais da metade das mortes por DRC (KOMENDA et al., 2014; LIU et al., 2023). Nos últimos anos, 850 milhões de pessoas sofreram de alguma doença renal, avaliadas em todos os estágios (ECKARDT et al., 2023). Isso corresponde cerca de 1,5 vezes mais, do que pacientes que vivem com diabetes (537 milhões) (ROSSING et al., 2022), qualquer tipo de câncer (LIU et al., 2023), ou das pessoas que vivem com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)/vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WYATT, 2017).

As formas utilizadas para entender, diagnosticar, prevenir ou retardar os mecanismos envolvidos na progressão da lesão renal têm assumido grande importância e tem contribuído para o surgimento de novas terapias a fim de reduzir as consequências clínicas e socioeconômicas da lesão renal como um todo (CORTINOVIS; RUGGENENTI; REMUZZI, 2016; PAPAZOVA et al., 2015). Vários modelos experimentais de lesão renal progressiva têm sido utilizados para identificar possíveis biomarcadores e os mecanismos envolvidos na patogênese da DRC. O modelo experimental de nefropatia induzida por Doxorrubicina ou Adriamicina (ADR)

é um dos mais relevantes e reproduzíveis para o estudo desses mecanismos. A ADR é um antineoplásico utilizado para o tratamento de câncer como leucemia aguda, linfoma, mieloma e sarcoma. Seu mecanismo de ação é intercalar bases na fita de ácido desoxirribonucleico (DNA) fazendo complexos ADR-DNA e inibindo a enzima topoisomerase II, o que reflete na ativação de vias apoptóticas das células cancerígenas (MATT; HOFMANN, 2016; RENU et al., 2018) e estresse oxidativo mitocondrial (WALLACE; SARDÃO; OLIVEIRA, 2020). Este quimioterápico é metabolizado e estocado principalmente no fígado e rins devido às suas atividades de depuração (BOENO et al., 2023) e também no coração (GENG et al., 2021). Embora a ADR seja um potente antitumoral, seu uso é limitado devido a diversos efeitos citotóxicos (BOENO et al., 2023), principalmente por apresentar cardiotoxicidade (HE et al., 2020; WALLACE; SARDÃO; OLIVEIRA, 2020), hepatotoxicidade (PIPPA et al., 2020), e nefrotoxicidade (BOENO et al., 2023; FALEIROS et al., 2017; PIPPA et al., 2020).

1.2 Nefropatia induzida por adriamicina

Os mecanismos envolvidos na lesão renal induzida por ADR têm sido estudados desde a década de 1970 (BERTANI et al., 1982, 1986; BUCCIARELLI E, BINAZZI R, SANTORI P, 1976; STERNBERG, 1970). Esse modelo em roedores é semelhante à glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) que ocorre em humanos, apresentando características morfológicas de lesão de uma porção (segmentar) dos capilares glomerulares em uma minoria (focal) dos glomérulos (DE MIK et al., 2013; FOGO, 2015; JEFFERSON; SHANKLAND, 2014). A GESF é caracterizada por lesão de podócitos com perda dos processos podais, encurtamento da membrana basal glomerular, colabamento das alças capilares e adesão do tufo glomerular com a cápsula de Bowman (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014). Todas essas alterações resultam em disfunção renal, fibrose glomerular, albuminúria progressiva (SIMIC; TABATABAEIFAR; SCHAEFER, 2013), acompanhadas de inflamação túbulo-intersticial, provocada pelo maior aporte de proteínas que chegam aos túbulos para serem reabsorvidas (BRYANT et al., 2022).

Uma única injeção de ADR em ratos provoca aumento da creatinina sérica, queda da TFG, dislipidemia (hipercolesterolemia e aumento de triglicerídeos) (KAUR;

KRISHAN, 2020; QIAO et al., 2018; TAN et al., 2020; XU et al., 2016), albuminúria progressiva por lesão estrutural das alças capilares glomerulares (FENG et al., 2022; SUN et al., 2013), proliferação da matriz mesangial glomerular, espessamento da membrana basal, deposição de complexos imunes e infiltrado inflamatório (FENG et al., 2022). A lesão glomerular e a proteinúria, somadas ao efeito primário e direto da ADR nas células tubulares (LI et al., 2019), resultam em esclerose glomerular e fibrose túbulo-intersticial.

A proteinúria inicia uma semana após a administração de ADR e aumenta progressivamente (MIAO et al., 2018) devido à perda da seletividade do filtro glomerular relacionada ao peso molecular e à carga proteica (RUSSO et al., 2018). Essas alterações ocorrem com maior gravidade após 4 semanas, devido à lesão histopatológica observada nas estruturas da barreira de filtração glomerular (LEE; HARRIS, 2011). Anteriormente, a lesão renal causada pela ADR era atribuída somente às alterações dos podócitos, células epiteliais dos capilares glomerulares. Os podócitos são células terminalmente diferenciadas, que fazem parte da barreira de filtração glomerular, juntamente com a membrana basal glomerular e a camada de endotélio dos capilares glomerulares (HE et al., 2020). Estes são interligados por proteínas do diafragma da fenda que mantêm a integridade estrutural e funcional da barreira de filtração glomerular, como a nefrina, podocina, sinaptopodina, entre outras (MAEDA et al., 2018; WANG et al., 2016). Alterações associadas à perda das proteínas diafragmáticas têm sido demonstradas no modelo de nefropatia induzida por ADR em ratos, o que contribui para a perda de função glomerular (WANG et al., 2016).

A ADR desencadeia a ativação de mecanismos para geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), características do estresse oxidativo tecidual (GAO et al., 2014; WU et al., 2021), além de alta atividade pró-inflamatória em resposta a toxicidade desse quimioterápico (ZHOU et al., 2022). Esses efeitos evidenciam que agentes com atividade antioxidantes e anti-inflamatórias podem ter um papel importante para retardar a progressão da nefrotoxicidade (WU et al., 2021). Trabalhos demonstraram que a inflamação túbulo-intersticial decorrente da proteinúria excessiva no modelo de nefropatia induzida por ADR (SUN et al., 2013; ZOJA; ABBATE; REMUZZI, 2015) resulta em recrutamento de células imunes que secretam citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (WU et al.,

2021). Adicionalmente, a via de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) também participam da lesão tubular induzida por ADR para induzir a proliferação e diferenciação celular descontrolada em resposta a estímulos extracelulares e intracelulares (LI et al., 2019). Esses fatores corroboram para a formação e deposição de matriz extracelular (MEC), contribuindo para a fibrose tecidual.

Sun et al. (2013) observaram que as alterações das células endoteliais (CE) dos capilares glomerulares precedem as alterações dos podócitos em ratos nocautes para óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), enzima responsável pela produção de óxido nítrico (NO). Estudos posteriores mostraram que a diminuição na espessura da camada superficial endotelial glomerular desencadeia a albuminúria na lesão induzida por ADR em camundongos com ativação de vias fibróticas específicas em podócitos, evidenciando o *crosstalk* desses dois tipos celulares para a manutenção da estrutura renal (EBEFORS et al., 2019). Em concordância com esses achados, foi demonstrado que a alteração da função da CE resultou em lesão dos podócitos e esclerose glomerular, aumento da expressão de moléculas de adesão celular, ligação de leucócitos ao endotélio, congestão vascular, infiltração de células inflamatórias e fibrose túbulo-intersticial (FALEIROS et al., 2017; SUN et al., 2013).

1.3 Participação do endotélio na lesão renal progressiva

O endotélio renal tem diferentes estruturas e funções de acordo com o local em que está inserido. Temos endotélio dos grandes e médios vasos, que são contínuos e conectados por junções intercelulares. Nos glomérulos, o endotélio é fenestrado e coberto por uma camada luminal de glicocálix (proteínas que conferem a carga negativa a essa membrana), formando os capilares glomerulares. Nos capilares peritubulares, o endotélio também possui fenestrações, as quais são cobertas por glicosaminoglicanos, que facilitam juntamente com as células epiteliais, a reabsorção e secreção de fluidos e moléculas para células localizadas na região cortical e medular, principalmente externa, onde formam também os vasos retos (JOURDE-CHICHE et al., 2019; KIDA, 2020).

A manutenção da integridade das CE pode reduzir ou prevenir as lesões estruturais causadas em decorrência da injúria renal. A disfunção da microvasculatura glomerular e peritubular, podem refletir em alterações da TFG e fornecimento de

oxigênio para o túbulo e interstício renal. Sun et al. (2013) e Tan et al. (2020) observaram que a deficiência da expressão da eNOS causa esclerose glomerular e fibrose túbulo-intersticial, resultando em redução da perfusão vascular por perda de capilares glomerulares e peritubulares, classificando o endotélio como biomarcador para a gravidade da lesão renal (SUN et al., 2013; TAN et al., 2020).

Em rins saudáveis, a homeostase vascular renal se faz pelo equilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos. As angiopoietinas 1 e 2 (Ang-1 e Ang-2), uma família de fatores de crescimento vascular, desempenham papel significativo na manutenção da vasculatura renal. A ligação da Ang-1, produzida por constituintes do tecido muscular liso (pericitos) e podócitos, ao domínio extracelular de seu receptor tirosina quinase com domínios semelhantes à imunoglobulina e ao fator de crescimento epidermal-2 (Tie-2, específico da célula endotelial, também conhecido como TEK) resulta em dimerização do receptor, permitindo sua autofosforilação e assim ativando sua propriedade quinase, desencadeando atividades anti-inflamatórias [inibição de fator nuclear-*kappa* B (NF- κ B)] e pró-angiogênicas [fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Proteína quinase B (Akt)/eNOS] (GNUDI et al., 2015). A ausência de Ang-1 resulta em rarefação de capilares peritubulares (LOGANATHAN et al., 2018). A Ang-2 tem efeitos opostos, atuando de forma antagônica a Ang-1, inibindo a sinalização de Tie-2, o que desestabiliza as junções celulares, e a fosforilação de Tie-2 para a formação de novos vasos (GNUDI, 2016). Clinicamente, o aumento da Ang-2 plasmático está associado a maior excreção de albumina, menor TFG e aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com lesão renal progressiva em estágios avançados. Além disso, na DRC a lesão da microvasculatura glomerular e peritubular contribui para a maior secreção de Ang-2, maior albuminúria e dano endotelial, formando um ciclo de lesão para o tecido renal (CHANG et al., 2013).

As angiopoietinas juntamente com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estão relacionados com o crescimento renovascular, possuindo funções na diferenciação e sobrevivência endotelial (GNUDI et al., 2015). O VEGF é secretado principalmente por podócitos e células tubulares, possuindo ações autócrina e parácrinas para as células adjacentes, contribuindo para a manutenção da estrutura da fenda diafragmática da barreira de filtração glomerular e *crossstalk* com as células epiteliais (HARVEY; ENGEL; CHADE, 2016). A ligação entre o VEGF com seu

receptor de membrana da célula endotelial dos capilares glomerulares, denominado de receptor 2 para VEGF (VEGFR2), leva a dimerização e fosforilação da tirosina ativando vias de sinalização relacionadas a efeitos de reparo endotelial, ativação de eNOS e a disponibilidade de NO, proliferação, migração e diferenciação de CE, angiogênese e permeabilidade vascular (ABHINAND et al., 2016; EBEFORS et al., 2019; SIMONS; GORDON; CLAEISSON-WELSH, 2016; ZHANG et al., 2020) (Figura 2). Dessa forma, a secreção de VEGF por podócitos e a expressão de VEGFR2 por CE é um mecanismo celular importante a ser estudado, visando a manutenção da função glomerular, dos capilares glomerulares e peritubulares.

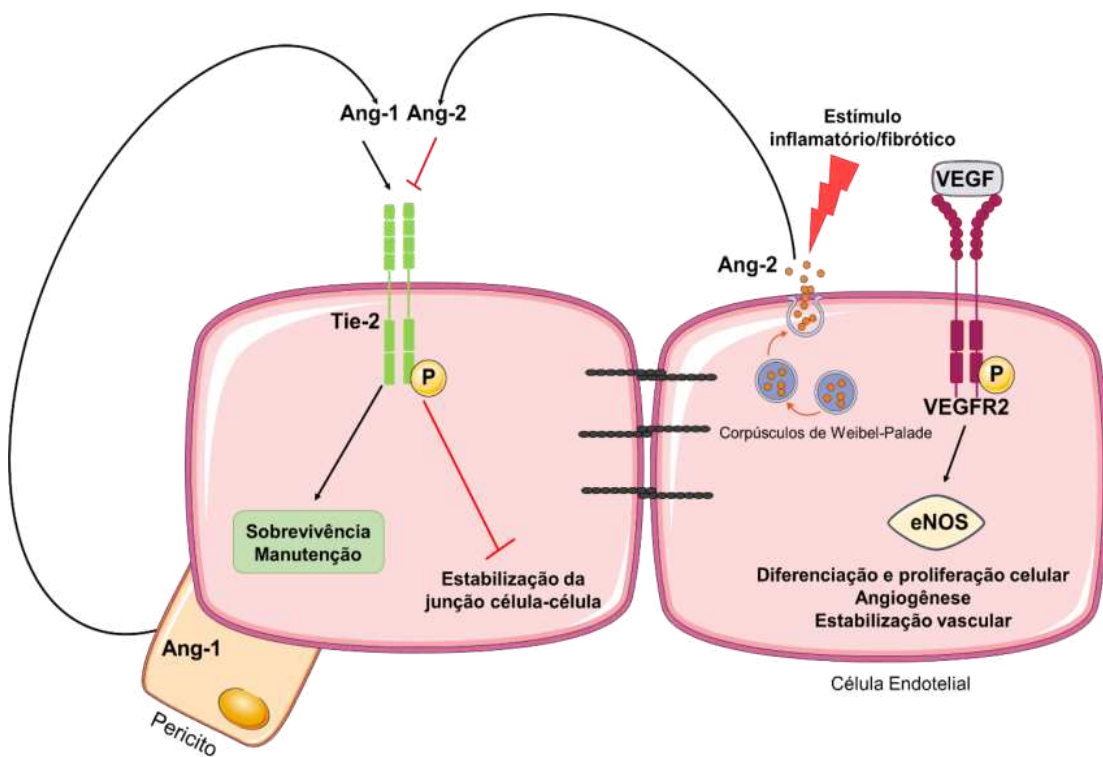


Figura 1 - Equilíbrio entre fatores pró- e antiangiogênicos. A Ang-1 é liberada pelos pericitos ancorados na célula endotelial do capilar peritubular. Esta se liga ao receptor Tie-2 da célula endotelial desencadeando ativação de manutenção e sobrevivência celular. A Ang-2, quando liberada pelos corpúsculos de Weibel-Palade, antagoniza a ligação da Ang-1, desestabilizando as junções celulares. O VEGF-VEGFR2 agem para a ativação de eNOS e produção de NO tecidual. Ang-1, angiopoietina-1. Ang-2, angiopoietina-2. Tie-2, receptor endotélio específico. VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. VEGFR2, receptor tipo 2 para fator de crescimento endotelial vascular. eNOS, óxido nítrico sintase endotelial. NO, óxido nítrico. Fonte: própria autoria. Baseado em AUGUSTIN et al., 2009; VAN MEURS et al., 2009.

No modelo de cardiotoxicidade induzida por ADR, a regulação negativa da fosforilação da eNOS contribuiu para a disfunção endotelial vascular (HE et al., 2020). A eNOS tem efeitos sob a fosforilação de VEGF e vice-versa. Uma vez com níveis

alterados, a eNOS ou VEGF perdem suas ações de proteção à podócitos, vasos e inibição de mecanismos fibróticos (FU et al., 2015). O VEGF se comporta de maneira diferente de acordo com o insulto. No modelo experimental de nefropatia diabética, há o aumento dos níveis de VEGF no início da lesão renal em resposta a hiperglicemia, causando angiogênese anormal, hipertrofia glomerular, espessamento da membrana basal e expansão mesangial (LIU et al., 2018b; ZHANG et al., 2020). Contudo, em modelos de lesão renal progressiva não-diabéticas, o VEGF exerce função protetora, melhorando a função renal e diminuindo a fibrose tecidual. No modelo de nefropatia induzido por ADR, o VEGF apresenta-se reduzido, o que reflete em rarefação capilar glomerular e cortical, e injúria renal em ratos (FALEIROS et al., 2017). Dessa forma, a inibição ou diminuição de VEGF é prejudicial aos podócitos, CE glomerulares e peritubulares, podendo ser um mecanismo importante para a progressão da glomeruloesclerose e fibrose túbulo-intersticial (BADRI et al., 2021).

1.4 Processo fibrótico e inflamatório durante a lesão renal progressiva

A progressão da lesão renal para estágios terminais está relacionada ao aparecimento e evolução da fibrose túbulo-intersticial, caracterizada pelo acúmulo de fibroblastos e sua ativação em miofibroblastos, provocando um aumento na deposição de MEC (MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Os fibroblastos podem se originar de fibroblastos residentes, recrutamento via diferenciação da medula óssea, transição epitélio-mesenquimal (TEM) e pericitos (LEBLEU et al., 2013; SUN et al., 2016). Além disso, as CE podem passar por processo de transição endotélio-mesenquimal (EndoMT), que pode contribuir para cerca de 10% da origem desses fibroblastos em resposta a mediadores pró-fibróticos (LEBLEU et al., 2013), ou seja, essas células diferenciadas perdem seus marcadores e adquirem fenótipo mesenquimal.

O TGF- β é considerado a principal citocina na patogênese da fibrose e inflamação na lesão renal (MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Essa citocina é constituída por três isoformas: TGF- β 1, 2 e 3, sendo a isoforma 1 reconhecida por ter atividade pró-fibrótica em doenças renais (SURESHBABU; MUHSIN; CHOI, 2016). O TGF- β 1 inicia sua sinalização a partir da interação com o receptor de TGF- β tipo II (T β RII) que recruta e ativa o receptor TGF- β tipo I (T β RI) e fosforila as “*small mothers against decapentaplegic*” (Smad₂ e Smad₃), proteínas que determinam a atividade

canônica dessa via. A fosforilação de Smad_{2/3} forma um complexo oligomérico com Smad₄, o qual se transloca para o núcleo (Figura 2).

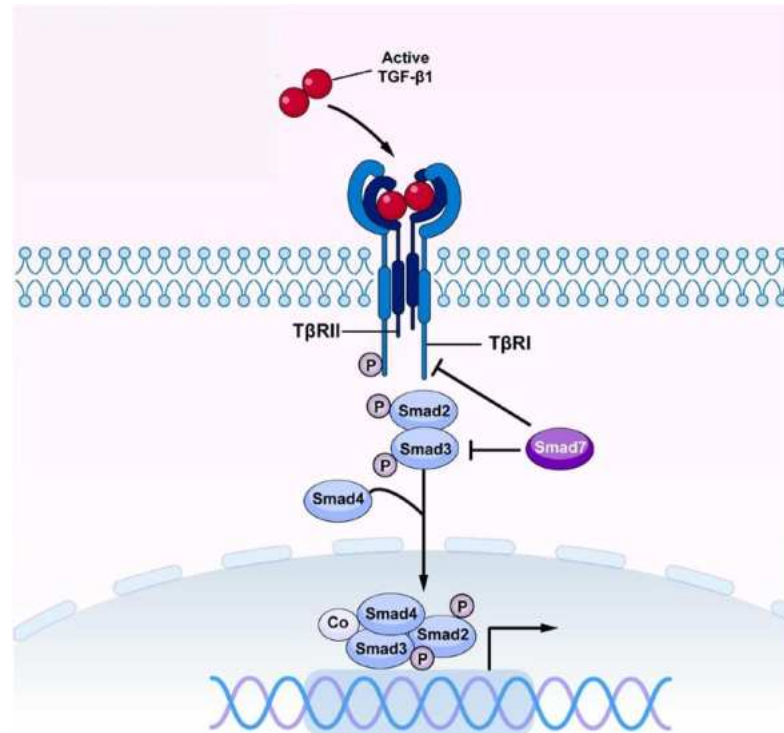


Figura 2 - Sinalização canônica de TGF- β /Smad. O TGF- β 1 interage com seu receptor T β RII e ativa o T β RI, assim como as Smads (Smad₂ e Smad₃) que recruta a Smad₄. Isso resulta na formação de um complexo com o Smad_{2/3/4}, que se transloca para o núcleo e se liga aos genes alvo para induzir fibrose e inflamação no tecido renal na lesão renal progressiva. TGF- β , fator de crescimento transformador β . T β RI, receptor TGF- β tipo I. T β RII, receptor TGF- β tipo II. Figura modificada de GU et al., 2020.

A ligação do complexo Smad_{2/3/4} ao DNA induz a transcrição de fatores relacionados a TEM como, o *zinc finger E-box-binding homeobox* (ZEB 1/2), que ao se ligar à região promotora de genes epiteliais, age como co-repressor, regulando negativamente o fenótipo epitelial [E-caderina, citoqueratina, *zonula occludens* (ZO-1), laminina-1, ocludina e claudina] e ganho de marcadores mesenquimais (N-caderina, vimentina e fibronectina) (HUA et al., 2020). Estudos demonstraram que o aumento de ZEB2 está associado com a maior permeabilidade de podócitos a albumina em condições de hipóxia crônica em ratos (NAKULURI et al., 2019), enquanto que o silenciamento de ZEB2-específico em células epiteliais tubulares de ratos tratadas com TGF- β 1, resulta em menor deposição de MEC e ativação de miofibroblastos (INOTANI et al., 2022), características do processo de transição epitelial/endotelial-mesenquimal. A intensa ativação de TGF- β 1/Smad_{2/3} gera ainda a

redução de Smad7, um regulador negativo da via canônica, que reduz a inflamação por induzir aumento do inibidor de fator nuclear-kappa B alfa (I κ B α), inibindo assim a via de sinalização pró-inflamatória do NF- κ B (MENG et al., 2015; MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Vias independentes de Smad também podem ser ativadas para mediar a fibrose renal, como a via MAPK mediadas por quinase regulada por sinal extracelular (ERK_{1/2}), p38 MAPK e c-Jun N-terminal quinase (JNK), caracterizando vias não-canônicas ativadas por TGF- β 1 (SURESHBABU; MUHSIN; CHOI, 2016). Angiotensina II (Ang II), produtos finais de glicação avançada, EROS e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) também são moléculas que podem interagir com a sinalização TGF- β 1/Smad para regular a fibrose e inflamação renal (GU et al., 2020).

A perda da diferenciação celular está diretamente ligada com a interação de citocinas, fatores inflamatórios, fatores de transcrição e vias celulares (HUA et al., 2020). Sendo assim, a inflamação do tecido renal contribui para a progressão do processo fibrótico e lesão renal, independentemente de sua etiologia (MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2014). Podócitos e células epiteliais danificadas levam a glomeruloesclerose e dano tubular, por desencadearem uma série de mecanismos que ativam os miofibroblastos no sítio da lesão para a geração de MEC (LIU et al., 2018a). A alta demanda de proteínas para o túbulo resulta em processo inflamatório com ativação de diversas vias, formando um ciclo vicioso de lesão (WONG et al., 2018). A resposta inflamatória à lesão de células epiteliais e endoteliais envolve a liberação de citocinas e quimiocinas pró-fibróticas e pró-inflamatórias, que permitem o infiltrado de células inflamatórias no glomérulo e interstício renal, composto majoritariamente de macrófagos e monócitos (JOURDE-CHICHE et al., 2019). Moléculas como EROS, TNF- α e IL-1 β são produzidas por macrófagos denominados de M1, o que mantém o perfil pró-inflamatório da lesão. Durante a fase de reparo, o fenótipo é convertido em M2, conferindo a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), contribuindo para a resolução da lesão tecidual (TANG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2019; YUAN; TANG; ZHANG, 2022).

A ativação do sistema renina angiotensina (SRA) pode também participar da sinalização que regula a inflamação na lesão renal progressiva por aumentar tanto a ativação de TGF- β 1/Smad_{2/3} quanto a de NF- κ B, que regula positivamente a expressão e atividade do receptor tipo 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) e ativação de

via pró-fibrótica Wnt/ β -Catenina, para que sinergicamente mantenham o ambiente inflamatório e fibrótico (GU et al., 2020; LIU et al., 2018a; MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016; WONG et al., 2018; YUAN; TANG; ZHANG, 2022). Juntos, esses mecanismos levam às alterações observadas na função e estrutura renal na lesão renal progressiva. Dessa forma, terapias que tenham como alvo a redução da fibrose e da inflamação renal podem ser úteis para retardar a progressão da lesão renal.

1.5 Vitamina D ativa e seus mecanismos

Algumas evidências mostram um efeito terapêutico da vitamina D (vit. D) na lesão renal progressiva (GEMBILLO et al., 2021; MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2021; SALANOVA VILLANUEVA et al., 2020). A vit. D é um hormônio formado por 4 anéis de colesterol e é a única “vitamina” que pode ser produzida endogenamente no corpo (LIU et al., 2016). A síntese se inicia a partir da exposição à luz ultravioleta provenientes do sol (entre 290 a 313 nm) ou através da alimentação. As duas formas da vit. D, o ergocalciferol (D₂) e o colecalciferol (D₃) são metabolizados de forma semelhante a partir de seus precursores: o ergosterol (plantas) e o 7-deidrocolesterol, que é sintetizado no fígado (animais) (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). Ambos são transportados no plasma pela proteína carreadora de vit. D (VDBP), uma globulina glicosilada que transporta esses metabólitos na circulação, para que no fígado sejam hidroxilados pela enzima 25-hidroxilase, dando origem a 25-hidroxivitamina D [25 (OHD); calcidiol]. De volta à corrente sanguínea, o complexo calcidiol-VDPB é endocitado por proteínas presentes na borda em escova da membrana apical das células tubulares proximais, denominadas de megalina e cubilina. Dentro da célula, a enzima mitocondrial 1 α -hidroxilase converte a 25 OHD em 1,25-dihidroxivitamina D₃ [1,25 (OH₂D₃); calcitriol], a forma ativa da vit. D. Os níveis de vit. D são finamente regulados via enzima CYP24A1 ou 24-hidroxilase, que cataboliza tanto a 25 OHD quanto a 1,25 (OH₂D₃), em 24R,25(OH)₂ D e 1,24,25(OH)₃ D, respectivamente. Os produtos finais dessa hidroxilação geram o ácido calcitróico inativo ou 26,23-lactona excretado na bile e na urina. Sendo assim, a CYP24A1 desempenha papel importante na modulação da atividade da vit. D local (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; BOUILLON; BIKLE, 2019; HAUSSLER et al., 2013; JEON; SHIN, 2018).

O calcitriol interage com seu receptor de vitamina D (VDR), expresso em quase todos os tecidos, com funções de metabolismo ósseo e extra-esqueléticas (BOUILLON; BIKLE, 2019). Este receptor apresenta localizações celulares diversas, podendo ser encontrado no núcleo, citosol e na membrana celular (ZHANG et al., 2023). Quando o calcitriol interage com o VDR citosólico, este complexo é fosforilado e se transloca para o núcleo para formar um heterodímero com o receptor retinóide X (RXR), capaz de interagir com elementos responsivos à vit. D (VDRE) que desencadearão a transcrição de genes alvo. Os receptores nucleares também formam heterodímero VDR-RXR-VDRE. A ativação de VDR também envolve efeitos não-genômicos, que são mais rápidos por estarem associados a membrana celular e não requerem ativação genômica. Estes são relacionados com as vias de fatores de crescimento e produção de segundos mensageiros (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; HAUSSLER et al., 2013; JEON; SHIN, 2018; LV et al., 2018) (Figura 3). Cerca de mais de 11.000 genes foram identificados como alvos da ativação do VDR, para o controle de mecanismos relacionados ao metabolismo (47%), diferenciação e desenvolvimento (10%), morfologia celular (19%), adesão e junção celular (10%), angiogênese (9%) e transição epitélio-mesenquimal (5%) (DING et al., 2013).

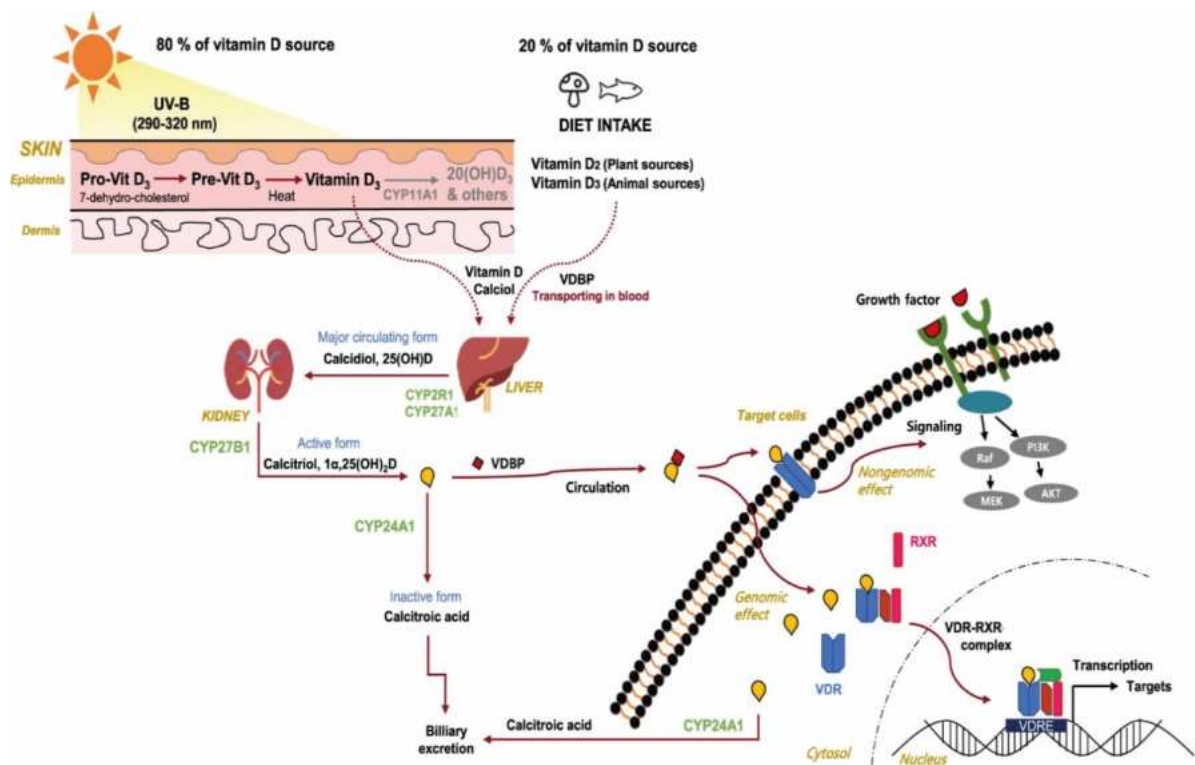


Figura 3 - Metabolismo da vitamina D. As vitaminas D₂ e D₃ se ligam à proteína carreadora VDBP. Esse complexo é entregue ao fígado, onde é metabolizado pela 25-hidroxilase (CYP2R1 e CYP27A1) em 25 OHD ou calcidiol. De novo na corrente sanguínea, a 25 OHD é metabolizada mais uma vez pela 1α-

hidroxilase (CYP27B1) no túbulo proximal do rim em 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol, a forma ativa de vit. D. O calcidiol e calcitriol são regulados pela 24-hidroxilase (CYP24A1), que produz ácido calcitróico excretado pela bile. Uma vez ativa, a vit. D interage com seu receptor VDR nuclear/citosólico para exercer efeitos genômicos, se ligando ao RXR, e aos VDREs que desencadearão a transcrição de genes alvo. Ações não-genômicas ocorrem pela interação de calcitriol com VDR localizados na membrana celular, e estão relacionadas com vias de fatores de crescimento, sinalização de cálcio e ativação de MAPK. D₂, ergosterol. D₃, colecalciferol. MAPK, proteínas quinases ativados por mitógeno. RXR, receptor retinóide X. VDBP, proteína carreadora de vit. D. VDR, receptor de vit. D. VDREs, elementos responsivos a vit. D. Figura modificada de JEON; SHIN, 2018.

A 25 OHD é utilizada como principal biomarcador dos níveis de vit. D no sangue, apresentando tempo de meia-vida de 2 a 3 semanas, refletindo a influência da dieta e da exposição ultravioleta, enquanto que a forma ativa (1,25 OH₂D₃), possui tempo de meia vida curto, de apenas 4 a 6 horas (GEMBILLO et al., 2021; HOLICK, 2009). Pacientes com lesão renal progressiva apresentam deficiência de vit. D em quase todos os estágios, o que influencia para o aparecimento de hiperparatireoidismo secundário (HPTS), hipocalcemia, hiperfosfatemia, aumento na secreção de fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) e acidose metabólica, complicações importantes da lesão renal progressiva (LIU et al., 2016). Portanto, o tratamento farmacológico deve ser focado em compostos que ativam o VDR com menores efeitos colaterais para o metabolismo ósseo-mineral. A ativação do VDR tem efeitos conhecidos por serem clássicos: para regulação de paratormônio (PTH) e metabolismo ósseo (HAUSSLER et al., 2013); e não clássicos como efeitos no sistema cardiovascular, renal, inibição do SRA, ações imunomoduladoras e anti-fibróticas (FERREIRA DE ALMEIDA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2022; SOUZA et al., 2023).

Ativadores do VDR (VDRA) têm sido utilizados para avaliar a participação dos efeitos da vit. D em vários modelos experimentais e clínicos de doenças renais (LV et al., 2018; MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2021). Análogos sintéticos dos VDRA são utilizados para diminuir os impactos do HPTS, com menor secreção de PTH, absorção intestinal de cálcio e fosfato, evitando a calcificação vascular por deposição desses íons (BOVER et al., 2015). O paricalcitol [19-nor-1,25 (OH₂D₂)], um dos análogos sintéticos do calcitriol, tem demonstrado efeitos positivos para o tratamento da disfunção cardíaca observada em ratos nefrectomizados, principalmente como agente anti-fibrótico (PANIZO et al., 2013, 2017). Seus efeitos ainda previnem a secreção do PTH e o HPTS na DRC (DEMIR; DEMIR; AYGUN, 2021; DYER, 2013) e, reduz a progressão da proteinúria quando associado ao bloqueador do SRA em pacientes com DRC não portadores de HPTS (MARTIN-ROMERO et al., 2022).

Corroborando com esses achados, Egido et al. (2016) e Salanova Villanueva et al. (2020) demonstraram efeitos anticalcificantes e imunomodulatórios do paricalcitol pela inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (EGIDO et al., 2016; SALANOVA VILLANUEVA et al., 2020), e pró-fibróticas como o TGF- β , o que conseqüentemente, diminuiu a perda de células e a TEM pela ativação direta de VDR (MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2021).

A ativação do VDR atenua também a EndoMT pela regulação da sinalização da Ang II através do receptor de AngII tipo I (AT₁) (WYLIE-SEARS; LEVINE; BISCHOFF, 2014), melhorando o relaxamento aórtico em modelo de lesão renal progressiva induzida por nefrectomia 5/6 em ratos (WU-WONG; LI; CHEN, 2015). Martínez-Miguel et al. (2014) observaram que CE tratadas com vit. D aumentam significativamente a produção de NO pela bioatividade da eNOS (MARTÍNEZ-MIGUEL et al., 2014). Adicionalmente, estudos demonstraram que a suplementação de vit. D está associada um aumento da expressão de eNOS e VEGF na obstrução ureteral unilateral (UUO) (ARFIAN et al., 2018), melhora do quadro inflamatório e redução do estresse oxidativo na lesão renal aguda induzida por cisplatina (OLIVEIRA et al., 2022), além de apresentar efeitos protetores na estrutura medular externa e interna na doença renal progressiva gerada pela inibição do receptor AT₁ durante o desenvolvimento renal (DELUQUE et al., 2020). Atestando os efeitos benéficos da vit. D demonstrados acima, estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a deficiência desse hormônio durante o desenvolvimento renal gerou rarefação dos capilares glomerulares e peritubulares devido ao desequilíbrio de fatores pró e antiangiogênicos (FERREIRA DE ALMEIDA et al., 2019) e durante a vida adulta acarreta em piora da função e estrutura renal quando somado ao diabetes (SOUZA et al., 2023).

Assim, a regulação negativa de mecanismos associados a fibrose e inflamação renal são alvos para o desenvolvimento de terapias para lesão renal progressiva. Tomados em conjunto, esses dados demonstraram que a vit. D é imprescindível para a manutenção e funcionamento correto das CE e epiteliais em diversos modelos de doença renal. Na lesão renal progressiva ocorre a lesão das células renais, o que gera prejuízo na ativação de vit. D, e mesmo assim, a forma inativa ainda é a mais comumente utilizada nesses pacientes (LIU et al., 2016). Contudo, os efeitos diretos da ativação do VDR previamente e permanente, antes da lesão renal estar

estabelecida ainda não estão completamente elucidados e precisam ser melhor explorados. Esses estudos podem contribuir para o entendimento de mecanismos relacionados à prevenção da progressão da lesão renal. O modelo da lesão renal induzida pela ADR é bastante utilizado para o estudo da lesão renal progressiva ou DRC. A lesão das CE dos capilares glomerulares é a primeira etapa de uma série de eventos que irão resultar em alterações da função e da estrutura renal, inflamação e fibrose nesse modelo. Entretanto, ainda não está totalmente claro como a ativação direta do VDR pode prevenir tais alterações e quais os mecanismos estariam envolvidos nesse efeito protetor, visando principalmente a toxicidade endotelial, já que é um evento inicial na lesão renal induzida por ADR. Sabe-se que o paricalcitol tem propriedades de manutenção das CE, porém o efeito do tratamento iniciado antes do estabelecimento da lesão ainda não está claro.

Hipótese

2 HIPÓTESE

O nosso estudo objetiva testar a hipótese de que o tratamento prévio com paricalcitol pode atenuar ou prevenir as alterações renais induzidas pela ADR, visando retornar o equilíbrio de fatores pró- e antiangiogênicos, assim como, ressaltar sua atividade anti-inflamatória e anti-fibróticas nos processos de desdiferenciação endotelial e epitelial.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito do tratamento com paricalcitol iniciado antes da administração de ADR nas alterações de função e estrutura renal e avaliar a participação das CE dos capilares glomerulares e peritubulares e células epiteliais nesse modelo.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do tratamento com paricalcitol na progressão da lesão renal induzida por ADR em ratos sobre:

- Parâmetros fisiológicos de peso corporal, peso relativo renal, dos níveis de 25 hidroxivitamina D, paratormônio, cálcio, fósforo e potássio plasmáticos.
- Função renal: volume urinário de 24h, TFG, creatinina plasmática, fração de excreção de sódio e albuminúria.
- Estrutura renal: marcação para Tricrômio de Masson e volume glomerular.
- Estrutura e função das CE dos glomérulos, córtex e medula externa renais por imunoistoquímica para JG12 e metabolismo de NO (expressão de p-eNOS, eNOS e Arginase II).
- Expressão dos fatores angiogênicos (Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF e VEGFR2).
- Expressão de marcador específico de podócito: podocina.
- Expressão de fenótipo mesenquimal nos glomérulos, córtex e medula externa renais por imunoistoquímica para desmina, α -SMA e vimentina e expressão de componentes de MEC: colágeno I e fibronectina.
- Expressão de proteínas relacionadas a proliferação celular: ZO-1 e PCNA.
- Via canônica de TGF- β 1/Smad_{2/3} e fator de transcrição ZEB2; e via não canônica: expressão de AT₁ e ativação de MAPK (p38, JNK e ERK_{1/2}).
- Infiltração de células inflamatórias: expressão de CD68; secreção de citocinas: TNF- α , IL-1 β ; diferenciação de macrófagos: expressão de Arginase I.
- Vias relacionadas à inflamação: NF- κ B, I κ B α , I κ B β , SDF-1 α , CXCR4, β -Catenina.
- Expressão de VDR e conteúdo renal de vit. D: CYP24A1.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

O protocolo experimental utilizado está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo 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. 194/2017 (Anexo A e B). Ratos *Sprague-Dawley* machos, pesando entre 180–200g, provenientes do Biotério Central da FMRP-USP, foram selecionados aleatoriamente para este estudo. Os animais foram alojados em um ambiente com temperatura controlada (22°C) e expostos ao ciclo de 12h claro/escuro, no Biotério do Laboratório de Fisiologia Renal. Os animais receberam dieta e água *ad libitum*, e foram mantidos em número máximo de quatro por caixa.

Após o período de adaptação de uma semana, o paricalcitol (6 ng/dia, Zemplar®, Abbvie Laboratories, IL, EUA) ou veículo [solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%] foram administrados por meio de uma minibomba osmótica (Modelo 2004, Alzet, CA, EUA) implantada cirurgicamente no dorso do animal sob anestesia inalatória com Isoflurano (Cristália, SP, Brasil). Essa metodologia permite que o paricalcitol seja liberado de hora em hora, mantendo sempre a dose terapêutica desejada. A dose foi selecionada baseada na padronização realizada anteriormente em artigo do nosso laboratório utilizando vit. D (DELUQUE et al., 2020). O tratamento com paricalcitol foi iniciado dois dias antes da administração de adriamicina e continuou durante os 27 dias de observação. Esse tempo de protocolo foi permitido pela abordagem do modelo de minibomba osmótica, como indicado pelo fabricante. Quarenta e oito horas após o implante, os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de ADR (cloridrato de Doxorubicina/Fauldoxo®, Libbs, SP, Brasil = 3,5 mg/kg) ou veículo (solução de NaCl a 0,9%) através da veia caudal (FALEIROS et al., 2017) (Figura 4).

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- **controle:** ratos que receberam apenas o veículo (solução de NaCl a 0,9%) pela minibomba osmótica e i.v., n=6;
- **paricalcitol:** ratos que receberam paricalcitol (6 ng/dia) pela minibomba osmótica e injeção i.v. de veículo (solução de NaCl a 0,9%), n=6;

- **ADR:** ratos que receberam o veículo (solução de NaCl a 0,9%) pela minibomba osmótica e administração i.v. da adriamicina (3,5 mg/kg), n=7;
- **ADR + paricalcitol:** ratos que receberam paricalcitol (6 ng/dia) pela minibomba osmótica e administração i.v. da adriamicina (3,5 mg/kg), n=7.

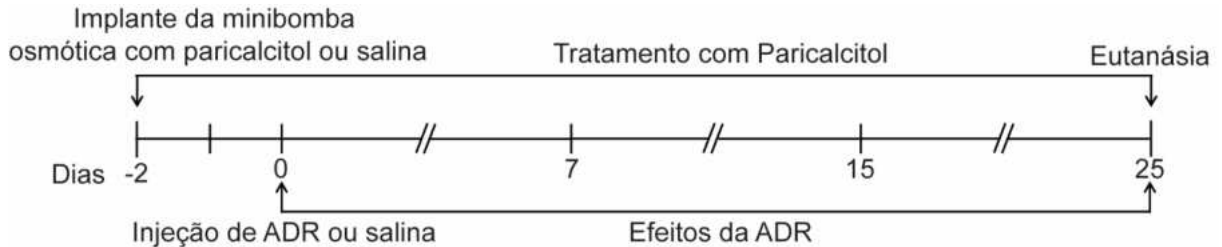


Figura 4 - Representação esquemática do delineamento experimental. Ratos *Sprague-Dawley* machos foram submetidos à cirurgia de implante de minibomba osmótica contendo paricalcitol dois dias antes (Dia -2) da injeção de ADR (Dia 0) e continuada por mais 25 dias.

4.2 Coleta de amostras e avaliação da função renal

Os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas para coleta de amostras de urina de 24h nos 7º, 15º e 25º dias após a injeção i.v. de adriamicina. As amostras foram armazenadas a -20 °C até o seu uso para determinar a excreção urinária de albumina (EUA) usando método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com anticorpo anti-albumina de rato (Bethyl Laboratories, Lab Research, TX, EUA) e creatinina urinária ($U_{creat.}$) usando um kit comercial (Labtest Diagnostica, MG, Brasil). Além disso, a urina de 24h coletada no 25º dia após a injeção de ADR foi usada para mensurar o volume urinário, sódio urinário (analisador de eletrólitos 9180, Roche, Wien, Áustria) e níveis de NO. No 26º dia, os ratos foram pesados e em seguida anestesiados com cetamina/xilazina (0,1 ml/100 g, Cristália, SP, Brasil) e eutanasiados.

As amostras de sangue (plasma e soro) foram coletadas diretamente da artéria abdominal e armazenadas a -70 °C. O plasma foi usado para analisar a creatinina plasmática ($P_{creat.}$, Labtest Diagnostica, MG, Brasil), sódio (analisador de eletrólitos 9180, Roche, Wien, Áustria) (tendo a fração desse íon calculada), NO, cálcio (P_{Ca}), fósforo (P_P) e potássio (P_K ; analisador de eletrólitos 9180, Roche, Wien, Áustria). O soro foi utilizado para dosagem dos níveis de 25 OHD e PTH. A taxa de filtração glomerular (TFG) foi determinada pelo *clearance* de creatinina.

As amostras de urina também foram coletadas diretamente da bexiga urinária no momento da eutanásia, tratadas com fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM (PMSF; Sigma Chemical Company, MS, EUA) e armazenadas a -70 °C para a análise dos níveis de TGF- β 1 por ELISA. Os rins foram removidos de cada animal. Parte do rim esquerdo foi fixado com solução de methacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) que após 24h foi substituído por álcool 70%, e usada para análises histológicas e imunoistoquímicas. O restante do tecido foi armazenado a -70 °C para análises de ELISA e Western blot.

4.3 Quantificações séricas de 25 hidroxivitamina D (25 OHD), de paratormônio (PTH), e plasmáticas de cálcio (P_{Ca}) e fósforo (P_P)

A 25 OHD sérica foi determinada utilizando teste competitivo direto baseado no princípio de quimiluminescência (CLIA) (DiaSorin, Liaison®, Saluggia, Itália). Essa análise foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que participa da certificação de qualidade nacional e internacional. Os níveis séricos de PTH foram determinados usando o método de ELISA com o anticorpo anti-PTH intacto de rato (Quidel Corporation, CA, EUA) e os níveis plasmáticos de cálcio e fósforo foram mensurados usando kits comerciais por método colorimétrico utilizando espectrofotômetro em 570 nm e 650 nm, respectivamente (Labtest Diagnostica, MG, Brasil).

4.4 Óxido nítrico (NO) na urina, plasma e tecido renal

Amostras de urina coletadas no 25º dia de experimento, de plasma e tecido renal foram misturadas/homogeneizadas com ácido acético 0,1 N (3/1), centrifugadas a 10000× g por 5 min e aliquotadas. Apenas os tecidos renais foram desproteinizados com etanol 95% (1/2) e centrifugados (4000× g por 5 min) novamente. Os sobrenadantes de urina, plasma e tecido renal foram submetidos a uma análise do teor de NO usando a técnica NO/ozônio descrita anteriormente com um analisador Sievers (Sievers 280 NOA, CO, EUA) (DELUQUE et al., 2020). O método de Bradford foi usado para determinar os níveis de proteína total no tecido renal (DELUQUE et al., 2020). Os valores médios de NO foram expressos em μ M/ μ g de proteína no tecido renal e μ g/mg de creatinina plasmática ou urinária.

4.5 Fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β)

Amostras de urina da bexiga foram usadas para quantificar o TGF- β 1 por ELISA (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mg de creatinina.

O método de ELISA foi ainda utilizado para a análise das concentrações de TGF- β 1 (Promega Corporation, WI, EUA), TNF- α e IL-1 β (R&D Systems Inc., MN, EUA) em homogenato de tecido renal. Para isso, amostras de tecido renal foram homogeneizadas em tampão de lise (50 mM Tris ácido clorídrico (HCl), pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; coquetel de inibidores de protease (100X) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,001 M, pH 8 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) e centrifugados a 4°C a 10.000 rpm por 20 minutos. O método de Bradford foi usado para determinar os níveis de proteína no tecido renal (DELUQUE et al., 2020). Os resultados foram corrigidos e expressos em pg/mg de proteína tecidual.

4.6 Análise histológica

Os tecidos renais foram incluídos em parafina, cortados em fragmentos de 4 μ m de espessura, corados com Tricrômio de Masson (TM), corante de fibras colágenas, e visualizados usando microscópio de luz (AxioVision Rel. 4.3; Zeiss, BW, Alemanha). Foram obtidas fotos de 30 campos consecutivos de 0,1 mm² do córtex e 20 campos consecutivos de 0,1 mm² do compartimento medular externo. As imagens foram fotografadas e quantificadas em alta ampliação (400 \times). A expressão de TM túbulo-intersticial cortical e medular (área azul, fibras de colágeno) foi quantificada usando o software NIH Image J 1.52A (Bethesda, MD, EUA). O mesmo programa foi usado também para a quantificação da área glomerular, pela delimitação do tufo glomerular. Os valores médios por rim foram calculados e os resultados expressos como porcentagem de área positiva para TM no córtex e na medula externa.

4.7 Análise imunoistoquímica

Os cortes renais foram desparafinizados e hidratados para análise imunoistoquímica. A ligação do antígeno inespecífico foi bloqueada por incubação por 20 min com soro de cabra e bloqueio de peroxidase endógena. Para maior exposição

dos epítomos, as lâminas passaram por micro-ondas submersas em tampão citrato pH 6,0 ou EDTA pH 8,5. As seções foram então incubadas com os anticorpos primários descritos na Tabela 1. Após o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas com tampão (PBS, NaCl 0,15 M e tampão PO₄, pH 7,4) e incubadas com os respectivos anticorpos secundários por 30 min. Os complexos avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, CA, EUA) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Company, MO, EUA) foram usados para a detecção dos antígenos. Os cortes foram contracorados com *metilgreen*, desidratados e montados.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados na análise imunoistoquímica.

Anticorpo	Origem	Referência	Tipo	Diluição tempo de incubação	Marcação
JG12	eBioScience	BMS1104	Rato	1/500 60 minutos	CE
Desmina	Dako Corporation	M0760	Rato	1/50 <i>Overnight</i> à 4 ^o	Lesão de podócitos
α-SMA	Dako Corporation	M0851	Rato	1/50 <i>Overnight</i> à 4 ^o	Células mesenquimais
Vimentina	Dako Corporation	M0725	Rato	1/50 <i>Overnight</i> à 4 ^o	Células mesenquimais
Col I	Chemicon	AB755	Coelho	1/1200 <i>Overnight</i> à 4 ^o	Deposição de MEC
CD68	Bio-Rad Laboratories Inc.	MCA341R	Rato	1/100 <i>Overnight</i> à 4 ^o	Macrófagos

CD68, grupo de diferenciação 68. CE, células endoteliais. Col I, colágeno tipo 1. JG12. Aminopeptidase P. α-SMA, alfa-actina de músculo liso.

As imagens foram obtidas e quantificadas em alta ampliação (400×). Trinta campos consecutivos de 0,1 mm² do córtex e 20 campos consecutivos de 0,1 mm² do compartimento medular externo foram avaliados para o JG12, α-SMA, vimentina, Col I, CD68. Trinta glomérulos corticais e 20 justamedulares foram avaliados para JG12, desmina, α-SMA, Col I e CD68. As alterações glomerulares, túbulo-intersticiais corticais e medulares foram quantificadas usando o software NIH Image J (Bethesda, MD, EUA) e os valores médios por rim foram calculados. Os resultados foram expressos como porcentagem de marcação positiva no glomérulo, córtex e medula externa para os marcadores mencionados acima.

4.8 Análise por western blot

Os tecidos renais foram homogeneizados em um tampão de lise (50 mM TrisHCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; coquetel de inibidores de protease

(100X) e EDTA 0,001 M, pH 8 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) e centrifugados a 4°C a 10.000 rpm por 20 minutos. As proteínas (30, 60 ou 90 µg) foram aquecidas a 100°C na presença de tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol, e então, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12%), transferidas para membranas de nitrocelulose *overnight* a 4°C em 10mA, incubadas por 1h em tampão de bloqueio (TBS, 5% leite desnatado) ou 3% soro de albumina bovina (BSA) e lavadas em tampão (TBS, 0,1% Tween 20, pH 7,6). Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados na análise por Western blot.

Anticorpo	Origem	Referência	Tipo	Diluição
Ang-1	Bioss Antibodies Inc	bs-0800R	Coelho	1/500
Ang-2	Santa Cruz Biotechnology	sc-74402	Rato	1/100
Arginase I	Santa Cruz Biotechnology	sc-18351	Cabra	1/1000
Arginase II	Santa Cruz Biotechnology	sc-18357	Cabra	1/1000
AT₁	Santa Cruz Biotechnology	sc-515884	Rato	1/200
CD68	Bio-Rad Laboratories Inc.	MCA341R	Rato	1/2000
CXCR4	LifeSpan BioSciences Inc.	LS-B6709	Coelho	1/500
CYP24A1	Abnova	H0000159-M02	Rato	1/500
eNOS	Santa Cruz Biotechnology	sc-376751	Rato	1/200
Fibronectina	Chemicon International	1942	Coelho	1/1000
GAPDH	Cell Signaling Technology	cod. 2118L	Coelho	1/1000
IkBα	Santa Cruz Biotechnology	sc-371	Coelho	1/1000
IkBβ	Santa Cruz Biotechnology	sc-945	Coelho	1/1000
NF-κB	Santa Cruz Biotechnology	sc-7151	Coelho	1/200
PCNA	Sigma Chemical Company	P8825	Rato	1/500
p-eNOS	Santa Cruz Biotechnology	sc-12972	Cabra	1/200
p-ERK_{1/2}	Santa Cruz Biotechnology	sc-7383	Rato	1/500
Podocina	Santa Cruz Biotechnology	sc-21009	Coelho	1/500
p-JNK	Santa Cruz Biotechnology	sc-6254	Rato	1/500
p-p38	Sigma Chemical Company	M8177	Rato	1/500
p-Smad_{2/3}	Cell Signaling Technology	8828S	Coelho	1/500
SDF-1α	eBioscience	14-7992-83	Coelho	1/500
Smad_{2/3}	Santa Cruz Biotechnology	sc-133098	Rato	1/300
Tie-2	Santa Cruz Biotechnology	sc-293414	Rato	1/200
VDR	Santa Cruz Biotechnology	sc-13133	Rato	1/500
VEGF	Santa Cruz Biotechnology	sc-53462	Rato	1/300
VEGFR2	Cell Signaling Technology	cod. 2472S	Coelho	1/500
Vimentina	Dako Corporation	M0725	Rato	1/1000
ZEB2	Santa Cruz Biotechnology	sc-48789	Coelho	1/250
ZO-1	Zymed	61-7300	Coelho	1/250
α-SMA	Dako Corporation	M0851	Rato	1/300
β-Catenina	Santa Cruz Biotechnology	sc-7199	Coelho	1/2000

Ang-1, Angiopietina 1. Ang-2, Angiopietina 2. AT₁, receptor angiotensina II tipo-1. CD68, grupo de diferenciação 68. CXCR4, receptor tipo 4 de quimiocina C-X-C. CYP24A1, 24-hidroxilase. eNOS, óxido nítrico sintase endotelial. GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. IkBα, inibidor alfa de fator nuclear kappa B. IkBβ, inibidor beta de fator nuclear kappa B. NF-κB, fator nuclear-kappa B. PCNA, antígeno nuclear de célula em proliferação. p-eNOS, fosfo-óxido nítrico sintase endotelial. p-ERK_{1/2}, fosfo - quinase regulada por sinal extracelular_{1/2}. p-JNK, fosfo- c-Jun N-terminal quinase. p-p38, fosfo-p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). p-Smad_{2/3}, fosfo-*small mothers against*

*decapentaplegic*_{2/3}. SDF-1 α , fator 1 alfa derivado de célula estromal. Smad_{2/3}, *small mothers against decapentaplegic*_{2/3}. Tie-2, receptor tirosina quinase específico do endotélio. VDR, receptor de vitamina D. VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. VEGFR2, receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular. ZEB2, *zinc finger E-box-binding homeobox 2*. ZO-1, *zonula occludens*. α -SMA, alfa-actina de músculo liso.

Após incubação *overnight* a 4°C com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas e incubadas com anti-IgG de camundongo (P0447, 1/5000; Dako Corporation, CPH, Dinamarca), anti-IgG de coelho [(P0448, 1/2000, 1/5000 ou 1/10000; Dako Corporation, CPH, Dinamarca) ou sc-2357 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA)] ou anti-cabra (sc-2768, 1/5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) conjugados com peroxidase por 1h em temperatura ambiente. O GAPDH foi usado como proteína de referência. Um sistema de imagem (Kodak Gel Logic 2200, TX, EUA) foi utilizado para visualizar os anticorpos ligados à membrana usando reagentes de quimiluminescência aprimorada (ECL) (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A intensidade da banda foi quantificada por densitometria usando o software de imagem ImageJ NIH 1.52A (<http://www.nih.gov>) e foi relatada como a porcentagem da razão entre a proteína de interesse e a proteína de referência em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. A quantificação de proteínas foi realizada usando o método de Bradford (DELUQUE et al., 2020).

4.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade da distribuição *Kolmogorov-Smirnov*. A análise de variância (ANOVA) *One-way* seguida pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls foi usada para analisar dados normalmente distribuídos. Os dados de TGF- β 1 urinários foram transformados em log para obter uma distribuição normal. Esses dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi usado para analisar dados não distribuídos normalmente e expressos em mediana e percentis (25-75%). As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prisma versão 9.0 para Windows (GraphPad Software, EUA). Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

5 RESULTADOS

O grupo ADR + paricalcitol apresentaram peso corporal significativamente diminuído aos 27 dias de experimento em relação ao grupo paricalcitol ($p < 0,05$) (Tabela 3). O peso absoluto do rim esquerdo não apresentou diferenças entre os grupos avaliados ($p > 0,05$) (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças nos níveis de 25 OHD, PTH, P_{Ca} , P_P e P_K entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros fisiológicos ao final do experimento nos grupos controle, paricalcitol, ADR e ADR + paricalcitol. Dados de peso corporal, peso relativo do rim esquerdo, 25-hidroxivitamina D, paratormônio, concentração plasmática de cálcio, fósforo e potássio.

	controle	paricalcitol	ADR	ADR + paricalcitol
Peso Corporal (g)	437 (359-456)	440 (409-463)	384 (351-403)	363 (337-376) #
Peso relativo rim (g)	1,60 ± 0,092	1,80 ± 0,038	1,70 ± 0,082	1,54 ± 0,041
25 OHD (ng/mL)	29 ± 3,28	34 ± 1,96	28 ± 2,19	31 ± 1,39
PTH (pg/mg)	177 ± 22,40	180 ± 36,40	288 ± 29,50	270 ± 35,70
P_{Ca} (mg/dL)	9,1 ± 0,27	9,4 ± 0,50	9,1 ± 0,33	9,5 ± 0,24
P_P (mg/dL)	7,0 ± 0,46	6,7 ± 0,33	7,1 ± 0,23	7,6 ± 0,20
P_K (mmEq/L)	3,1 (2,55-3,30)	2,9 (2,80-2,95)	2,9 (2,80-3,10)	2,9 (2,50-2,90)

Dados são expressos como média ± EPM e mediana e percentis (25-75%). $n = 5-7$ para cada grupo. # $p < 0,05$ vs. paricalcitol. 25OHD, 25-hidroxivitamina D; PTH, paratormônio; P_{Ca} , concentração plasmática de cálcio; P_P , concentração plasmática de fósforo; P_K , concentração plasmática de potássio.

5.1 O tratamento com paricalcitol modulou a expressão de VDR e CYP24A1 na nefropatia induzida por ADR

Nós investigamos o tratamento com paricalcitol poderia modular diretamente a expressão de VDR e a quantidade intrarrenal de vit. D avaliada pela expressão de CYP24A1. Para as duas proteínas citadas, foi observado uma redução de suas expressões nos animais do grupo ADR em comparação com os grupos controle e paricalcitol ($p < 0,05$). Essas alterações nas expressões de VDR e CYP24A1 foram significativamente menores no grupo ADR + paricalcitol em comparação com o grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 5a e b).

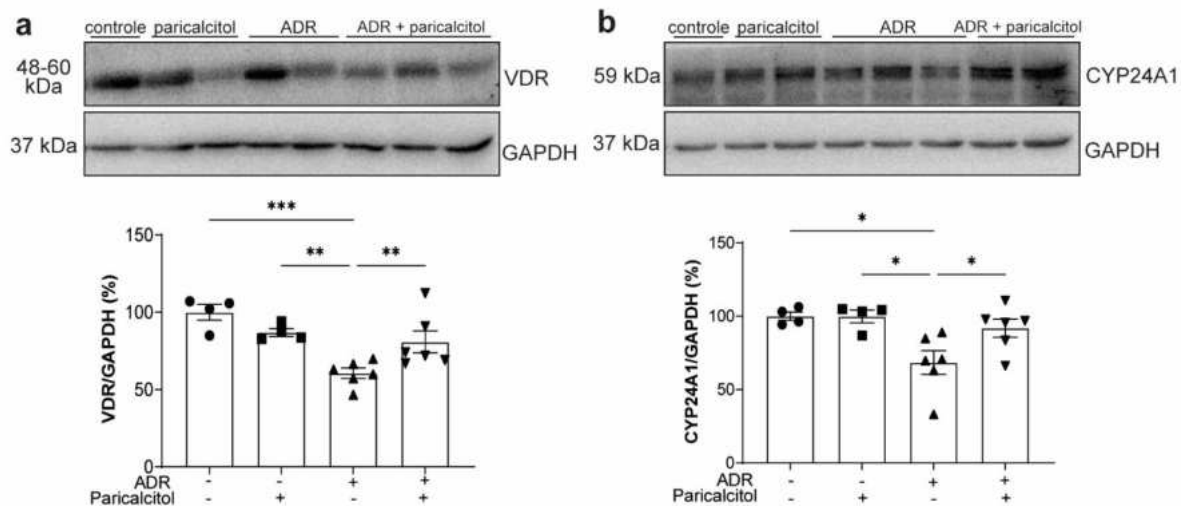


Figura 5 - Análise da expressão de VDR e CYP24A1 no tecido renal. Análise densitométricas entre (a). VDR. (b). CYP24A1 e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). $n = 4-6$ para cada grupo. Para (a-b). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2 O tratamento com paricalcitol reduziu as alterações de função renal induzidas por ADR

Não foram observadas diferenças no volume urinário no 27^o dia de protocolo experimental ($p > 0,05$) (Tabela 4). Os animais do grupo ADR apresentaram redução significativa da TFG e aumento da P_{creat} e FE_{Na} em comparação com o grupo paricalcitol ($p < 0,05$). Essas alterações foram menos intensas no grupo ADR + paricalcitol em relação ao grupo ADR ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros de função renal ao final do experimento nos grupos controle, paricalcitol, ADR e ADR + paricalcitol. Dados de volume urinário de 24h, taxa de filtração glomerular, creatinina plasmática e fração de excreção de sódio.

	controle	paricalcitol	ADR	ADR + paricalcitol
Volume urinário (mL 100 g ⁻¹ 24h ⁻¹)	5,1 \pm 1,57	10,4 \pm 2,24	8,3 \pm 1,26	9,5 \pm 1,03
TFG (mL min ⁻¹ 100 g ⁻¹)	0,3 \pm 0,04	0,4 \pm 0,03	0,2 \pm 0,02 #	0,4 \pm 0,01 \$
P_{creat} (mg/dL)	0,45 (0,38-0,48)	0,40 (0,39-0,46)	0,54 (0,53-0,58) ##	0,44 (0,40-0,49) \$
FE_{Na} (%)	0,29 (0,24-0,35)	0,23 (0,18-0,29)	0,32 (0,30-0,34) #	0,24 (0,21-0,28) \$

Dados são expressos como média \pm EPM e mediana e percentis (25-75%). $n = 5-7$ para cada grupo. # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ vs. paricalcitol; \$ $p < 0,05$ vs. ADR. TFG, taxa de filtração glomerular; P_{creat} , creatinina plasmática; FE_{Na} , fração de excreção de sódio.

A excreção urinária de albumina (EUA) aumentou significativamente no 7º dia após a injeção de adriamicina em ratos do grupo ADR em comparação com os grupos controle ($p < 0,05$) e paricalcitol ($p < 0,01$) (Figura 6a). Nos 15º e 25º dias após a injeção, esse parâmetro foi significativamente maior nos grupos ADR e ADR + paricalcitol quando comparados aos grupos controle e paricalcitol ($p < 0,001$) (Figura 6b e 6c). O grupo ADR + paricalcitol apresentou atenuação dessa alteração no 25º dia em relação ao grupo ADR ($p < 0,001$) (Figura 6c).

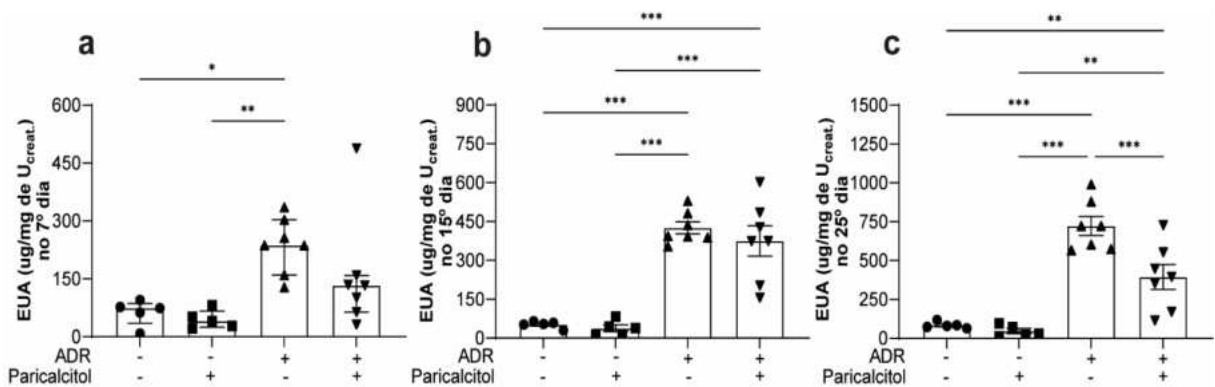


Figura 6 - Excreção urinária de albumina (EUA) no (a). 7º dia. (b). 15º dia e (c). 25º dia após injeção de adriamicina/salina. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). $n = 5-7$ para cada grupo. Para (a). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*, expresso em mediana e percentis (25-75%). Para (b-c). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. U_{creat} . Creatinina Urinária.

5.3 O tratamento com paricalcitol atenuou a lesão da estrutura renal induzida por ADR

A análise histológica nos cortes corados com Tricrômio de Masson (TM) mostrou a presença de fibrose túbulo-intersticial tanto no córtex quanto na medula externa dos animais do grupo ADR em comparação aos grupos controle ($p < 0,01$ apenas para fibrose no compartimento medular externo) e paricalcitol ($p < 0,01$) (Figura 7a-c). O grupo ADR + paricalcitol teve atenuação da fibrose nos dois compartimentos avaliados em comparação ao grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 7a-c). Não foram encontradas diferenças das áreas glomerulares entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Figura 7d).

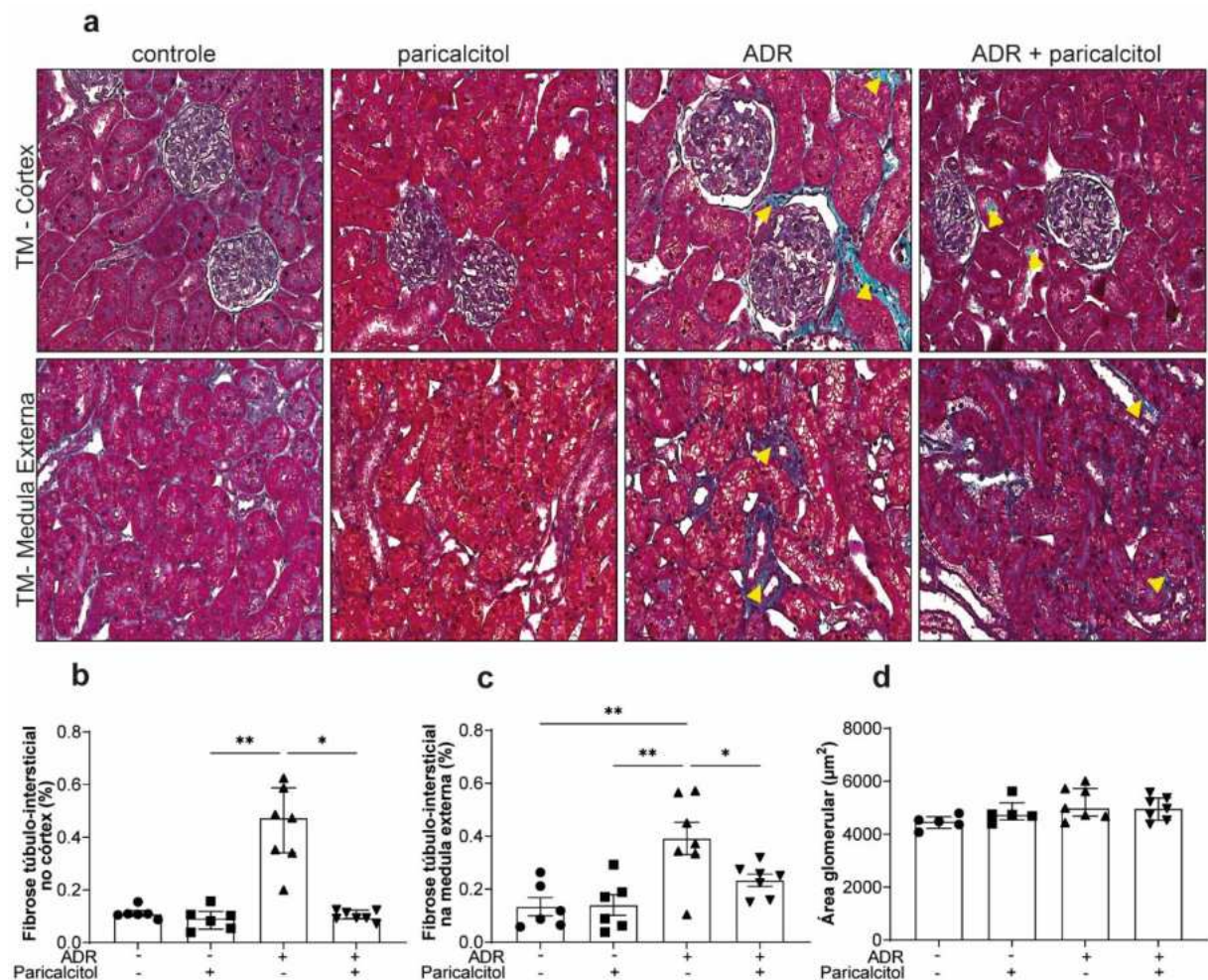


Figura 7 - Análise histológica nas seções renais e volume glomerular. Cortes corados com Tricrômio de Masson (TM). (a). A sequência de imagens superiores representa o TM no córtex e a sequência de imagens inferiores representa o TM no compartimento medular externo. As cabeças de setas amarelas indicam a expressão positiva de TM em compartimentos túbulo-intersticiais no tecido renal. Porcentagem de fibrose túbulo-intersticial (b), no córtex e (c), no compartimento medular externo. (d). Área glomerular em μm^2 . Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo) aos 27 dias de tratamento com paricalcitol. Barra

de escala = 20 μm , $n = 6-7$ para cada grupo. Para (b). e (d). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*, expresso em mediana e percentis (25-75%). Para (c). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.4 O tratamento com paricalcitol atenuou as alterações da estrutura e função do endotélio renal induzidas por ADR

A expressão de JG12, um marcador para CE, foi reduzida no glomérulo e nos compartimentos túbulo-intersticiais do córtex e medula externa no grupo ADR em comparação com os grupos controles ($p < 0,05$). Nos animais que receberam o tratamento prévio com paricalcitol, essas alterações foram menores em relação ao grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 8a-d).

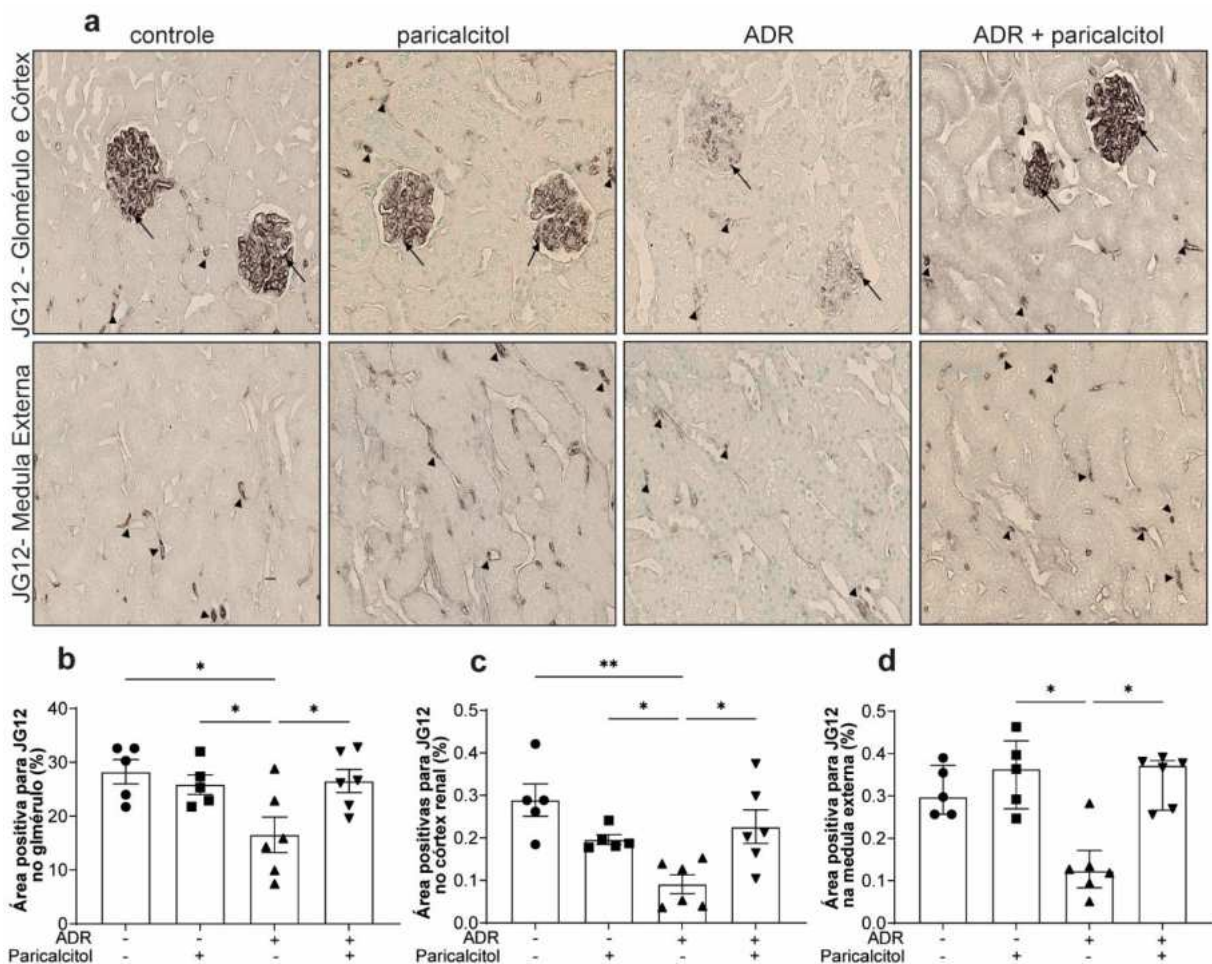


Figura 8 - Análise de JG12 no tecido renal. (a). Imunolocalização de JG12 nos compartimentos renais. As setas indicam a expressão positiva de JG12 no glomérulo. As cabeças de setas indicam a expressão positiva de JG12 nos compartimentos túbulo-intersticiais. Porcentagem de células JG12-positivas (b). no glomérulo. (c). no córtex e (d). na medula externa. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo) aos 27 dias de tratamento com paricalcitol. Barra de escala = 20 μm , $n = 5-6$ para cada grupo. Para (b-c). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. Para (d). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*, expresso em mediana e percentis (25-75%). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para avaliar a função endotelial, foi investigado as vias relacionadas ao NO. Não foram encontradas alterações dos níveis plasmáticos de NO entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 9a). Os níveis urinários de NO estavam aumentados no grupo ADR + paricalcitol em comparação com os grupos paricalcitol ($p < 0,01$) e ADR ($p < 0,001$) (Figura 9b). No tecido renal, os animais do grupo ADR apresentaram redução dos níveis de NO quando comparados aos grupos controle e paricalcitol ($p < 0,01$). O paricalcitol, por sua vez, preveniu a diminuição dos níveis de NO tecidual no grupo ADR + paricalcitol quando comparado com o grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 9c). A análise densitométrica de p-eNOS (Figura 9d) e eNOS (Figura 9e) mostraram expressão diminuída no grupo ADR em comparação com os grupos controle ($p < 0,05$) e paricalcitol ($p < 0,05$). O paricalcitol preveniu a redução apenas de p-eNOS no grupo ADR + paricalcitol em comparação com o grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 9d).

Visto que o paricalcitol atenuou a redução da produção de NO tecidual, nós investigamos a arginase II, a fim de analisar a interação da via eNOS/VDR. A arginase II apresentou aumento de sua expressão no grupo ADR em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). O paricalcitol atenuou esse aumento no grupo ADR + paricalcitol quando comparado ao grupo ADR ($p < 0,01$) (Figura 9f).

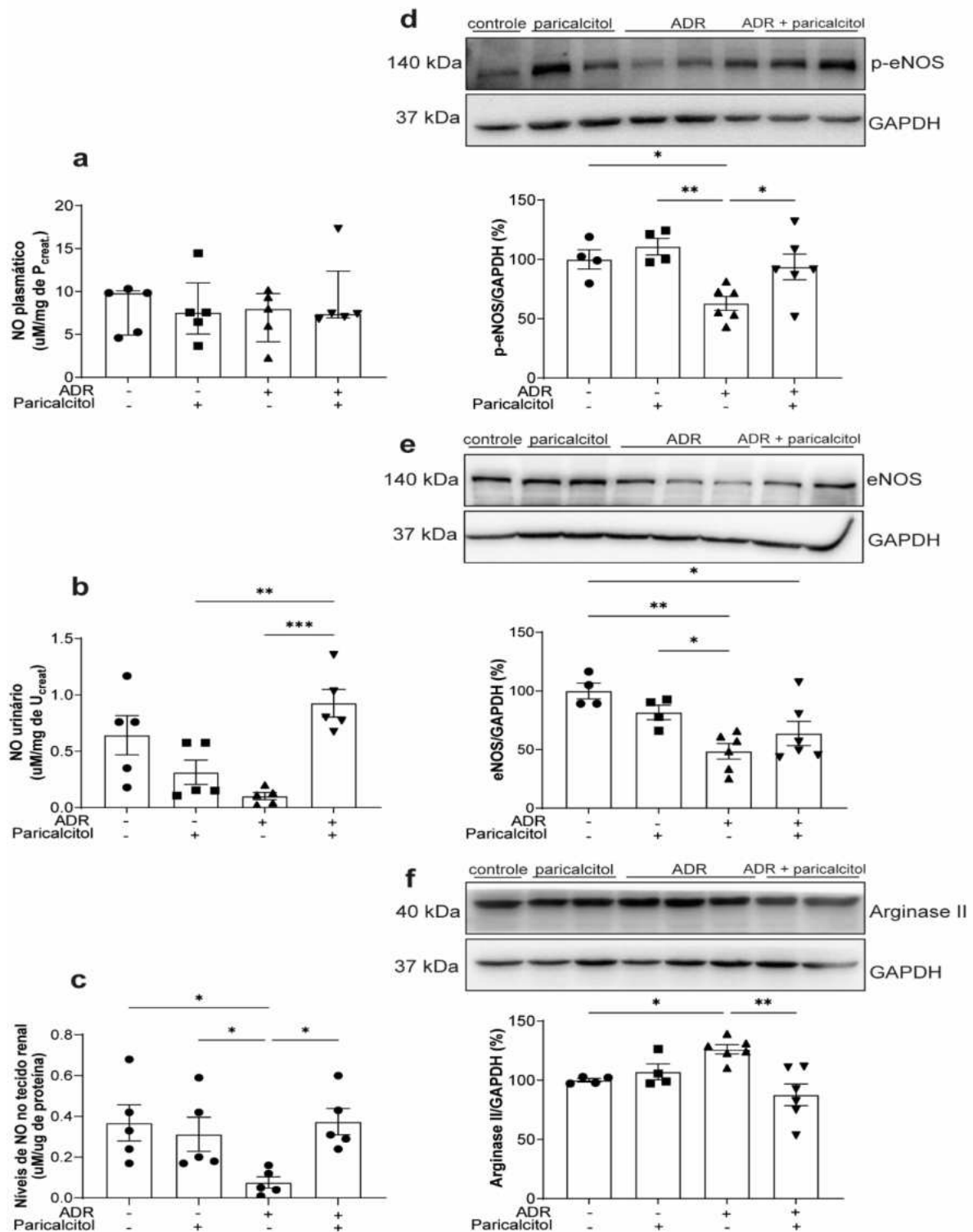


Figura 9 - Análise da função endotelial. Níveis de NO (a). plasmático. (b). urinário. (c). tecidual renal. Análise densitométricas entre (d). p-eNOS. (e). eNOS. (f). Arginase II e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). $n = 4-6$ para cada grupo. Para (a). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*, expresso em mediana e percentis (25-75%). Para (b-f). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. P_{creat.} Creatinina plasmática; U_{creat.} Creatinina urinária.

5.5 O tratamento com paricalcitol atenuou o desequilíbrio entre os fatores pró- e antiangiogênicos induzido por ADR

Não foram observadas diferenças na expressão de Ang-1 ($p > 0,05$) (Figura 10a). No grupo ADR, a Ang-2 mostrou uma tendência a aumentar ($p > 0,05$), e o paricalcitol foi capaz de atenuar esse aumento no grupo ADR + paricalcitol ($p < 0,05$) (Figura 10b). A expressão de Tie-2 foi reduzida no grupo ADR em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) e o tratamento prévio com paricalcitol atenuou essa redução, apresentando aumento significativo desse parâmetro em comparação ao grupo ADR ($p < 0,01$) (Figura 10c).

O VEGF e seu receptor endotelial específico, VEGFR2, tiveram suas expressões diminuídas no grupo paricalcitol em comparação com o controle ($p < 0,05$). O grupo ADR também apresentou redução significativa dessa expressão em relação aos grupos controle ($p < 0,001$) e paricalcitol ($p < 0,05$). O grupo ADR + paricalcitol apresentou redução dessas duas proteínas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O tratamento com o paricalcitol, ainda preveniu a redução do VEGF e VEGFR2 no grupo ADR + paricalcitol em comparação com o grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 10d e 10e).

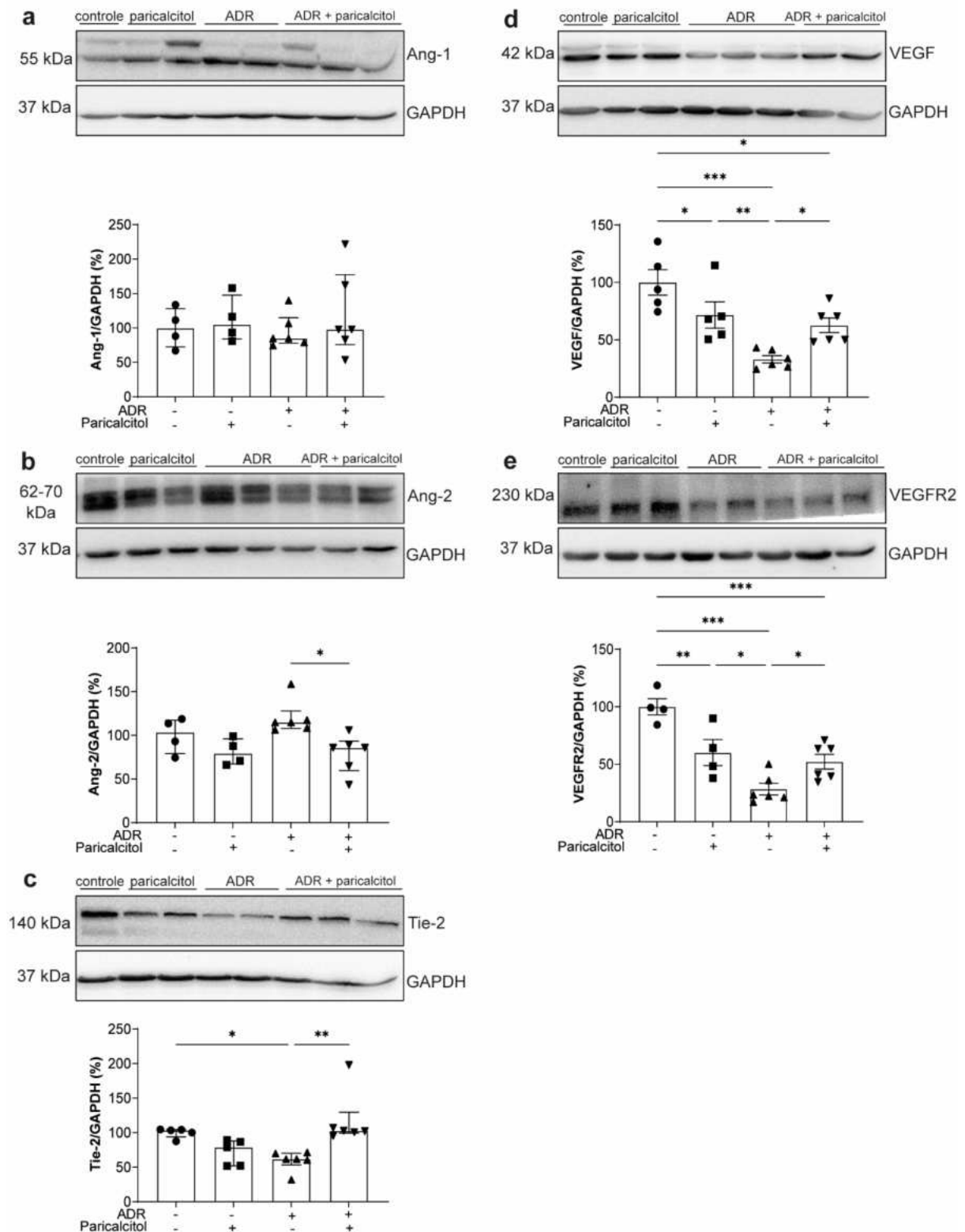


Figura 10 - Análise de fatores pró- e antiangiogênicos no tecido renal. Análise densitométrica entre (a). Ang-1. (b). Ang-2. (c). Tie-2. (d). VEGF. (e). VEGFR2 e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). $n = 4-6$ para cada grupo. Para (a-c). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*, expresso em mediana e percentis (25-75%). Para (d-e). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de *Newman-Keuls*, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.6 O tratamento com paricalcitol atenuou a expressão de marcadores mesenquimais e a deposição de MEC induzidas por ADR

A expressão de desmina, um marcador de desdiferenciação de células podocitárias no glomérulo, estava significativamente aumentada nos grupos que receberam ADR em comparação com os grupos controle e paricalcitol ($p < 0,001$). Esse aumento foi atenuado no grupo ADR + paricalcitol ($p < 0,01$) (Figura 11a e 11b). Corroborando com nosso achado de lesão podocitária, a expressão de podocina estava menor no grupo ADR em relação aos controles ($p < 0,001$). Os animais do grupo ADR + paricalcitol também apresentaram diminuição da expressão de podocina em relação aos grupos controle e paricalcitol ($p < 0,001$). Além disso, esses animais apresentaram prevenção dessa redução em relação ao grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 11c).

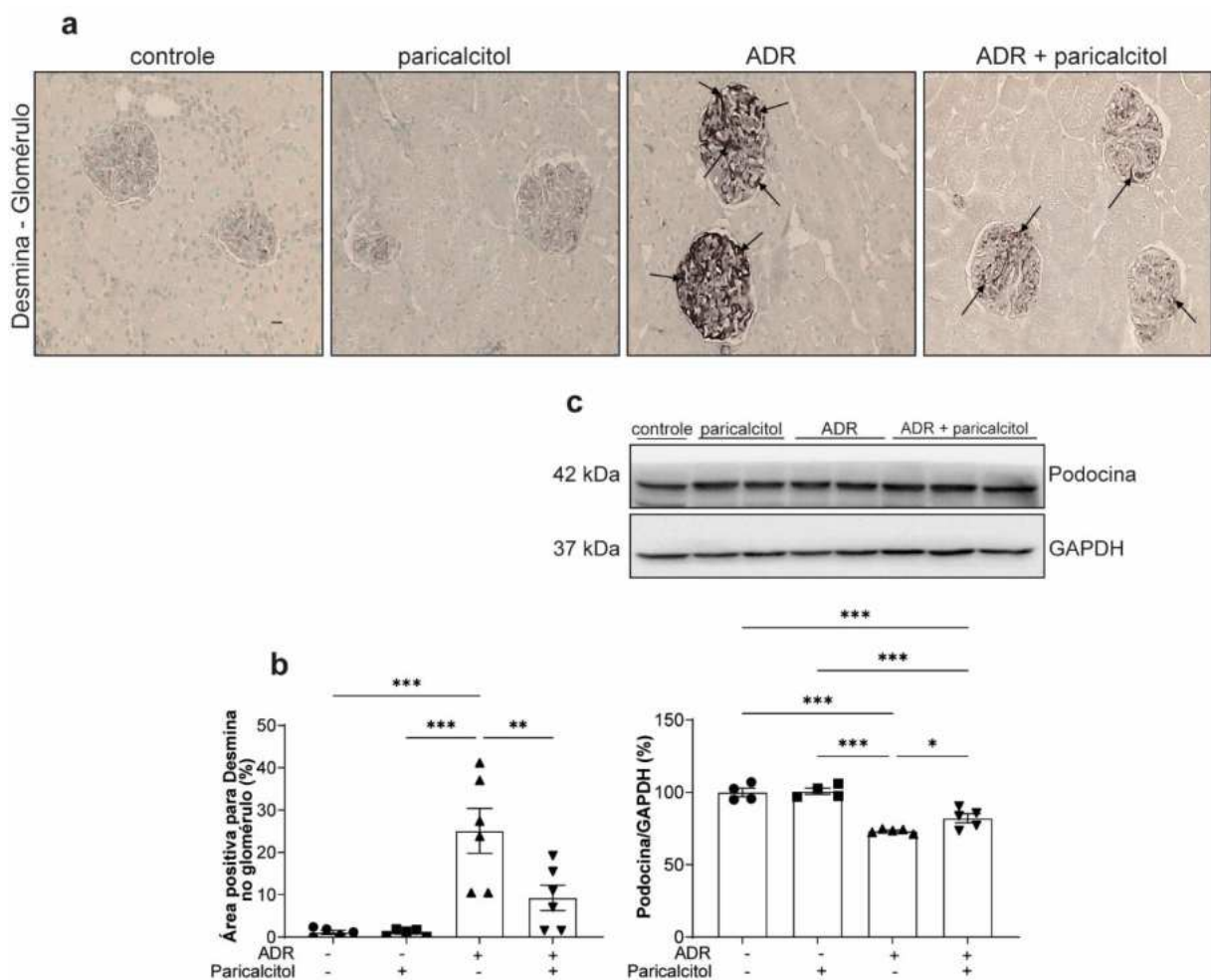


Figura 11 - Análise de desmina e podocina no tecido renal. (a). Imunolocalização da desmina no glomérulo. As setas indicam a expressão positiva de desmina no glomérulo. (b). Percentual de desmina-positiva no glomérulo. (c). Análise densitométrica entre podocina e GAPDH foram calculadas e os dados

foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). Barra de escala = 20 μ m, n = 4–6 para cada grupo. Para (b-c). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

O aumento da expressão de α -SMA foi observada no glomérulo, córtex e medula externa dos animais do grupo ADR em comparação com os grupos controle e paricalcitol (p < 0,05). O grupo ADR + paricalcitol apresentou redução dessa alteração no glomérulo e na medula externa (p < 0,05), mas não no compartimento cortical (p > 0,05) (Figura 12a–d). A análise densitométrica da expressão de α -SMA no tecido inteiro mostrou expressão aumentada dos animais do grupo ADR em comparação aos grupos controle (p < 0,05) e paricalcitol (p < 0,01). Os animais do grupo ADR + paricalcitol apresentaram expressão diminuída dessa proteína no tecido renal quando comparado com o grupo ADR (p < 0,05) (Figura 12e).

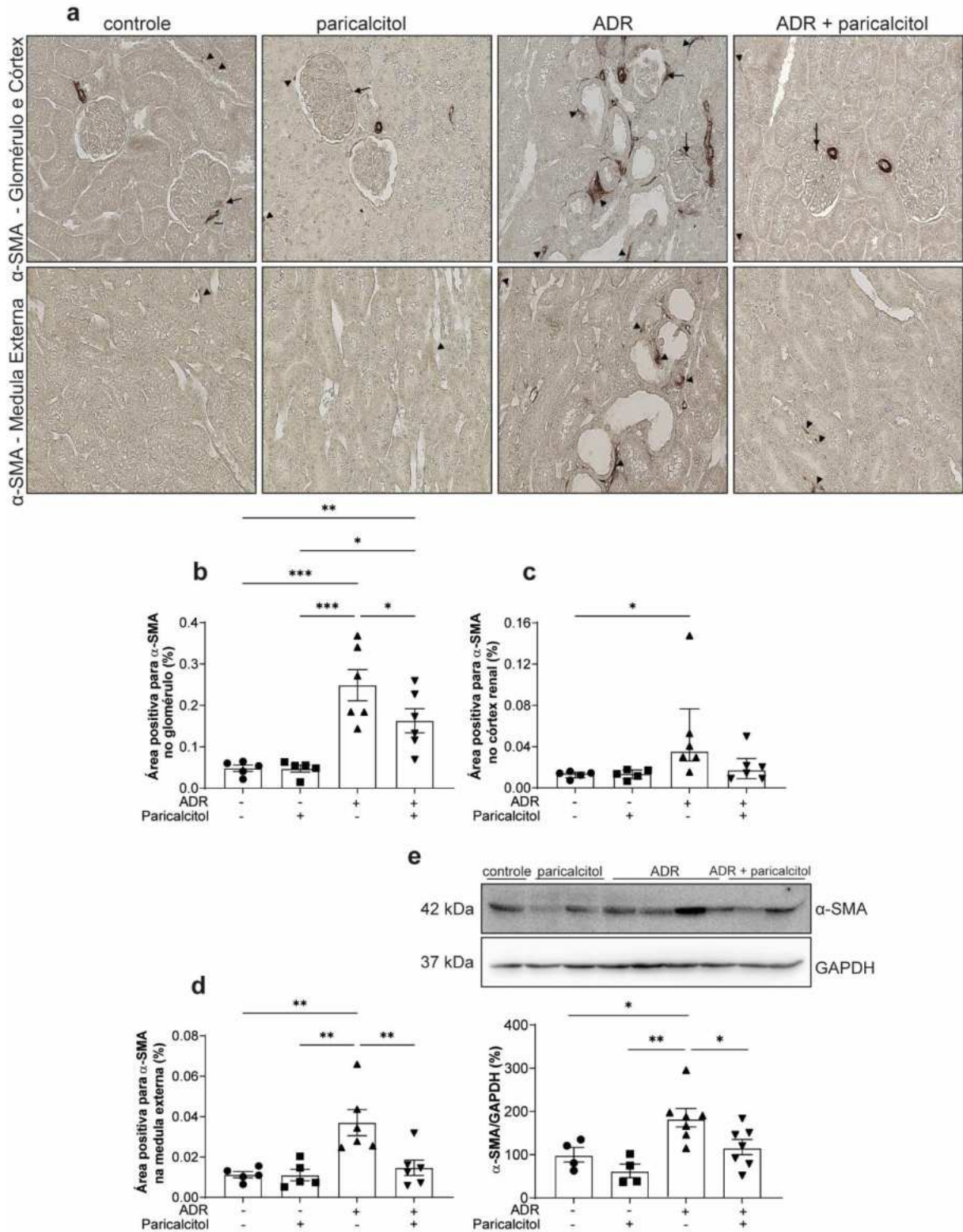


Figura 12 - Análise de α -SMA no tecido renal. (a). Imunolocalização de α -SMA nos compartimentos renais. As setas indicam a expressão α -SMA-positiva no glomérulo. As cabeças de setas indicam a expressão α -SMA-positiva nos compartimentos túbulo-intersticiais. Porcentagem de células α -SMA-positivas (b). no glomérulo. (c). no córtex e (d). na medula externa. (e). Análise densitométrica entre α -SMA e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). Barra de escala = 20 μ m, n = 4–6. Para (b, d, e). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos

como a média \pm EPM. Para (d). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*, expresso em mediana e percentis (25-75%). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A expressão de vimentina foi aumentada no córtex e na medula externa dos animais do grupo ADR em comparação com os grupos controle ($p < 0,05$) e paricalcitol ($p < 0,05$). O grupo ADR + paricalcitol apresentou diminuição da expressão desse marcador de células mesenquimais em relação ao grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 13a–c). Quando analisada por western blot, a proteína vimentina teve sua expressão aumentada no tecido renal dos animais do grupo ADR em comparação aos grupos controle ($p < 0,05$) e paricalcitol ($p < 0,01$). O tratamento com paricalcitol atenuou esse aumento no grupo ADR + paricalcitol comparado ao ADR ($p < 0,05$) (Figura 13d).

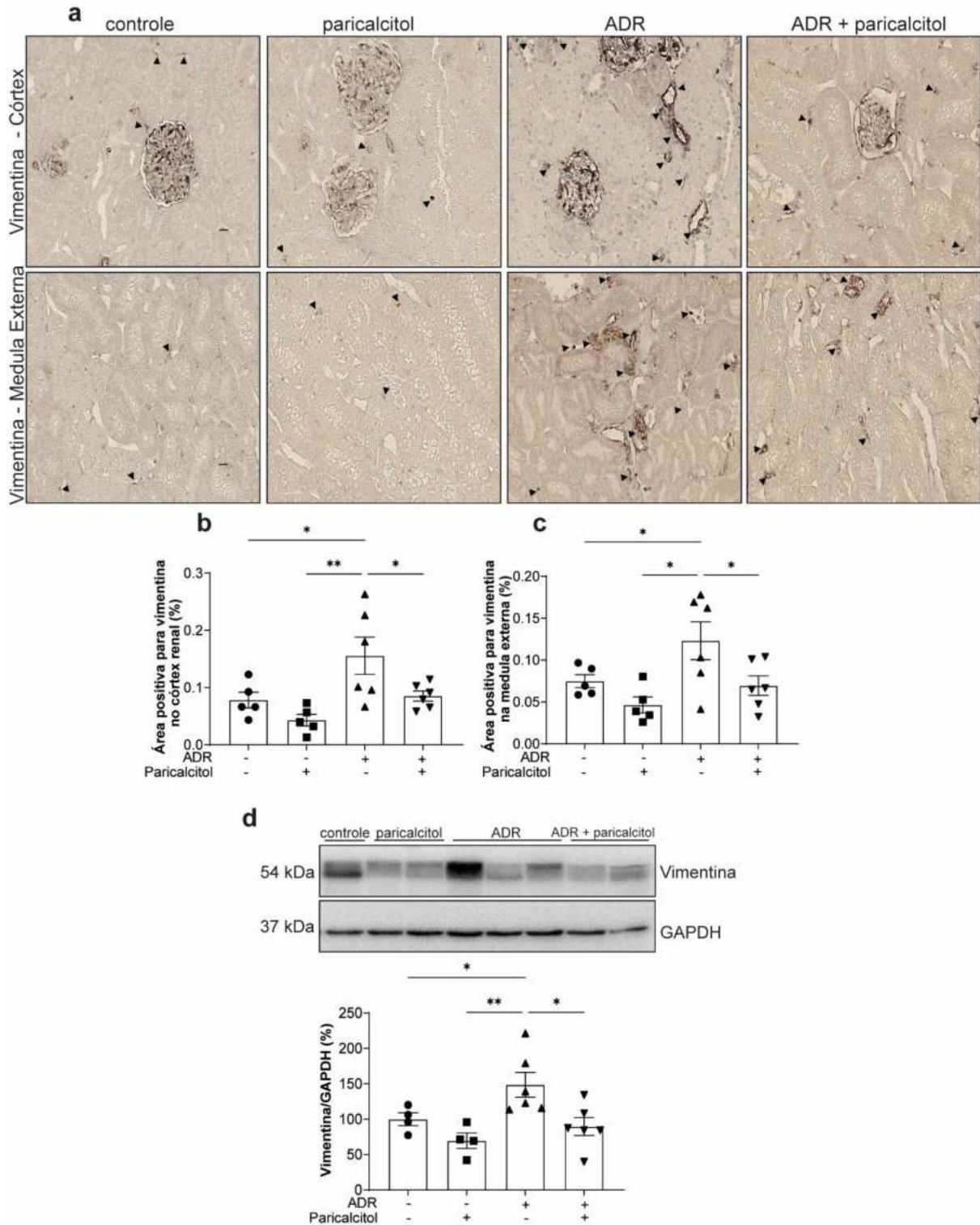


Figura 13 - Análise de vimentina no tecido renal. (a). Imunolocalização de vimentina nos compartimentos renais. As cabeças de setas indicam a expressão positiva da vimentina nos compartimentos túbulo-intersticiais. Porcentagem de células positivas para vimentina (b). no córtex e (c). na medula externa. (d). Análise densitométrica entre vimentina e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). Barra de escala = 20 μ m, n = 4–6. Para (b-d). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Nossos dados demonstraram maior deposição de MEC, evidenciados pelo aumento da marcação para Col I no glomérulo e córtex dos animais ADR em comparação com os grupos controle e paricalcitol ($p < 0,05$). O tratamento com paricalcitol foi capaz de prevenir essa alteração nos compartimentos citados dos animais do grupo ADR + paricalcitol ($p < 0,05$) (Figura 14a–c). Não foram observadas diferenças na expressão de Col I na medula externa dos diferentes grupos ($p > 0,05$) (Figura 14d). Adicionalmente, a expressão de fibronectina, considerada a primeira proteína a ser depositada no rim fibrótico e que serve de arcabouço para a deposição de Col I, estava aumentada nos animais do grupo ADR em relação aos grupos controle e paricalcitol ($p < 0,001$). O grupo ADR + paricalcitol apresentou redução dessa alteração ($p < 0,001$) (Figura 14e).

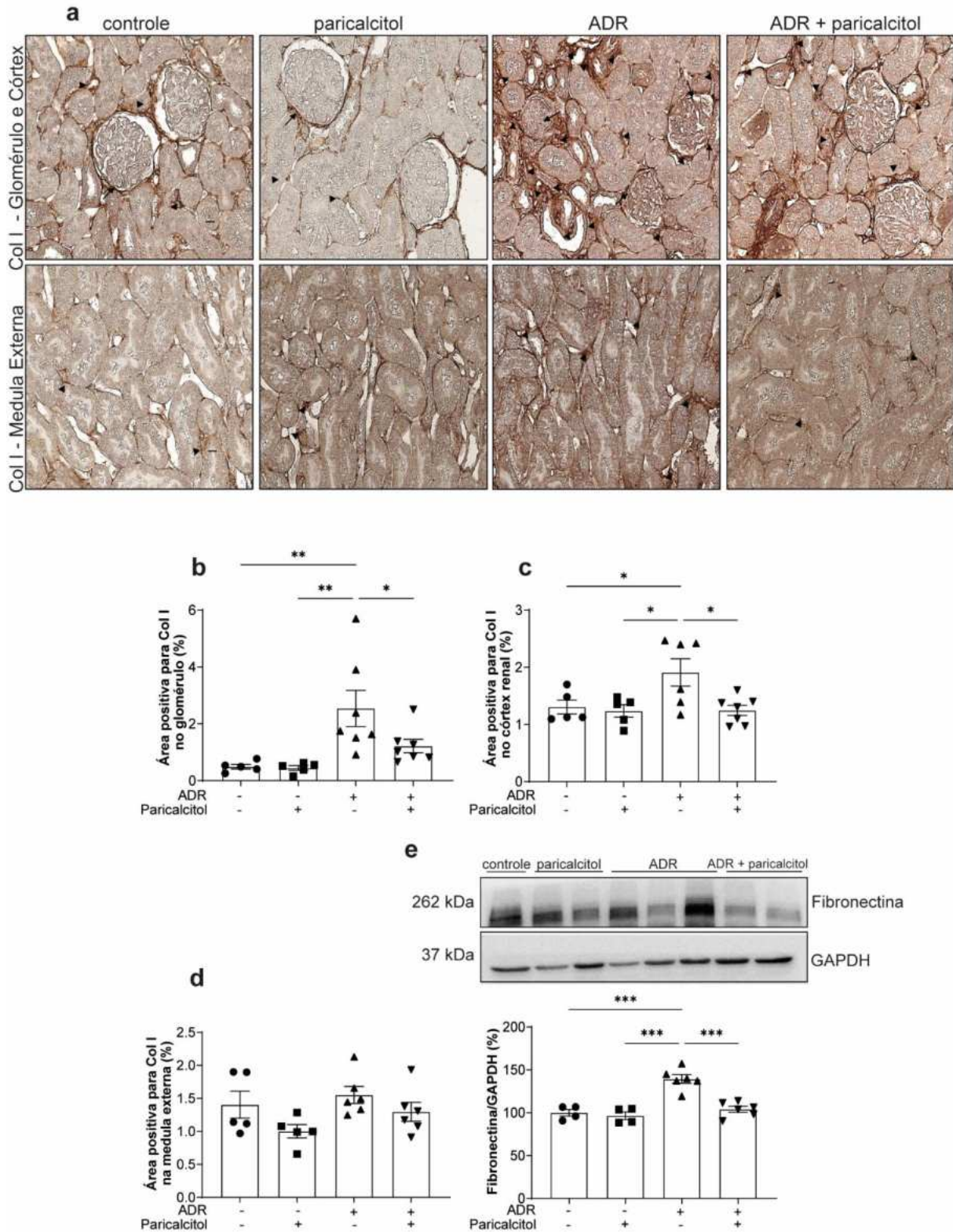


Figura 14 - Análise de colágeno I e fibronectina no tecido renal. (a). Imunolocalização de Col I nos compartimentos renais. As setas indicam a expressão positiva de Col I no glomérulo. As cabeças de setas indicam a expressão positiva de Col I nos compartimentos túbulo-intersticiais. Percentual de Col I-positivo (b). no glomérulo. (c). no córtex e (d). na medula externa. (e). Análise densitométrica entre fibronectina e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). Barra de escala =

20 μm , $n = 4-6$. Para (b-e). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.7 O tratamento com paricalcitol atenuou as alterações nas expressões de ZO-1 e PCNA induzidas por ADR

A expressão da proteína ZO-1, um marcador de junção celular apertada ou *tight*, estava diminuída no grupo ADR em relação aos animais do grupo controle e paricalcitol ($p < 0,001$). O grupo ADR + paricalcitol também apresentou diferenças em relação aos grupos controle ($p < 0,05$), paricalcitol ($p < 0,01$) e ao ADR ($p < 0,01$) (Figura 15a). Para a expressão do PCNA no tecido renal, uma proteína associada a proliferação celular, foi observado redução significativa no grupo ADR + paricalcitol em relação ao ADR ($p < 0,05$) (Figura 15b).

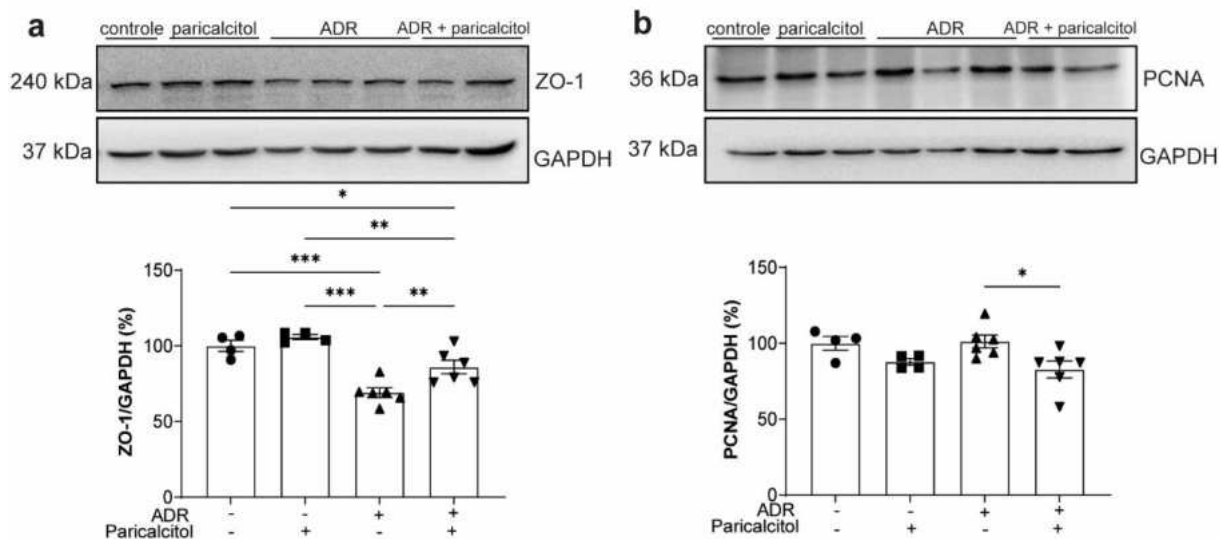


Figura 15 - Análise da expressão de ZO-1 e PCNA no tecido renal. Análise densitométrica entre (a). ZO-1. (b). PCNA e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). $n = 4-6$ para cada grupo. Para (a-b). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.8 O tratamento com paricalcitol modulou a via canônica TGF- β 1-Smad dependente

O TGF- β 1 foi avaliado como mediador pró-fibrótico. Foi observado que os níveis urinários de TGF- β 1 estavam aumentados nos grupos que receberam adriamicina (ADR e ADR + paricalcitol) em comparação com os grupos controle e paricalcitol ($p < 0,01$) (Figura 16a), porém não foi encontrada diferença entre os dois grupos mencionados (ADR e ADR + paricalcitol, $p > 0,05$). Para os níveis de TGF- β 1 no tecido renal, o grupo ADR apresentou aumento em comparação aos grupos controle ($p < 0,05$) e paricalcitol ($p < 0,01$). Esta alteração foi significativamente atenuada no grupo ADR + paricalcitol ($p < 0,05$) (Figura 16b).

Os níveis de p-Smad_{2/3} e Smad_{2/3} total também estavam aumentados no grupo ADR em relação aos grupos controle e paricalcitol ($p < 0,05$). A expressão de p-Smad_{2/3} e Smad_{2/3} total foi reduzida nos animais do grupo ADR + paricalcitol em comparação com o grupo ADR ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 16c e 16d). A expressão proteica de ZEB2, um fator transcricional induzido por TGF- β , também foi avaliado. Foi observado que o tratamento prévio com paricalcitol no grupo ADR + paricalcitol, contribuiu para a redução da expressão de ZEB2 em relação ao grupo ADR ($p < 0,05$) (Figura 16e).

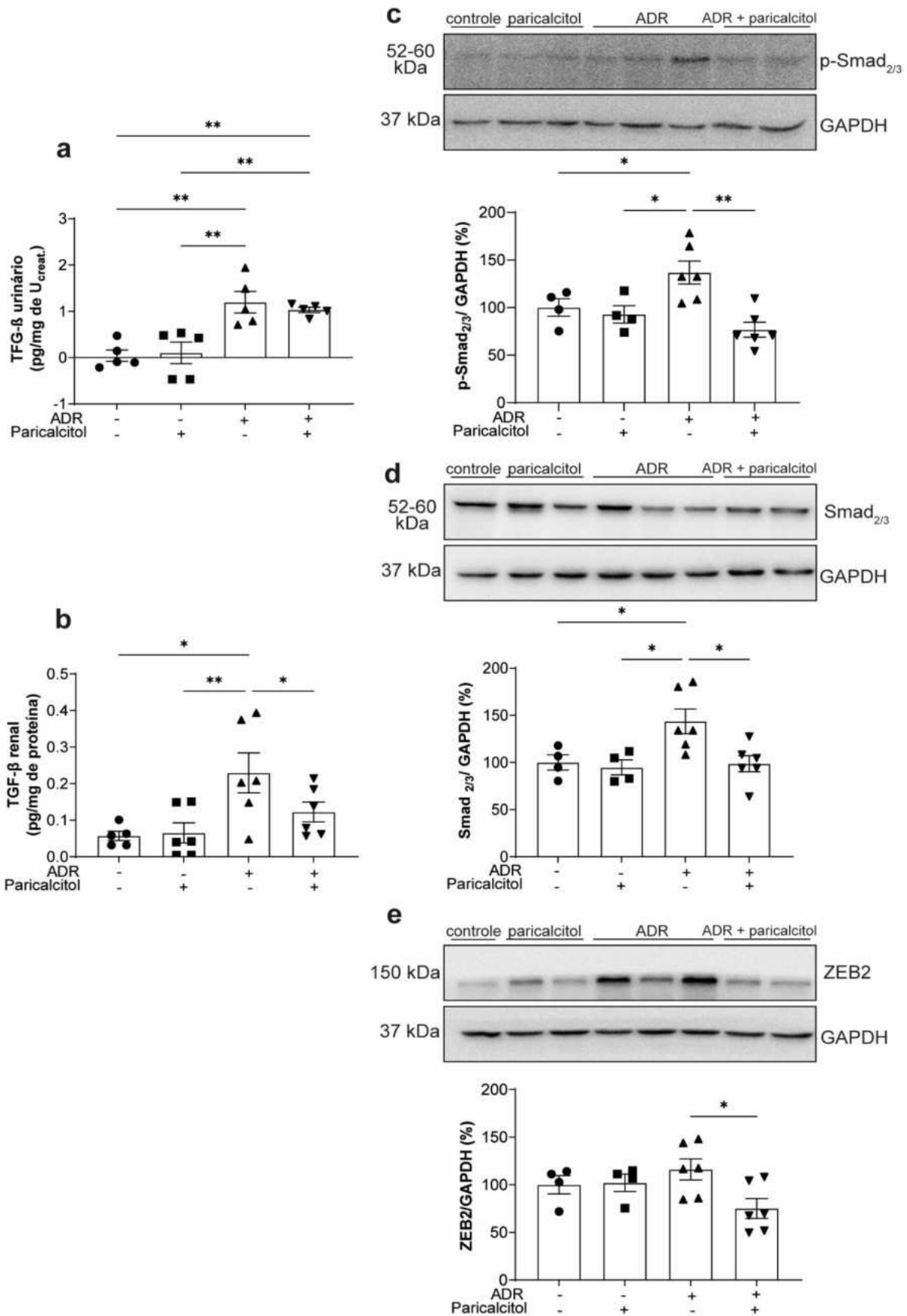


Figura 16 - Via canônica pró-fibrótica dependente de Smad. Níveis de TGF- β 1 (a), na urina, e (b), no tecido renal. Análises densitométricas entre (c), p-Smad_{2/3}. (d), Smad_{2/3}. (e), ZEB2 e GAPDH foram

calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). n = 4–6 para cada grupo. Para (a-e). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05; ** p < 0,01.

5.9 O tratamento com paricalcitol também regulou as vias TGF- β 1-Smad independentes

Em seguida, nós avaliamos possíveis mecanismos não relacionados com a ativação da via canônica de Smad. Observamos que a expressão do receptor AT₁ estava aumentada no grupo ADR em comparação com os grupos controle e paricalcitol (p < 0,05). O tratamento com o paricalcitol preveniu o aumento dessa expressão (p < 0,05) (Figura 17a). Somados a esses dados, nós avaliamos a ativação de vias relacionadas a MAPK, e conseqüentemente ao processo inflamatório. Primeiramente, foi observado que p-p38 foi menor no grupo ADR + paricalcitol quando comparado aos grupos controle (p < 0,01), paricalcitol (p < 0,05) e ADR (p < 0,01) (Figura 17b). Para as proteínas p-JNK e p-ERK_{1/2} foi visto um aumento no grupo ADR quando comparadas aos grupos controle (p < 0,05) e paricalcitol (p < 0,01). Esse aumento foi atenuado nos animais do grupo ADR + paricalcitol (p < 0,001 para p-JNK e p < 0,05 para p-ERK_{1/2}) (Figura 17d e 17e).

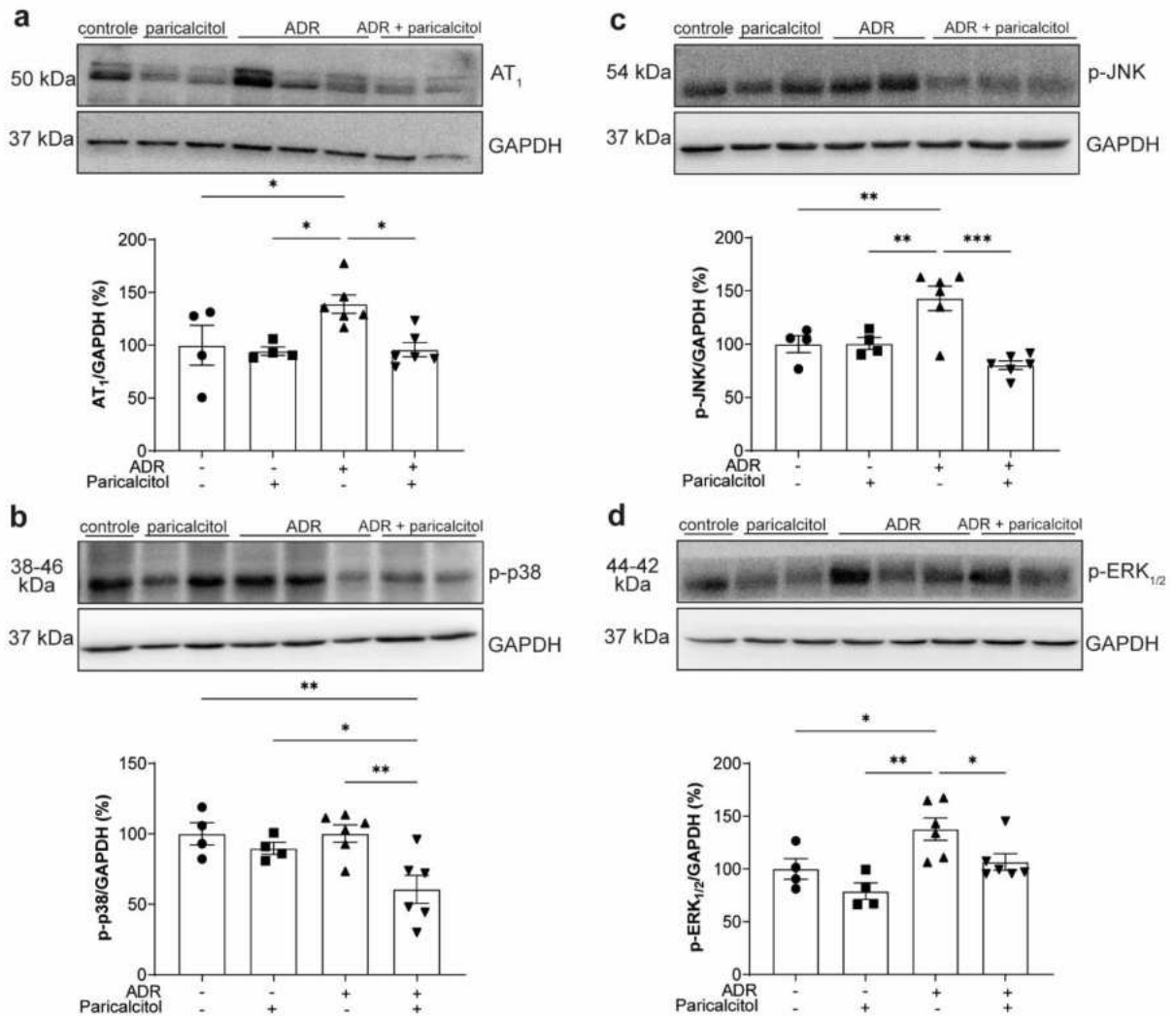


Figura 17 - Vias de ativação pró-fibrótica independente de Smad. Análise densitométrica entre (a). AT₁. (b). p-p38. (c). p-JNK. (d). p-ERK_{1/2} e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). n = 4–6 para cada grupo. Para (a-d). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média ± EPM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

5.10 O tratamento com paricalcitol atenuou a infiltração de macrófagos induzida por ADR

A expressão de CD68, um marcador de macrófagos e monócitos estava aumentada no glomérulo, córtex e na medula externa dos animais do grupo ADR em comparação com os grupos controle (p < 0,05) e paricalcitol (p < 0,01). O grupo ADR + paricalcitol apresentou diminuição da expressão desse marcador em relação ao grupo ADR em todos os compartimentos avaliados (p < 0,05) (Figura 18a–d). Na análise por western blot, o CD68 também estava aumentado nos animais do grupo

ADR em comparação aos grupos controle e paricalcitol ($p < 0,01$). O tratamento com paricalcitol atenuou esse aumento no grupo ADR + paricalcitol ($p < 0,01$) (Figura 18e).

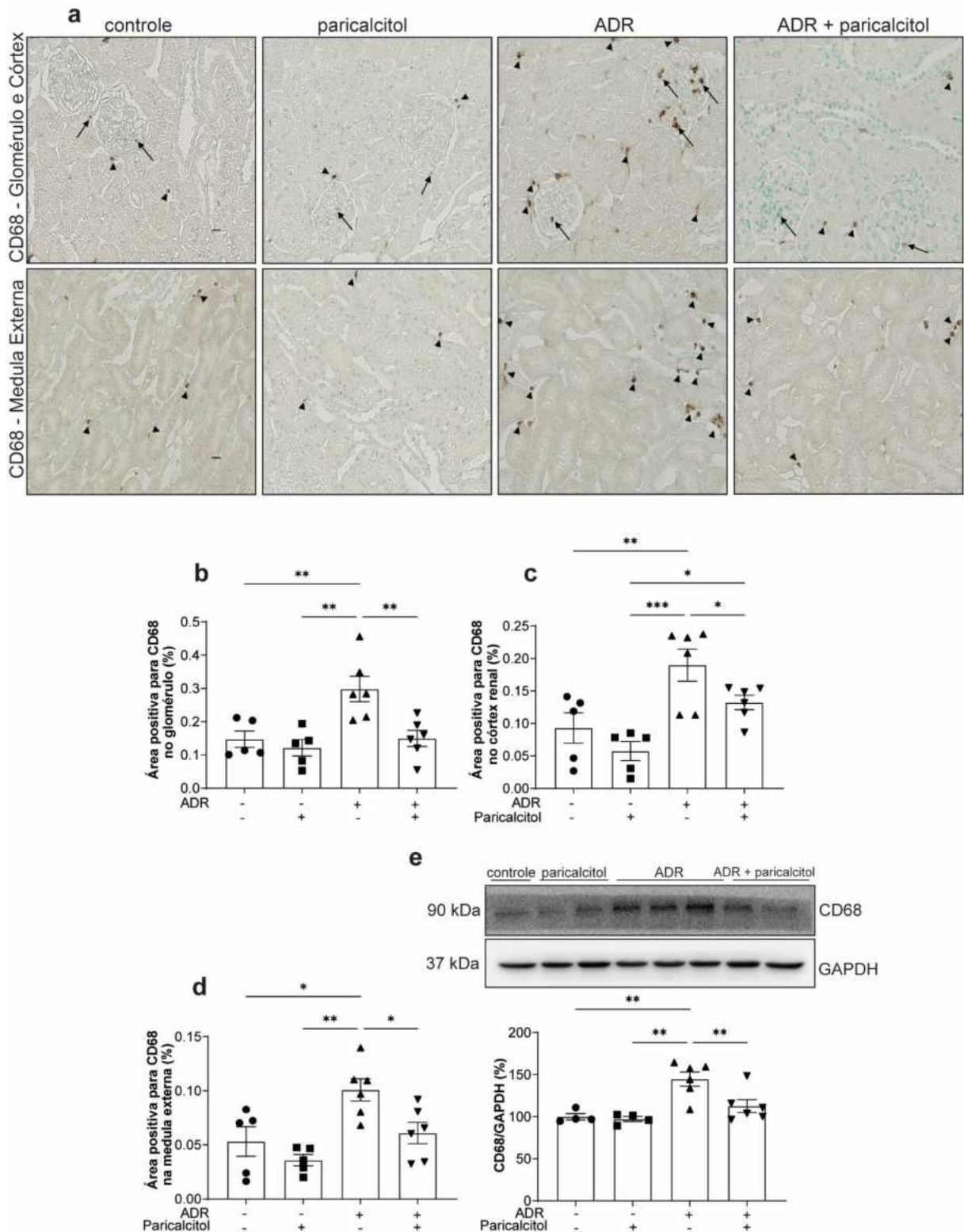


Figura 18 - Análise de células positivas para CD68 (macrófagos) no tecido renal. (a). Imunolocalização de CD68 nos compartimentos renais. As setas indicam a expressão positiva de CD68 no glomérulo. As cabeças de setas indicam a expressão positiva de CD68 nos compartimentos túbulo-intersticiais.

Percentual de CD68-positivo (b). no glomérulo. (c). no córtex e (d). na medula externa. (e). Análise densitométrica entre CD68 e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). Barra de escala = 20 μm . n = 4–6 para cada grupo. Para (b-e). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

5.11 O tratamento com paricalcitol regulou a secreção de citocinas pró-inflamatórias e induziu o fenótipo de macrófagos reparadores

Visto que a marcação para macrófagos estava aumentada no tecido renal de ratos com lesão renal induzido por ADR, investigamos qual o perfil dos macrófagos presentes nos diferentes compartimentos renais. Vimos aumento do TNF- α e IL-1 β (citocinas pró-inflamatórias) por ELISA no grupo ADR em relação ao grupo controle (p < 0,05) e paricalcitol (p < 0,05, apenas TNF- α). No grupo que recebeu o tratamento com paricalcitol (ADR + paricalcitol) os níveis dessas citocinas foram menores em relação ao grupo ADR (p < 0,05) (Figura 19a e 19b). Foi observado também, que a análise densitométrica para Arginase I, utilizada como marcador de macrófagos reparadores (M2), teve uma redução de sua expressão no tecido renal dos animais do grupo ADR em comparação aos grupos controle (p < 0,05) e paricalcitol (p < 0,001). No grupo ADR + paricalcitol essas alterações foram menores em comparação ao grupo ADR (p < 0,05) e controle (p < 0,01). Ainda para a Arginase I, foi encontrado uma diferença ente o grupo controle e paricalcitol (p < 0,05) (Figura 19c).

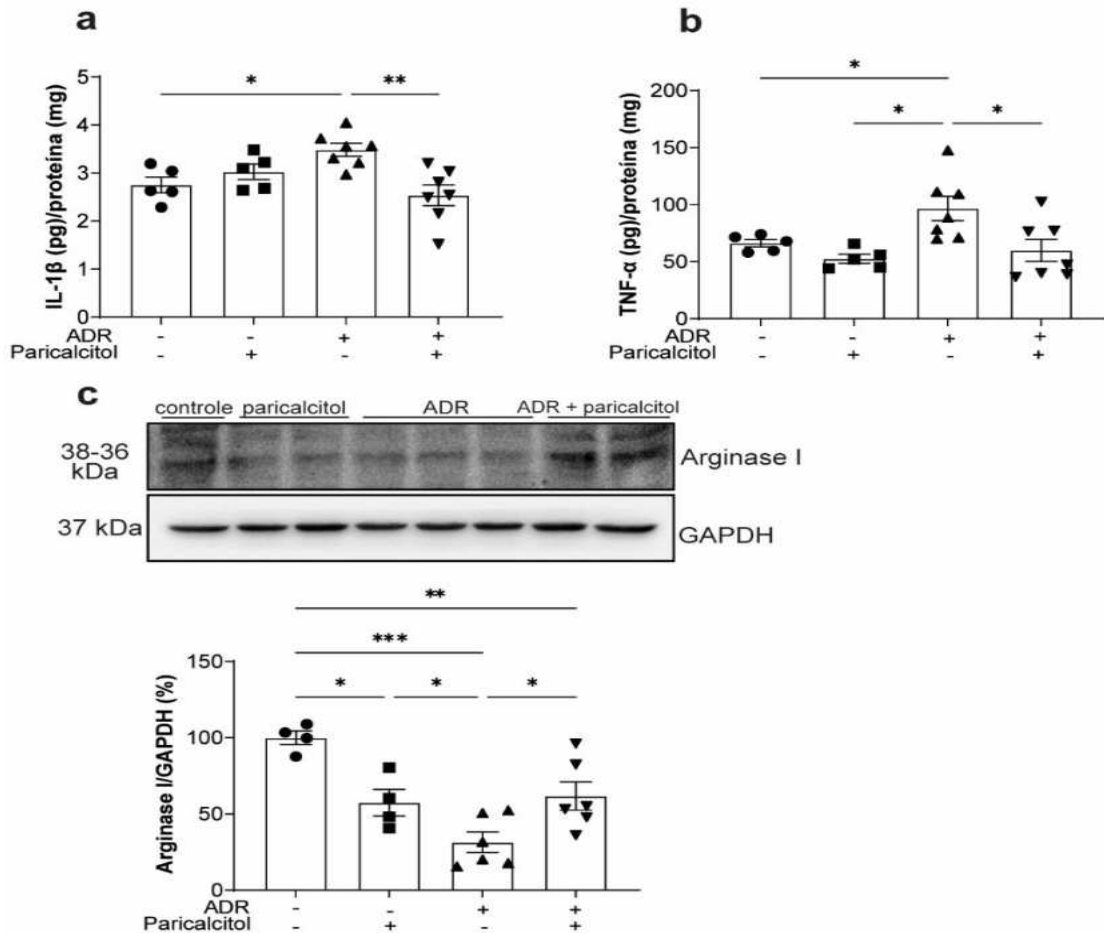


Figura 19 - Citocinas e perfil de macrófagos no tecido renal. ELISA para (a). IL-1 β . (b). TNF- α . (c). Análise densitométrica entre Arginase I e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). n = 4–6 para cada grupo. Para (a-c). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

5.12 O tratamento com paricalcitol atenuou vias pró-inflamatórias induzidas por ADR

Não foi observada diferença da expressão da proteína NF- κ B avaliada por western blot nos grupos experimentais (p > 0,05) (Figura 20a). Contudo, para as proteínas inibitórias I κ B α e I κ B β , foi observado redução no grupo ADR em relação aos grupos controle e paricalcitol (p < 0,05). Estes parâmetros foram menores no grupo ADR + paricalcitol quando comparados ao grupo ADR (p < 0,05). Ainda para a I κ B α , o grupo ADR + paricalcitol também apresentou diferenças significantes com os grupos controles (p < 0,05) (Figura 20b e 20c).

Avaliamos também a via SDF-1 α /CXCR4. Essas duas proteínas estavam aumentadas significativamente nos animais do grupo ADR em relação aos grupos controle ($p < 0,05$, apenas para SDF-1 α) e paricalcitol ($p < 0,05$). O tratamento com a vit. D ativa foi capaz também de atenuar a expressão dessas proteínas pró-inflamatórias ($p < 0,05$) (Figura 20d e 20e). Foi analisado ainda a proteína β -Catenina, que apresentou perfil semelhante as duas proteínas citadas acima, ou seja, um aumento de sua expressão no grupo ADR em relação aos grupos controles ($p < 0,01$) e atenuação de sua expressão no rim de animais do grupo ADR + paricalcitol ($p < 0,001$) (Figura 20f).

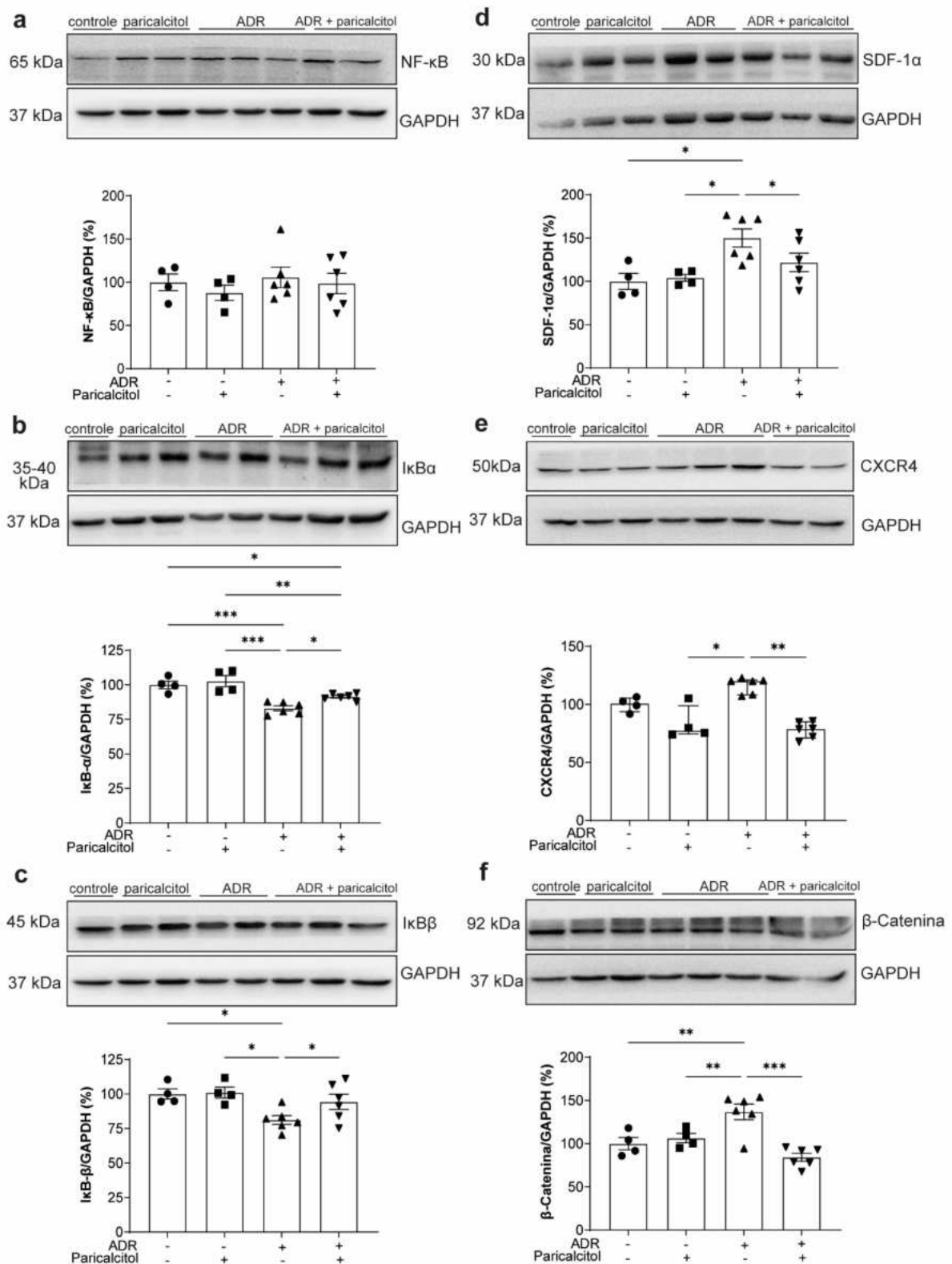


Figura 20 - Análise de vias pró-inflamatórias no tecido renal. Análise densitométricas entre (a). NF-κB. (b). IκBα. (c). IκBβ. (d). SDF-1α. (e). CXCR4. (f). β-Catenina e GAPDH foram calculadas e os dados foram expressos em comparação com o grupo controle. O valor de controle foi designado como 100%. Dados dos grupos controle (pontos), paricalcitol (quadrados), ADR (triângulos para cima) e ADR + paricalcitol (triângulos para baixo). n = 4-6 para cada grupo. Para (a, b, c, d, f). ANOVA *One-way* e comparações múltiplas de Newman-Keuls, expressos como a média ± EPM. Para (e). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*, expresso em mediana e percentis (25-75%). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos a participação da vit. D ativa frente a lesão renal induzida por ADR. Para isso, foi utilizado uma minibomba osmótica para permitir a liberação contínua e sem oscilações de paricalcitol por 27 dias consecutivos enquanto a lesão renal era estabelecida. Os dados demonstraram que o paricalcitol melhorou a função e estrutura renal reduzindo a proteinúria e a lesão glomerular. Os efeitos protetores do paricalcitol podem estar relacionados ao aumento da expressão e ativação do VDR, o que contribuiu para a redução da expressão de mediadores da via TGF- β dependente e independente de Smad_{2/3}, diminuindo assim o processo fibrótico observado em nosso estudo. Os dados ainda mostram a modulação do paricalcitol nos fatores angiogênicos endoteliais, regulando os eixos das angiopietinas/Tie-2 e VEGF/VEGFR2, sendo esses efeitos relacionados à manutenção da microvasculatura e à redução do processo inflamatório nos animais ADR + paricalcitol. Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que o paricalcitol pode atenuar a lesão renal induzida por ADR, aumentando a expressão do VDR e disponibilidade de vit. D ativa no tecido renal para gerar respostas anti-inflamatórias e anti-fibróticas.

A lesão renal progressiva está associada com alterações de função e estrutura renal, que refletem nas características clínicas observadas em pacientes com a doença (“CHRONIC KIDNEY DISEASE WORK GROUP, KDIGO 2012 CLINICAL PRACTICE GUIDELINE FOR THE EVALUATION AND MANAGEMENT OF CHRONIC KIDNEY DISEASE, 2012”, 2013). A perda de peso em estágios mais avançados da lesão renal pode ocorrer em decorrência das complicações graves em pacientes. Embora dados na literatura sobre a relação de peso corporal e suplementação de vit. D na lesão renal sejam escassos, os nossos resultados mostraram que o peso corporal foi diferente entre os animais do grupo ADR + paricalcitol em relação ao grupo paricalcitol, indicando a toxicidade desse quimioterápico em roedores, atestado também por outros estudos utilizando esse modelo experimental (BRYANT et al., 2022; DING et al., 2014). Estudos ainda demonstram que a vit. D pode ser produzida no músculo, pela ativação de 1 α -hidroxilase intramuscular, mantendo a massa muscular na vida adulta, o que poderia corroborar com o aumento de peso corporal de animais do grupo paricalcitol (REIS et al., 2022). Não observamos diferenças no peso absoluto do rim dos animais dos

diferentes grupos que receberam o quimioterápico, embora a ADR pode levar ao edema do rim, como mostrado em trabalho anterior (LI et al., 2020), pela ação da albumina intrarrenal, que leva a retenção de sódio e água. O tratamento com paricalcitol não alterou esse parâmetro.

Os níveis de 25 OHD, a forma não ativa da vit. D, não se alteraram entre os grupos, demonstrando que a dose utilizada no tratamento foi próxima ao fisiológico, não apresentando toxicidade e se manteve estável até o final do experimento. Vale ressaltar que a CYP24A1, indicador de vit. D ativa no tecido (REIS et al., 2019), estava aumentada nos animais que receberam paricalcitol, o que demonstra que no rim a vit. D se manteve ativa para interagir com o VDR. Os efeitos observados do paricalcitol durante todo trabalho, evidenciou que o mesmo reduziu as alterações induzidas por ADR, independentemente dos níveis de 25 OHD, PTH, P_{Ca} , P_P e P_K .

Nós observamos o aumento da expressão de VDR nos animais que receberam tratamento prévio com paricalcitol e ADR. Trabalhos utilizando o modelo de deficiência de vit. D mostraram que ocorre uma regulação negativa na expressão desse receptor na falta de seu ligante (SOUZA et al., 2023), enquanto a suplementação aumenta sua expressão (OLIVEIRA et al., 2022). A CYP24A1 é uma enzima responsável por degradar a 1,25 OHD. Esta enzima é fortemente induzida pelo calcitriol e pode ser usada como um marcador de vit. D ativa na célula (BIKLE, 2014), envolvendo outro mecanismo de feedback negativo, onde uma queda dos níveis de vit. D ativa é compensada por uma menor degradação dos níveis locais, e assim pela menor expressão de CPY24A1 (REIS et al., 2019). Portanto, a vit. D em sua forma ativa e circulante pode aumentar os níveis de seus receptores, VDR, frente a lesão renal induzida por ADR, contribuindo para a recuperação das alterações da função e estrutura renal observadas nesse modelo.

A manifestação clínica mais comumente observada na lesão renal progressiva é o aparecimento da albumina na urina. A proteinúria/albuminúria está diretamente ligada à progressão da lesão renal (CHANG-CHIEN et al., 2018; HAN et al., 2019). Os resultados do nosso estudo mostraram que a função renal estava reduzida nos animais do grupo ADR, evidenciados pela queda da TFG e aumentos da $P_{creat.}$, FE_{Na} , e EUA. Estes parâmetros são características fundamentais do modelo de nefropatia induzida por ADR, similar a síndrome nefrótica da GESF em humanos (ZHU et al., 2022). As alterações no transporte de eletrólitos, pode estar associada a ativação do

canal epitelial de sódio (ENaC) pelo aumento da atividade da serina protease urinária decorrente da proteinúria excessiva (BOHNERT; ARTUNC, 2018; HAERTEIS et al., 2018). O uso de bloqueadores do SRA, redução do consumo de sal, e controle da pressão arterial são algumas das intervenções que são utilizadas com o objetivo de reduzir a albuminúria em pacientes com DRC, porém esses métodos são limitados em prevenir o dano renal (LIU et al., 2016). Essas alterações funcionais do grupo ADR foram muito singelas em relação aos grupos controles, porém ainda sim, o paricalcitol foi capaz de reduzir essas alterações no grupo ADR + paricalcitol.

A ação pleiotrópica da vit. D tem sido estudada a anos, sendo essencial para prevenir distúrbios cardiovasculares, melhorar a função do endotélio e proteinúria, reduzindo assim, a morbidade e mortalidade em pacientes com lesão renal progressiva (LIU et al., 2016). Observamos em nosso estudo, os efeitos antiproteinúricos da vit. D ativa. O paricalcitol ativa seletivamente o VDR (LIM et al., 2021) ligando-se e interagindo com o VDR/VDRE e é essencial na prevenção de alterações morfológicas de podócitos no modelo de síndrome nefrótica induzida por aminonucleosídeo de puomicina (ZHANG et al., 2022). A 1,25 (OH₂D₃) reduziu a passagem transendotelial de albumina induzida por ADR *in vitro* e *in vivo* através da interação com o promotor VDR-heparanase em podócitos. Esse *crosstalk* entre CE glomerulares e podócitos torna-se importante para a vit. D poder modular esse efeito nessas células, já que os podócitos possuem maior expressão de VDR (GARSEN et al., 2015). Adicionalmente, nós observamos um aumento da expressão de desmina na periferia do tufo glomerular e diminuição de podocina nos animais do grupo ADR. A manutenção da estrutura e função de podócitos exige alta diferenciação celular, enquanto sua desdiferenciação, resulta em proteinúria (XIE et al., 2019). A expressão de desmina indica a lesão dos podócitos somado a menor expressão de podocina em modelo de nefropatia induzida por ADR (LIU et al., 2019a; NI et al., 2018; WU et al., 2014; XIE et al., 2019). Nosso estudo mostrou que o tratamento prévio com paricalcitol foi capaz de atenuar diretamente esses efeitos tanto na estrutura quanto na função de podócitos e CE da barreira de filtração glomerular, associados com albuminúria reduzida e melhora na TFG nesse grupo de animais.

A análise histopatológica evidenciou lesões túbulo-intersticiais e fibrose em resposta ao aumento da permeabilidade glomerular a proteínas e maior deposição de fibras de colágeno no compartimento cortical e medular externo. Estudos clínicos e

experimentais mostram a participação da albuminúria na lesão túbulo-intersticial associada as glomerulopatias (WANG et al., 2015; ZOJA; ABBATE; REMUZZI, 2015). Wu et al. (2020) demonstraram que as alterações funcionais e a lesão de células tubulares estão relacionadas com a perda de capilares peritubulares no córtex de animais que passaram por protocolo de hipóxia crônica intermitente (WU et al., 2019). A proteinúria pode iniciar a fibrose túbulo-intersticial acompanhada da perda de capilares (HAMAR; KERJASCHKI, 2016), tanto glomerulares quanto peritubulares, indicando distúrbios da microvasculatura renal (YOO et al., 2018). Os resultados do nosso trabalho mostram perda do fenótipo da célula endotelial, evidenciados por dados imunistoquímicos que demonstram uma diminuição significativa de JG12, um marcador de CE, nos diferentes compartimentos renais. Em modelo experimental de UUU, o α -SMA e o grupo de diferenciação 31 (CD31), outro marcador endotelial, são colocalizados, indicando a origem endotelial dos miofibroblastos no tecido renal (EndoMT) (YANG et al., 2017). Em estudos anteriormente realizados no nosso laboratório, foi demonstrado que o tratamento com calcitriol protege a CE do dano induzido pela desregulação do SRA durante o desenvolvimento renal, diminuindo a expressão de marcadores de células desdiferenciadas como α -SMA e vimentina, e atenuando a redução de JG12 e eNOS (DELUQUE et al., 2020).

O tratamento com paricalcitol reduziu a rarefação capilar observada em animais tratados com ADR. Esses dados sugerem que as alterações provocadas no início da lesão renal podem ser moduladas pelo paricalcitol, pelo menos em parte, devido aos seus efeitos na diferenciação celular e na manutenção do endotélio. Em relação a modulação endotelial e mesenquimal, observamos aumento da expressão dos níveis teciduais de p-eNOS em animais tratados com paricalcitol. O aumento da expressão ou da atividade da eNOS resulta em uma produção de NO mais eficiente (VANHOUTTE et al., 2017; ZOCCALI et al., 2014). No modelo ADR, ocorrem alterações nas vias do NO pela toxicidade endotelial, inibindo e desacoplando a eNOS, impedindo sua fosforilação (HE et al., 2020; MU et al., 2019). A interação vit. D/VDR estimula o gene da eNOS, resultando em maior produção de NO, o que melhora a função vascular (ANDRUKHOVA et al., 2014). Além disso, a ação genômica dessa interação promove a maior expressão da eNOS, que sintetiza NO a partir da L-arginina e suprime a expressão de arginase II. Essa enzima é responsável por hidrolisar o NO em ornitina e ureia (KIM et al., 2020). Andrukhoa et al. (2014) mostraram que a

deleção de VDR resulta em diminuição do substrato L-arginina devido a maior expressão de arginase II, demonstrando papel importante da ativação de VDR para manter a maior quantidade de NO para o tecido.

A manutenção do endotélio está prejudicada na deficiência de vit. D, o que pode aumentar os níveis renais de Ang-2, enquanto diminui níveis de Ang-1 e o receptor Tie-2 (FERREIRA DE ALMEIDA et al., 2019). A Ang-1 é um fator angiogênico, que estimula a proliferação e a manutenção da CE na angiogênese, fibrose e inflamação (FERREIRA DE ALMEIDA et al., 2019; LOGANATHAN et al., 2018) associada à atenuação de miofibroblastos, acúmulo de MEC e crescimento capilar peritubular observado no modelo UUO (ANDERSON et al., 2018; SINGH et al., 2016). A Ang-2 está associada ao aumento da albuminúria e à diminuição da TFG no diabetes mellitus tipo 2 e na lesão renal avançada (CHANG et al., 2013, 2021a; CHEN et al., 2015). A maior relação Ang-1/Ang-2 foi associada a menor progressão da lesão renal e 82% menos risco de mortalidade na lesão renal aguda (LRA) (MANSOUR et al., 2022). Pacientes em estágios 3 e 4 de DRC apresentam níveis aumentados de Ang-2 e menor concentrações de Tie-2 no plasma, enquanto a Ang-1 não se altera entre os diferentes estágios (CHANG et al., 2022) . Juntos esses dados sugerem que o eixo Ang-2/Tie-2 está associado ao maior risco para a progressão da lesão renal. O tratamento com paricalcitol atenuou as alterações na expressão de Ang-2, o que se refletiu na regulação negativa da via Ang-2/Tie-2, reduzindo a albuminúria, as alterações na TFG e a rarefação vascular em animais que receberam tratamento com paricalcitol. Além disso, o Tie-2 e o VEGFR2 são receptores endoteliais específicos que apoiam esses dados, juntamente com a recuperação da expressão de JG12 nas células renais. Nossos resultados reforçaram a participação dos capilares glomerulares, corticais e peritubulares da medula renal para a eficiência da função renal na idade adulta.

Em condições fisiológicas, a eNOS pode fosforilar o VEGF e vice-versa, protegendo a perda de podócitos, rarefação vascular glomerular e peritubulares, fibrose renal (FU et al., 2015) e inibindo a expressão de TGF β -Smad₃ (MIAO et al., 2022). O paricalcitol demonstrou efeitos na sobrevivência e manutenção não só de podócitos, mas também de células epiteliais tubulares, células que secretam o VEGF, evidenciados por dados de redução da expressão de desmina no glomérulo e de células mesenquimais no córtex e medula externa. Nosso trabalho evidenciou o efeito

sinérgico da ativação do VDR e fatores próangiogênicos. Esses efeitos podem causar neovascularização e manutenção do endotélio pelo aumento dos níveis de VEGF no tecido (GRUNDMANN et al., 2012; ZHONG et al., 2014), por atuar na proliferação e diferenciação das células (DELUQUE et al., 2020; KAUR et al., 2022). O VEGF tem efeitos pró e anti-fibróticos em diferentes condições de saúde e doenças renais regulando a angiogênese e também participando na progressão da fibrose renal (MIAO et al., 2022). Observamos a redução na expressão de VEGF e VEGFR2 nos animais do grupo paricalcitol, mostrando que o VEGF pode exacerbar ou inibir o processo de fibrose renal, dependente do estímulo. Em nosso estudo, o paricalcitol pode regular o VEGF de diferentes maneiras para contribuir com a manutenção do tecido renal, como atenuando os impactos da redução de TFG, modulação dos efeitos sob a proliferação e diferenciação celular e prevenção da perda de células endoteliais.

O aumento da expressão de marcadores para fenótipo de células mesenquimais, positivos para α -SMA e vimentina juntamente com maior deposição de MEC, evidenciadas pela marcação de Col I e fibronectina no interstício renal e glomérulos, foi observado nesse estudo. Esses achados estão de acordo com trabalhos realizados previamente (ITO et al., 2013; LIM et al., 2021; SUN et al., 2016). A vimentina, um componente do citoesqueleto, é um marcador de transição mesenquimal que aparece quando não ocorre diferenciação, no caso de distúrbios no desenvolvimento renal ou no rim adulto, quando sofre a desdiferenciação celular após um insulto (DELUQUE et al., 2020). A α -SMA é também um filamento intermediário, que está relacionada com a ativação de fibroblastos para a produção de Col I (DUFFIELD, 2014). Juntos, a presença desses filamentos intermediários (desmina, α -SMA e vimentina) na lesão renal progressiva, caracterizam a EndoMT e a TEM. Em nossos resultados, observamos uma redução da marcação para essas proteínas e deposição da MEC evidenciando mais uma vez, o efeito anti-fibrótico da ativação do VDR mediado pelo paricalcitol na nefropatia induzida por ADR.

A lesão de proteínas estruturais também estão envolvidas na progressão da lesão renal, como por exemplo, a E-caderina, ZO-1 e claudinas, que são conhecidas por junções apertadas da camada de células epiteliais para criar uma barreira seletiva paracelular no glomérulo e nos túbulos (ZHANG; WU; SUN, 2013), e também estão envolvidas em mecanismos relacionados a TEM (DÍAZ-CORÁNGUEZ; LIU; ANTONETTI, 2019). Nesse trabalho, focamos nos mecanismos relacionados a ZO-1.

Essa proteína citoplasmática pode transmitir informações do estado e grau de contato célula-célula para o núcleo, ou seja, a ZO-1 consegue modular a progressão do ciclo celular fazendo o controle entre proliferação e diferenciação celular, a partir da interação com o ácido nucleico associado a ZO-1 (ZONAB) (DÍAZ-CORÁNGUEZ; LIU; ANTONETTI, 2019). ZONAB promove a expressão do gene do PCNA, promovendo a transição da fase G1 para a fase S (HE et al., 2018). Em nosso trabalho, a ZO-1 estava diminuída em animais do grupo ADR, o que demonstra esse prejuízo na manutenção celular, contribuindo ainda mais para a lesão de podócitos, já que a ZO-1 interage com proteínas diafragmáticas podocitárias para manter a estrutura e função de barreira dessas células (SAGAR et al., 2017) e lesão de células tubulares visto pela presença de células mesenquimais no espaço túbulo-intersticial. A perda da integridade celular e queda de ZO-1 pode gerar transcrições anormais de ZONAB, por deixar essa proteína livre para induzir transcrição de PCNA (RAGGI et al., 2014). O paricalcitol através da proteção da função e estrutura de células endoteliais e equilíbrio de fatores pró e antiangiogênicos, foi capaz de também fazer a manutenção dos podócitos, modulando o processo de albuminúria. Houve atenuação de PCNA no tecido renal de animais do grupo ADR + paricalcitol. Esse resultado vem de encontro com o anterior, demonstrando que a vit. D modula juntamente com a ZO-1, o processo de proliferação celular. Dados do nosso laboratório também mostram que o PCNA é atenuado pela vit. D, diminuindo a proliferação exacerbada de células mesenquimais e macrófagos (DE ALMEIDA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2022; SOUZA et al., 2023).

Estruturas tubulares, endoteliais e pericitos podem sofrer lesão mediada por ações que envolvem diretamente a proliferação de células decorrente de mediadores pró-fibróticos como TGF- β 1 (LIM et al., 2021), contribuindo para a progressão da lesão renal. O TGF- β 1 urinário é um forte indicativo de evolução da lesão renal, sendo este maior em pacientes HIV-positivo com albuminúria (MITCHELL et al., 2016). Nosso trabalho mostrou aumento do TGF- β 1 urinário nos animais que receberam injeção de ADR, assim como observado anteriormente (FALEIROS et al., 2017). Contudo, o tratamento com paricalcitol não alterou esse parâmetro.

O TGF- β 1 através da interação com Smad controla as vias que participam da fibrose na nefropatia induzida por ADR (CHANG et al., 2017), associadas com a expressão de Col I e fibronectina no tecido renal (MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Moléculas da família Smad estão envolvidas na sinalização *downstream* do

TGF- β 1 após sua fosforilação (MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Nossos dados mostraram que a sinalização de TGF- β 1/p-Smad_{2/3} foi regulada positivamente no tecido renal de animais do grupo ADR. Smad₂ e Smad₃ são mediadores da produção de MEC e ativação de miofibroblastos via TGF- β 1 (LIU et al., 2019b) ligando-se ao promotor de colágeno e induzindo a expressão de α -SMA em células epiteliais humanas de túbulo proximal (PARDALI et al., 2017). A ativação de Smad_{2/3} desencadeia a interação com ZEB2, um fator transcricional co-repressor relacionado com o processo de TEM (SOUZA et al., 2023). Este se liga diretamente aos genes codificadores de proteínas epiteliais, aumentando as características mesenquimais (TSUBAKIHARA; MOUSTAKAS, 2018). Nossos dados mostraram uma redução da expressão de ZEB2 no tecido de animais ADR + paricalcitol, associado com a diminuição do TGF- β tecidual. Tsai et al. (2019) demonstraram que a vit. D diminui a expressão de p-Smad₂/Smad₂ nas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) e, na cardiotoxicidade induzida por ADR, o que reduz a fibrose tecidual (TSAI et al., 2019). O VDR pode também interagir com Smad₃ reduzindo a TEM (XU et al., 2020). A menor ativação de TGF- β 1/Smad_{2/3}/ZEB2 pelo paricalcitol provocou a redução de células com fenótipo mesenquimal no presente estudo, o que estava associado com a menor fibrose túbulo-intersticial e deposição de MEC no tecido renal. Nossos dados corroboram com estudos feitos anteriormente, que demonstraram que a ativação de VDR estava relacionada com a regulação negativa de respostas transcricionais da ativação de TGF- β 1/Smad em genes pró-fibróticos e recrutamento de Smad₃, mecanismos que mostraram o feedback genômico de VDR/Smad para a regulação da identidade e função celular em modelo de fibrose hepática (DING et al., 2013). A redução de ZEB2 vista em nosso estudo pode ter atenuado a alta permeabilidade à albumina nos podócitos nos animais tratados com paricalcitol, demonstrando que esse fator pode ser alvo de mecanismos relacionados à progressão de doenças renais (INOTANI et al., 2022; NAKULURI et al., 2019; SOUZA et al., 2023).

A via TGF- β 1 também está relacionada ao receptor AT₁. O bloqueio do AT₁ na CE da valva mitral contribui para a redução da EndoMT pela diminuição da ativação do TGF- β 1/Smad (WYLIE-SEARS; LEVINE; BISCHOFF, 2014) e redução da ativação de SRA intrarrenal (YANG; XU, 2017). Esses efeitos também foram observados no nosso trabalho. A atenuação da expressão de AT₁, pode indicar a menor vasoconstrição refletida na TFG e na função endotelial, resultados da ativação do

VDR. A vit. D protege a microvasculatura e a perfusão tecidual, melhorando o fluxo sanguíneo capilar (LUNDWALL et al., 2015) e diminuindo a ativação do SRA e a expressão de seus componentes diretamente associados à via TGF- β 1/Smad na fibrose renal. A deleção ou redução da expressão de VDR, por outro lado, leva ao aumento da expressão renal de componentes do SRA e consequente hipertensão e fibrose tecidual (ANDERSEN et al., 2015; DE BRAGANÇA et al., 2018). Além do AT₁, a ADR induz a fosforilação das MAPKs (p38, JNK e ERK_{1/2}) (LI et al., 2019), o que pode estar associado com a perda de podócitos e proteinúria (NI et al., 2018). A sinalização das MAPKs é desencadeada por fatores de estresse mecânico e químico, em resposta a estímulos externos, o que leva a importantes contribuições na proliferação, diferenciação e apoptose celular (SUI et al., 2014; ZHOU et al., 2022). Vimos que as sinalizações de MAPKs estavam aumentadas no tecido de animais do grupo ADR em comparação aos controles. O paricalcitol por outro lado, foi capaz de atenuar essas alterações para p38, JNK e ERK_{1/2}, o que contribui para a melhora observada na função e estrutura renal. Estudos mostram esse papel regulador da vit. D ativa na atenuação da fosforilação de ERK_{1/2}, JNK e p38 (CHUNG et al., 2017; DE ALMEIDA et al., 2017; KIM et al., 2013), que pode refletir em redução de vias relacionadas com a proliferação celular (DE ALMEIDA et al., 2017).

Diversos estudos tem mostrado o efeito anti-inflamatório da vit. D. O acúmulo e migração de macrófagos em doenças renais estão associados a lesão funcional e estrutural (HUEN; CANTLEY, 2017). No nosso estudo foi observado que o paricalcitol atenua o acúmulo de macrófagos em todos os compartimentos avaliados dos animais do grupo ADR + paricalcitol, assim como atenua a secreção de citocinas e ativação de vias pró-inflamatórias. As expressões de TNF- α e IL-1 β estavam aumentadas em animais ADR, demonstrando a resposta da atividade pró-inflamatória causada por ADR em ratos. Em nosso estudo, o paricalcitol provavelmente exerceu seus efeitos anti-inflamatórios por aumentar os níveis de arginase I. Nos últimos anos, a arginase I tem sido associada a macrófagos reparadores associados com a proliferação de células tubulares após lesão aguda isquêmica (SHIN et al., 2022). Esses macrófagos denominados de M2 são reconhecidos por sua ação na resolução da resposta inflamatória. As diferentes isoformas da enzima arginase, tanto a II quanto a I, estão envolvidas com o endotélio para produzir óxido nítrico, mas também com o sistema imune. Enquanto a superexpressão da arginase II em macrófagos aumenta a

produção de citocinas pró-inflamatórias, a arginase I inibe e atenua a inflamação no tecido cardíaco (LI et al., 2022b). Em nosso estudo, observamos uma redução da arginase II e um aumento da arginase I nos animais tratados com paricalcitol em modelo de nefropatia induzida por ADR. Portanto, dos macrófagos imunolocalizados nos animais ADR + paricalcitol, parte deles possuem atividade anti-inflamatória e reparadora, mantendo o perfil M2 no tecido, atenuando a fibrose tecidual e modulando a resposta imune. No modelo de lesão renal aguda isquêmica também ocorre lesão do compartimento medular externo, onde os macrófagos produzem a arginase I localmente, embora os macrófagos também se acumulem na região cortical (SHIN et al., 2022), comprovando mais uma vez a interação de células tubulares e células inflamatórias em regiões onde ocorre a lesão de CE. Essa hipótese foi confirmada por Chang et al. (2022) que mostraram que o aumento da sinalização de Ang-2/Tie-2 em CE induz a maior infiltração de macrófagos e secreção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, como proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), α -SMA, deposição de colágeno e TGF- β . Esses autores mostraram que essas citocinas eram mais secretadas quando as CE eram expostas a Ang-2 independente da presença de Ang-1 e que diminuía quando a sinalização de Tie-2 era retirada, demonstrando a ação desse eixo para o recrutamento, migração e proliferação de macrófagos na lesão renal progressiva (CHANG et al., 2022). Em nosso trabalho, vimos uma diferença entre o grupo controle e paricalcitol para a arginase I. Isso reforça nossa hipótese de que a vit. D atenua o processo inflamatório quando o tecido está em lesão, do contrário, esses macrófagos não são recrutados para o tecido que está saudável e com menor ações pró-inflamatórias e fibróticas induzidas pela ADR e Ang-2. Em conjunto, reforçamos que o paricalcitol tem ação anti-inflamatória, evidenciada pela diminuição de macrófagos com perfil M1 e aumento do perfil M2.

A ativação de VDR suprime também a secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos através da regulação negativa de NF- κ B, além de diminuir a infiltração de células inflamatórias (WANG et al., 2014). Consta na literatura que a ativação das vias da MAPKs e NF- κ B estão envolvidas na resposta imune em modelo de nefrites, o que é modulado pela vit. D (LI et al., 2022a; WANG et al., 2014). Em nosso trabalho, não observamos diferenças na expressão de NF- κ B nos grupos tratados, embora as suas duas proteínas inibitórias I κ B α e I κ B β , que degradam e previne a translocação da subunidade p65 do NF- κ B para o núcleo (SUN, 2017), estavam diminuídas no

grupo pré-tratamento com paricalcitol, sugerindo portanto a ação da vit. D na modulação dessas vias mesmo que de forma indireta. Estudos mostraram o papel anti-inflamatório da vit. D ativa na redução da ativação de NF- κ B (LI et al., 2022a; XU et al., 2019) na ativação de TGF- β 1/Smad_{2/3}, mecanismo que contribui para a maior disponibilidade de Smad₇, o que aumenta a expressão e atividade de I κ B α , efeitos que contribuem para a redução do infiltrado de células inflamatórias no tecido renal (MENG et al., 2015; MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Nossos resultados podem indicar novos mecanismos do paricalcitol em reduzir o infiltrado de células inflamatórias e consequente processo inflamatório, no tecido renal no modelo de nefropatia induzida por ADR.

Ainda sobre parâmetros inflamatórios, analisamos a via SDF-1 α /CXCR4. Na nefropatia induzida por ADR ocorre a ativação de CXCR4 pela ligante SDF-1 α , que desencadeia maior fosforilação de ERK_{1/2} e ativação de β -Catenina para induzir a lesão podocitária e proteinúria (MO et al., 2022). Esse mecanismo molecular também pode ser visto no nosso trabalho, onde essas três proteínas (CXCR4, SDF-1 α e β -Catenina) estavam elevadas no tecido de animais do grupo ADR em relação aos controles, evidenciando novas vias independentes de TGF- β para a evolução das doenças proteinúricas. Não há muitos trabalhos que reportem a participação da vit. D e o receptor CXCR4. Um trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório, mostrou a diminuição desse receptor em animais tratados com calcitriol na lesão renal aguda (OLIVEIRA et al., 2022). Chang et al. (2021) e Oliveira et al. (2022) mostraram que após uma supressão de CXCR4 ocorre uma maior regeneração de células tubulares e menor disfunção endotelial (CHANG et al., 2021b; OLIVEIRA et al., 2022). Estes resultados somados aos dados de endotélio e fatores pró e antiangiogênicos, demonstram que o paricalcitol, contribui para vias importantes para a regeneração e preservação da célula endotelial, sendo um renoprotetor, diminuindo a toxicidade endotelial. O paricalcitol ainda foi capaz de modular a atividade de β -Catenina. A vit. D ativa contribui para a menor expressão de vias pró-fibróticas como a Wnt/ β -Catenina através da diminuição de glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β) e Snail, proteínas e fatores transcricionais que levam a TEM de podócitos e proteinúria (GUO et al., 2014), por interação física direta de VDR/ β -Catenina, reduzindo a β -Catenina nuclear e com isso, a proliferação celular (XU et al., 2020; ZHANG; WU; SUN, 2013). Evidências ainda apontam o papel da β -Catenina para o acúmulo de macrófagos na

fibrose cardíaca (METHATHAM et al., 2021) e ligantes Wnt induzidos por macrófagos e Ang-2 auxiliam em mecanismos pró-apoptóticos de CE renais (CHANG et al., 2022). Novamente, em nosso modelo podemos observar as ações diretas e indiretas do paricalcitol e interação entre CE e tubulares para reduzir mecanismos de inflamação e fibrose na lesão renal progressiva.

Em resumo, o presente estudo investigou os efeitos da ativação do VDR pelo paricalcitol na lesão renal progressiva induzida por ADR em ratos. Nossos resultados mostraram que o paricalcitol atenuou as alterações de função e estrutura renal. A ativação do VDR suprimiu a EndoMT e TEM por diferentes efeitos: (i) efeitos antiproteinúricos diretamente em podócitos e CE na barreira de filtração glomerular; (ii) manutenção da densidade capilar tecidual; (iii) fosforilação de eNOS e maior biodisponibilidade de NO; (iv) equilíbrio dos eixos das angiopoietinas/Tie-2 e VEGF/VEGFR2; (v) supressão da desdiferenciação celular e deposição de MEC; (vi) inibição da fosforilação de Smad_{2/3} e transcrição de ZEB2; (vii) redução de AT₁ intrarrenal; (viii) redução do processo inflamatório; (ix) inibição da ativação da via SDF-1 α /CXCR4/ β -Catenina; (x) reequilíbrio dos processos proliferativos. Todos os possíveis mecanismos envolvendo os efeitos pleiotrópicos da interação VDR/paricalcitol que foram vistos no presente estudo estão representados na Figura 21.

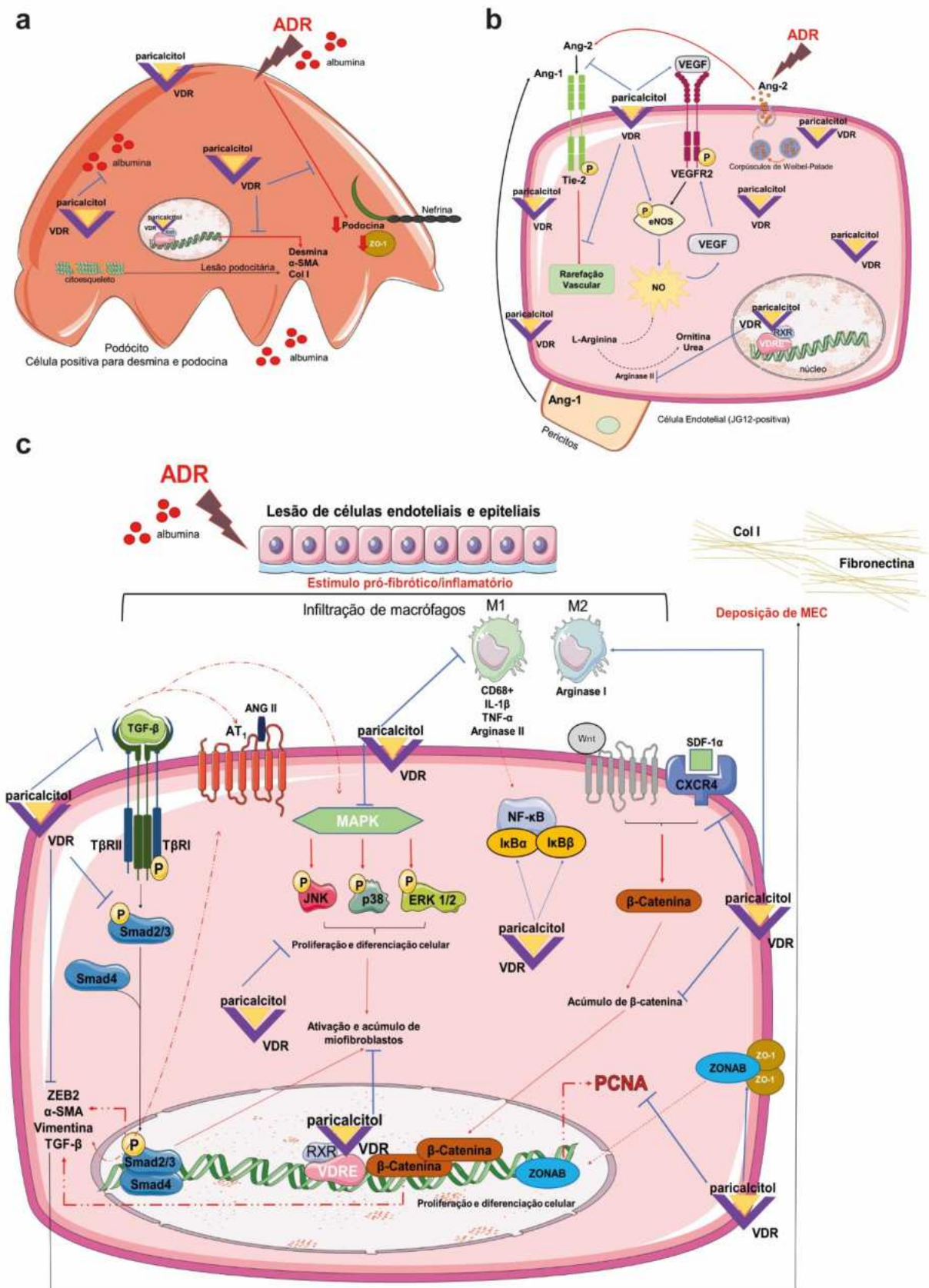


Figura 21 - Resumo gráfico dos possíveis mecanismos celulares da ativação do VDR na nefropatia induzida por ADR. (a). mecanismos relacionados a podócitos. A maior expressão e ativação do VDR pelo paricalcitol, atenua a lesão de podócitos induzida por ADR, inibindo processos de desestabilização celular, prevenindo lesão de citoesqueleto e deposição de MEC nos glomérulos. Neste caso, o excesso

de albumina também contribui para a lesão da barreira de filtração glomerular. (b). mecanismos relacionados as CE. A interação paricalcitol/VDR atenua a ativação do eixo Ang-2/Tie-2, inibindo a rarefação capilar tanto glomerular quanto peritubular. Adicionalmente, a ativação de VDR e maior interação de VEGF/VEGFR2 induzem a maior fosforilação de eNOS. Esses mecanismos, somado a inibição de arginase II resultam em maior disponibilidade de NO para o tecido renal. (c). mecanismos comuns relacionados a lesão renal progressiva induzida por ADR. A lesão de células epiteliais e CE induzidas pela ADR funcionam como sinal pró-inflamatório/fibrótico. O tratamento com paricalcitol diminui a ativação de TGF- β 1 dependente de Smad_{2/3}, desencadeando menor transcrição de ZEB2, expressão de marcadores mesenquimais (α -SMA, vimentina) e acúmulo de MEC (Col I e fibronectina). A redução desses mecanismos resulta na menor ativação de miofibroblastos. A menor expressão tecidual de TGF- β 1 também desencadeia diminuição de vias independentes de Smad, como a menor expressão de AT₁ e ativação de MAPKs (p-p38, p-JNK, p-ERK_{1/2}). A ativação de VDR diminui a expressão de macrófagos com perfil pró-inflamatórios (M1-CD68 positivos) e secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), ao passo que aumenta a expressão de macrófagos com perfil anti-inflamatório ou reparadores (M2, arginase I). A redução do infiltrado de células inflamatórias, reflete em maior expressão de I κ B α e I κ B β , que impedem a translocação de NF- κ B para o núcleo. Adicionalmente, a interação de SDF-1 α /CXCR4 também é menor, resultando em menor acúmulo de β -Catenina no tecido renal ou interação nuclear de VDR com β -Catenina, diminuindo também a deposição de MEC e proliferação celular. Outras vias podem estar envolvidas, como a Wnt. A ativação de VDR preserva a expressão de ZO-1 na célula, o que diminui a expressão de PCNA, devido a menor translocação de ZONAB para o núcleo, indicando maior estabilidade celular e manutenção da diferenciação e proliferação celular. A maior recuperação de VDR nucleares e citoplasmáticos, e disponibilidade de vitamina D intrarrenal contribuíram para a recuperação das alterações da função e estrutura renal observadas no modelo de nefropatia induzida por ADR. ADR, adriamicina. Ang-1, angiopoietina-1. Ang-2, angiopoietina-2. AT₁, receptor para angiotensina II (Ang II) tipo 1. CD68, grupo de diferenciação 68. CE, células endoteliais. Col I, colágeno 1. CXCR4, receptor tipo 4 de quimiocina C-X-C. eNOS, óxido nítrico sintase endotelial. eNOS, óxido nítrico sintase endotelial. IL-1 β , interleucina 1 beta. I κ B β , inibidor de fator nuclear-kappa B beta, I κ B α , inibidor de fator nuclear-kappa B alfa, JG12, aminopeptidase P. MAPK, proteínas ativadas por mitógeno. MEC, matriz extracelular. NF- κ B, fator nuclear-kappa B. NO, óxido nítrico. PCNA, antígeno nuclear de células em proliferação. p-ERK_{1/2}, proteína quinase regulado por sinal extracelular. p-JNK, c-Jun N-terminal quinase. p-p38, fosfo-p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). SDF-1 α , fator 1 derivado de células estromais. Smad, *small mothers against decapentaplegic*. TGF- β 1, fator de crescimento transformador beta 1. Tie-2, receptor tirosina quinase endotélio específico. TNF- α , fator de necrose tumoral alfa. VDR, receptor de vitamina D. VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. VEGFR2, receptor tipo 2 para fator de crescimento endotelial vascular. ZO-1, *zonula occludens*. ZONAB, ácido nucleico associado a ZO-1. RXR, receptor retinóide X. VDRE, elemento responsivo a vitamina D. α -SMA, alfa-actina de musculo liso.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Concluindo, o presente estudo fornece evidências da participação do VDR como um importante regulador da EndoMT e TEM em resposta ao início da lesão renal progressiva induzida por ADR. Nossos dados também enfatizam a importância da medula renal e dos capilares peritubulares na manutenção da função e estrutura renal. Os resultados sugerem que o paricalcitol pode ter um efeito potencialmente preventivo e terapêutico na proteção da função e estrutura renal frente a fibrose e inflamação, reduzindo a lesão de CE e epiteliais observadas na lesão renal precoce induzida por ADR.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABHINAND, C. S. et al. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 4, p. 347–354, 12 dez. 2016.
- ANDERSEN, L. B. et al. Vitamin D Depletion Aggravates Hypertension and Target-Organ Damage. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 2, 30 jan. 2015.
- ANDERSON, C. E. et al. The association of angiogenic factors and chronic kidney disease. **BMC Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 117, 21 dez. 2018.
- ANDRUKHOVA, O. et al. Vitamin D Is a Regulator of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Arterial Stiffness in Mice. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 1, p. 53–64, 1 jan. 2014.
- 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 Vitamin D Upregulates Endothelin-1, ETBR, eNOS mRNA Expression and Attenuates Vascular Remodelling and Ischemi. **Physiological Research**, p. S137–S147, 17 maio 2018.
- AUGUSTIN, H. G. et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 165–177, mar. 2009.
- BADRI, S. et al. Nephrotoxicity induced by vascular endothelial growth factor inhibitors. **Journal of Nephro pharmacology**, v. 11, n. 1, p. e4–e4, 6 out. 2021.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 4ª/2015 ed. [s.l.: s.n.].
- BERTANI, T. et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 46, n. 1, p. 16–23, jan. 1982.
- BERTANI, T. et al. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. **Kidney International**, v. 30, n. 4, p. 488–496, out. 1986.
- BERTRAM, E. **Nietzsche: Attempt at a Mythology**. Illinois: University of Illinois Press, , 2010.
- BIKLE, D. D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 3, p. 319–329, mar. 2014.
- BOENO, F. P. et al. Effects of Exercise Preconditioning on Doxorubicin-Induced Liver and Kidney Toxicity in Male and Female Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 10222, 16 jun. 2023.
- BOHNERT, B. N.; ARTUNC, F. Induction of Nephrotic Syndrome in Mice by Retrobulbar Injection of Doxorubicin and Prevention of Volume Retention by Sustained Release Aprotinin. **Journal of Visualized Experiments**, n. 135, 6 maio 2018.

BOUILLON, R.; BIKLE, D. Vitamin D Metabolism Revised: Fall of Dogmas. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 11, p. 1985–1992, 29 nov. 2019.

BOVER, J. et al. Vitamina D, receptor de la vitamina D e importancia de su activación en el paciente con enfermedad renal crónica. **Nefrologia**, v. 35, n. 1, p. 28–41, 2015.

BRYANT, C. et al. Adriamycin-Induced Nephropathy is Robust in N and Modest in J Substrain of C57BL/6. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 16 jun. 2022.

BUCCIARELLI E, BINAZZI R, SANTORI P, V. G. Nephrotic syndrome in rats due to adriamycin chlorhydrate. **Lav. Ist. Anat. Istol. Patol. Univ. Studi Perugia**, v. 36, n. 2, p. 53–69, 1976.

CHANG-CHIEN, C. et al. A large retrospective review of persistent proteinuria in children. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 117, n. 8, p. 711–719, ago. 2018.

CHANG, F.-C. et al. Angiotensin-2 Is Associated with Albuminuria and Microinflammation in Chronic Kidney Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e54668, 1 mar. 2013.

CHANG, F.-C. et al. Angiotensin-2 is associated with metabolic syndrome in chronic kidney disease. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 120, n. 12, p. 2113–2119, dez. 2021a.

CHANG, F.-C. et al. Angiotensin-2 inhibition attenuates kidney fibrosis by hindering chemokine C-C motif ligand 2 expression and apoptosis of endothelial cells. **Kidney International**, v. 102, n. 4, p. 780–797, out. 2022.

CHANG, H.-M. et al. FGF23 ameliorates ischemia-reperfusion induced acute kidney injury via modulation of endothelial progenitor cells: targeting SDF-1/CXCR4 signaling. **Cell death & disease**, v. 12, n. 5, p. 409, 17 abr. 2021b.

CHANG, X. et al. The antihelminthic phosphate niclosamide impedes renal fibrosis by inhibiting homeodomain-interacting protein kinase 2 expression. **Kidney International**, v. 92, n. 3, p. 612–624, set. 2017.

CHEN, S. et al. Urinary Angiotensin-2 Is Associated with Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

CHRONIC KIDNEY DISEASE WORK GROUP, KDIGO 2012 CLINICAL PRACTICE GUIDELINE FOR THE EVALUATION AND MANAGEMENT OF CHRONIC KIDNEY DISEASE, 2012. **Kidney International Supplements**, v. 3, n. 1, p. 2, jan. 2013.

CHUNG, S. et al. Treatment combining aliskiren with paricalcitol is effective against progressive renal tubulointerstitial fibrosis via dual blockade of intrarenal renin. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181757, 28 jul. 2017.

CORTINOVIS, M.; RUGGENENTI, P.; REMUZZI, G. Progression, Remission and Regression of Chronic Renal Diseases. **Nephron**, v. 134, n. 1, p. 20–24, 2016.

-
- DE ALMEIDA, L. F. et al. Calcitriol reduces kidney development disorders in rats provoked by losartan administration during lactation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11472, 13 dez. 2017.
- DE BRAGANÇA, A. C. et al. Vitamin D Deficiency Aggravates the Renal Features of Moderate Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Rats. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 10 out. 2018.
- DE MIK, S. M. et al. Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis: the role of animal models. **BMC Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 74, 1 dez. 2013.
- DELUQUE, A. L. et al. Effect of Calcitriol on the Renal Microvasculature Differentiation Disturbances Induced by AT1 Blockade During Nephrogenesis in Rats. **Frontiers in Medicine**, v. 7, 6 fev. 2020.
- DEMIR, F.; DEMIR, M.; AYGUN, H. Evaluation of the protective effect of paricalcitol and vitamin D 3 at doxorubicin nephrotoxicity in rats with 99m Technetium-dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy and biochemical methods. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 2, p. 274–283, 19 fev. 2021.
- DÍAZ-CORÁNGUEZ, M.; LIU, X.; ANTONETTI, D. A. Tight Junctions in Cell Proliferation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5972, 27 nov. 2019.
- DING, N. et al. A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 601–613, abr. 2013.
- DING, Z.-H. et al. Ameliorating Adriamycin-Induced Chronic Kidney Disease in Rats by Orally Administrated Cardiotoxin from *Naja naja atra* Venom. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- DUFFIELD, J. S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 6, p. 2299–2306, 2 jun. 2014.
- DYER, C. A. Safety and tolerability of paricalcitol in patients with chronic kidney disease. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 5, p. 717–728, 29 set. 2013.
- EBEFORS, K. et al. Endothelin receptor-A mediates degradation of the glomerular endothelial surface layer via pathologic crosstalk between activated podocytes and glomerular endothelial cells. **Kidney International**, v. 96, n. 4, p. 957–970, out. 2019.
- ECKARDT, K.-U. et al. Trends and perspectives for improving quality of chronic kidney disease care: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. **Kidney International**, v. 104, n. 5, p. 888–903, nov. 2023.
- EGIDO, J. et al. The pleiotropic effects of paricalcitol: Beyond bone-mineral metabolism. **Nefrología (English Edition)**, v. 36, n. 1, p. 10–18, jan. 2016.
- FALEIROS, C. M. et al. Effects of previous physical training on adriamycin nephropathy and its relationship with endothelial lesions and angiogenesis in the renal cortex. **Life Sciences**, v. 169, p. 43–51, jan. 2017.

-
- FENG, X. et al. Secular trends of epidemiologic patterns of chronic kidney disease over three decades: an updated analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. **BMJ Open**, v. 13, n. 3, p. e064540, 17 mar. 2023.
- FENG, Y. et al. Activation of TRPC6 by Ang II Induces Podocyte Injury and Participates in Proteinuria of Nephrotic Syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 3 ago. 2022.
- FERREIRA DE ALMEIDA, L. et al. Imbalance of Pro- and Anti-Angiogenic Factors Due to Maternal Vitamin D Deficiency Causes Renal Microvasculature Alterations Affecting the Adult Kidney Function. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1929, 16 ago. 2019.
- FOGO, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 76–87, 2 fev. 2015.
- FU, J. et al. Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 308, n. 4, p. F287–F297, 15 fev. 2015.
- GAO, K. et al. 5'-AMP-Activated Protein Kinase Attenuates Adriamycin-Induced Oxidative Podocyte Injury through Thioredoxin-Mediated Suppression of the Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1–P38 Signaling Pathway. **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 3, p. 460–471, mar. 2014.
- GEMBILLO, G. et al. Vitamin D and Glomerulonephritis. **Medicina**, v. 57, n. 2, p. 186, 22 fev. 2021.
- GENG, C. et al. Systematic Evaluations of Doxorubicin-Induced Toxicity in Rats Based on Metabolomics. **ACS Omega**, v. 6, n. 1, p. 358–366, 12 jan. 2021.
- GNUDI, L. et al. Vascular growth factors play critical roles in kidney glomeruli. **Clinical Science**, v. 129, n. 12, p. 1225–1236, 1 dez. 2015.
- GNUDI, L. Angiopoietins and diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v. 59, n. 8, p. 1616–1620, 20 ago. 2016.
- GRUNDMANN, M. et al. Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 303, n. 9, p. C954–C962, 1 nov. 2012.
- GU, Y.-Y. et al. Diverse Role of TGF- β in Kidney Disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 28 fev. 2020.
- GUO, J. et al. GSK-3 α and Vitamin D Receptor are Involved in β -Catenin and Snail Signaling in High Glucose-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Mouse Podocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 1087–1096, 2014.
- HAERTEIS, S. et al. Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice. **Acta Physiologica**, v. 224, n. 1, 25 set. 2018.
- HAMAR, P.; KERJASCHKI, D. Blood capillary rarefaction and lymphatic capillary neoangiogenesis are key contributors to renal allograft fibrosis in an ACE inhibition rat

model. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 311, n. 4, p. H981–H990, 1 out. 2016.

HAN, X. et al. Anti-proteinuria effect of antibody against ANGPTL3 coil-coiled domain on adriamycin-induced nephropathy in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 516, n. 3, p. 812–818, ago. 2019.

HARVEY, T. W.; ENGEL, J. E.; CHADE, A. R. Vascular Endothelial Growth Factor and Podocyte Protection in Chronic Hypoxia: Effects of Endothelin-A Receptor Antagonism. **American Journal of Nephrology**, v. 43, n. 2, p. 74–84, 2016.

HAUSSLER, M. R. et al. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 2, p. 77–98, 11 fev. 2013.

HE, H. et al. Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 10 jan. 2020.

HE, L. et al. Bradykinin potentially stimulates cell proliferation in rabbit corneal endothelial cells through the ZO-1/ZONAB pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, 22 mar. 2018.

HOLICK, M. F. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. **Annals of Epidemiology**, v. 19, n. 2, p. 73–78, fev. 2009.

HUA, W. et al. TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 11, p. 2103–2123, 10 jun. 2020.

HUEN, S. C.; CANTLEY, L. G. Macrophages in Renal Injury and Repair. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. 1, p. 449–469, 10 fev. 2017.

INOTANI, S. et al. Knockout of Zeb2 ameliorates progression of renal tubulointerstitial fibrosis in a mouse model of renal ischemia–reperfusion injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 37, n. 3, p. 454–468, 25 fev. 2022.

ITO, I. et al. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4579–4594, 1 nov. 2013.

JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J. The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 21, n. 5, p. 408–416, set. 2014.

JEON, S.-M.; SHIN, E.-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 4, p. 1–14, 16 abr. 2018.

JOURDE-CHICHE, N. et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 2, p. 87–108, 3 fev. 2019.

KAUR, G.; KRISHAN, P. Serotonin 5HT_{2A} receptor antagonism mediated anti-inflammatory and anti-fibrotic effect in adriamycin-induced CKD in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 7, p. 1269–1279, 28 jul. 2020.

-
- KAUR, J. et al. Cholecalciferol supplementation and angiogenic markers in chronic kidney disease. **PLOS ONE**, v. 17, n. 6, p. e0268946, 3 jun. 2022.
- KIDA, Y. Peritubular Capillary Rarefaction: An Underappreciated Regulator of CKD Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8255, 4 nov. 2020.
- KIM, C. S. et al. Paricalcitol Attenuates 4-Hydroxy-2-Hexenal-Induced Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63186, 17 maio 2013.
- KIM, D.-H. et al. Vitamin D and Endothelial Function. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 575, 22 fev. 2020.
- KOMENDA, P. et al. Cost-effectiveness of Primary Screening for CKD: A Systematic Review. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 5, p. 789–797, maio 2014.
- LEBLEU, V. S. et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1047–1053, 30 ago. 2013.
- LEE, V. W.; HARRIS, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 30–38, 23 jan. 2011.
- LI, A.-P. et al. Evaluation of Injury Degree of Adriamycin-Induced Nephropathy in Rats Based on Serum Metabolomics Combined with Proline Marker. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 7, p. 2575–2584, 2 jul. 2020.
- LI, W. et al. Total Extracts of *Abelmoschus manihot* L. Attenuates Adriamycin-Induced Renal Tubule Injury via Suppression of ROS-ERK1/2-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 233–7, 28 maio 2019.
- LI, X. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ ameliorates lupus nephritis through inhibiting the NF- κ B and MAPK signalling pathways in MRL/lpr mice. **BMC Nephrology**, v. 23, n. 1, p. 243, 8 dez. 2022a.
- LI, Z. et al. Arginase: shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, p. 413, 8 out. 2022b.
- LIM, J.-H. et al. Paricalcitol Improves Hypoxia-Induced and TGF- β 1-Induced Injury in Kidney Pericytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9751, 9 set. 2021.
- LIU, B.-C. et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 93, n. 3, p. 568–579, mar. 2018a.
- LIU, B. et al. Zhen-wu-tang ameliorates membranous nephropathy rats through inhibiting NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome. **Phytomedicine**, v. 59, p. 152913, jun. 2019a.
- LIU, J. et al. Slit2/Robo1 signaling is involved in angiogenesis of glomerular endothelial cells exposed to a diabetic-like environment. **Angiogenesis**, v. 21, n. 2, p. 237–249, 3 maio 2018b.

-
- LIU, W.-C. et al. Pleiotropic effects of vitamin D in chronic kidney disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 453, p. 1–12, jan. 2016.
- LIU, Y. et al. Global incidence and death estimates of chronic kidney disease due to hypertension from 1990 to 2019, an ecological analysis of the global burden of diseases 2019 study. **BMC Nephrology**, v. 24, n. 1, p. 352, 29 nov. 2023.
- LIU, Z.-H. et al. SIRT1 activation attenuates cardiac fibrosis by endothelial-to-mesenchymal transition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109227, out. 2019b.
- LOGANATHAN, K. et al. Angiotensin-1 deficiency increases renal capillary rarefaction and tubulointerstitial fibrosis in mice. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0189433, 2 jan. 2018.
- LUNDWALL, K. et al. Paricalcitol, Microvascular and Endothelial Function in Non-Diabetic Chronic Kidney Disease: A Randomized Trial. **American Journal of Nephrology**, v. 42, n. 4, p. 265–273, 2015.
- LV, W. et al. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 820, p. 65–76, fev. 2018.
- MAEDA, K. et al. CaMK4 compromises podocyte function in autoimmune and nonautoimmune kidney disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 8, p. 3445–3459, 1 ago. 2018.
- MANSOUR, S. G. et al. Angiotensin II as Prognostic Markers for Future Kidney Disease and Heart Failure Events after Acute Kidney Injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 33, n. 3, p. 613–627, mar. 2022.
- MARTIN-ROMERO, A. et al. Efecto de la administración de diferentes formas de vitamina D en la presión arterial y rigidez aórticas, y su implicación en la reducción de la albuminuria en la enfermedad renal crónica. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, jul. 2022.
- MARTÍNEZ-ARIAS, L. et al. Effects of calcitriol and paricalcitol on renal fibrosis in CKD. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 36, n. 5, p. 793–803, 26 abr. 2021.
- MARTÍNEZ-MIGUEL, P. et al. The active form of vitamin D, calcitriol, induces a complex dual upregulation of endothelin and nitric oxide in cultured endothelial cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 12, p. E1085–E1096, 15 dez. 2014.
- MATT, S.; HOFMANN, T. G. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 15, p. 2829–2850, 20 ago. 2016.
- MENG, X.-M. et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. **Frontiers in Physiology**, v. 6, 19 mar. 2015.
- MENG, X.-M.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; LAN, H. Y. Inflammatory processes in renal fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, n. 9, p. 493–503, 1 set. 2014.

MENG, X.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; LAN, H. Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 6, p. 325–338, 25 jun. 2016.

METHATHAM, T. et al. Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by a β -catenin/CBP inhibitor prevents heart failure by ameliorating cardiac hypertrophy and fibrosis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 14886, 21 jul. 2021.

MIAO, C. et al. Pro- and anti-fibrotic effects of vascular endothelial growth factor in chronic kidney diseases. **Renal Failure**, v. 44, n. 1, p. 881–892, 31 dez. 2022.

MIAO, Z. et al. CCR2 antagonism leads to marked reduction in proteinuria and glomerular injury in murine models of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0192405, 21 mar. 2018.

MITCHELL, B. I. et al. Elevation of Non-Classical (CD14⁺/lowCD16⁺⁺) Monocytes Is Associated with Increased Albuminuria and Urine TGF- β 1 in HIV-Infected Individuals on Stable Antiretroviral Therapy. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153758, 20 abr. 2016.

MO, H. et al. CXCR4 induces podocyte injury and proteinuria by activating β -catenin signaling. **Theranostics**, v. 12, n. 2, p. 767–781, 2022.

MU, H. et al. Ursolic acid prevents doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice through eNOS activation and inhibition of eNOS uncoupling. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 3, p. 2174–2183, mar. 2019.

NAKULURI, K. et al. Hypoxia induces ZEB2 in podocytes: Implications in the pathogenesis of proteinuria. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 6503–6518, 21 maio 2019.

NI, Y. et al. Plectin protects podocytes from adriamycin-induced apoptosis and F-actin cytoskeletal disruption through the integrin α 6 β 4/FAK/p38/MAPK pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 11, p. 5450–5467, 6 nov. 2018.

OLIVEIRA, B. M. et al. Calcitriol Reduces the Inflammation, Endothelial Damage and Oxidative Stress in AKI Caused by Cisplatin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15877, 14 dez. 2022.

PANIZO, S. et al. Vitamin D receptor activation, left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 11, p. 2735–2744, 1 nov. 2013.

PANIZO, S. et al. Regulation of miR-29b and miR-30c by vitamin D receptor activators contributes to attenuate uraemia-induced cardiac fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 11, p. 1831–1840, 1 nov. 2017.

PAPAZOVA, D. A. et al. Cell-based therapies for experimental chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **Disease Models & Mechanisms**, 1 jan. 2015.

PARDALI, E. et al. TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2157, 17 out. 2017.

- PIPPA, L. F. et al. Total, renal and hepatic clearances of doxorubicin and formation clearance of doxorubicinol in patients with breast cancer: Estimation of doxorubicin hepatic extraction ratio. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 185, p. 113231, jun. 2020.
- QIAO, J. et al. Preparation and renoprotective effects of carboxymethyl chitosan oligosaccharide on adriamycin nephropathy. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 347–356, dez. 2018.
- RAGGI, C. et al. Dedifferentiation and aberrations of the endolysosomal compartment characterize the early stage of nephropathic cystinosis. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 9, p. 2266–2278, 1 maio 2014.
- REIS, N. G. et al. Protective effect of calcitriol on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7090, 8 dez. 2019.
- REIS, N. G. et al. Maternal vitamin D deficiency affects the morphology and function of glycolytic muscle in adult offspring rats. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 13, n. 4, p. 2175–2187, 18 ago. 2022.
- RENU, K. et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 241–253, jan. 2018.
- ROSSING, P. et al. KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. **Kidney International**, v. 102, n. 5, p. S1–S127, nov. 2022.
- RUSSO, E. R. et al. Oral administration of powdered dried rhizomes of *Curcuma longa* L. (turmeric, Zingiberaceae) is effective in the treatment of doxorubicin-induced kidney injury in rats. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 12, p. 2408–2416, dez. 2018.
- SAGAR, A. et al. Targeting Neph1 and ZO-1 protein-protein interaction in podocytes prevents podocyte injury and preserves glomerular filtration function. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12047, 21 set. 2017.
- SALANOVA VILLANUEVA, L. et al. Efecto regulador de paricalcitol sobre parámetros inflamatorios, fibróticos y anticalcificantes en el paciente con enfermedad renal crónica. Más allá de la regulación de la enfermedad óseo-mineral. **Nefrología**, v. 40, n. 2, p. 171–179, mar. 2020.
- SHIN, N. S. et al. Arginase-1 Is Required for Macrophage-Mediated Renal Tubule Regeneration. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 33, n. 6, p. 1077–1086, jun. 2022.
- SIMIC, I.; TABATABAEIFAR, M.; SCHAEFER, F. Animal models of nephrotic syndrome. **Pediatric Nephrology**, v. 28, n. 11, p. 2079–2088, 19 nov. 2013.
- SIMONS, M.; GORDON, E.; CLAESSION-WELSH, L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 10, p. 611–625, 27 out. 2016.
- SINGH, S. et al. Tubular Overexpression of Angiopoietin-1 Attenuates Renal Fibrosis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0158908, 25 jul. 2016.

SOUZA, C. S. et al. Vitamin D deficiency contributes to the diabetic kidney disease progression via increase ZEB1/ZEB2 expressions. **Nutrition & Diabetes**, v. 13, n. 1, p. 9, 1 jul. 2023.

STERNBERG, S. S. Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 23, n. 1, p. 39–51, jul. 1970.

SUI, X. et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. **Cancer Letters**, v. 344, n. 2, p. 174–179, mar. 2014.

SUN, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 545–558, 5 set. 2017.

SUN, Y. B. Y. et al. Glomerular Endothelial Cell Injury and Damage Precedes That of Podocytes in Adriamycin-Induced Nephropathy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55027, 24 jan. 2013.

SUN, Y. B. Y. et al. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. **Differentiation**, v. 92, n. 3, p. 102–107, set. 2016.

SURESHBABU, A.; MUHSIN, S. A.; CHOI, M. E. TGF- β signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 310, n. 7, p. F596–F606, 1 abr. 2016.

TAN, L. et al. Exploring protective effect of Glycine tabacina aqueous extract against nephrotic syndrome by network pharmacology and experimental verification. **Chinese Medicine**, v. 15, n. 1, p. 79, 1 dez. 2020.

TANG, P. M.-K.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; LAN, H.-Y. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 3, p. 144–158, 28 mar. 2019.

TOMINO, Y. Pathogenesis and Treatment of Chronic Kidney Disease: A Review of Our Recent Basic and Clinical Data. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 39, n. 5, p. 450–489, 2014.

TSAI et al. Calcitriol Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction and Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Mice. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 865, 9 ago. 2019.

TSUBAKIHARA, Y.; MOUSTAKAS, A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3672, 20 nov. 2018.

VAN MEURS, M. et al. Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness – a future target? **Critical Care**, v. 13, n. 2, p. 207, 2009.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, jan. 2017.

WALLACE, K. B.; SARDÃO, V. A.; OLIVEIRA, P. J. Mitochondrial Determinants of

Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **Circulation Research**, v. 126, n. 7, p. 926–941, 27 mar. 2020.

WANG, C. et al. Simvastatin ameliorates renal lipidosis through the suppression of renal CXCL16 expression in mice with adriamycin-induced nephropathy. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 12, p. 15696–707, 2015.

WANG, N. et al. Treatment with irbesatan may improve slit diaphragm alterations in rats with adriamycin-induced nephropathy. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 17, n. 2, p. 147032031664688, 1 abr. 2016.

WANG, Q. et al. Vitamin D Inhibits COX-2 Expression and Inflammatory Response by Targeting Thioesterase Superfamily Member 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11681–11694, abr. 2014.

WONG, D. W. L. et al. Activated renal tubular Wnt/ β -catenin signaling triggers renal inflammation during overload proteinuria. **Kidney International**, v. 93, n. 6, p. 1367–1383, jun. 2018.

WU-WONG, J. R.; LI, X.; CHEN, Y. Different vitamin D receptor agonists exhibit differential effects on endothelial function and aortic gene expression in 5/6 nephrectomized rats. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, p. 202–209, abr. 2015.

WU, J. et al. Losartan protects against intermittent hypoxia-induced peritubular capillary loss by modulating the renal renin–angiotensin system and angiogenesis factors. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 1, p. 38–48, 1 dez. 2019.

WU, Q. et al. Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111308, maio 2021.

WU, X. et al. Artemisinin ameliorated proteinuria in rats with adriamycin-induced nephropathy through regulating nephrin and podocin expressions. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34, n. 1, p. 63–68, fev. 2014.

WYATT, C. M. Kidney Disease and HIV Infection. **Topics in antiviral medicine**, v. 25, n. 1, p. 13–16, 2017.

WYLIE-SEARS, J.; LEVINE, R. A.; BISCHOFF, J. Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor- β -induced phosphorylation of ERK. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 4, p. 870–875, abr. 2014.

XIE, K. et al. Yes-associated protein regulates podocyte cell cycle re-entry and dedifferentiation in adriamycin-induced nephropathy. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 12, p. 915, 4 dez. 2019.

XU, F. et al. Salidroside inhibits MAPK, NF- κ B, and STAT3 pathways in psoriasis-associated oxidative stress via SIRT1 activation. **Redox Report**, v. 24, n. 1, p. 70–74, 1 jan. 2019.

XU, S. et al. Calcitriol inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma cells by suppressing Smad2/3-, STAT3- and β -catenin-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Science**, v. 111, n. 1, p. 59–71, 4 jan. 2020.

XU, Y. et al. Matrine ameliorates adriamycin-induced nephropathy in rats by enhancing renal function and modulating Th17/Treg balance. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, p. 491–501, nov. 2016.

YANG, S. H. et al. Active maintenance of endothelial cells prevents kidney fibrosis. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 36, n. 4, p. 329–341, 31 dez. 2017.

YANG, T.; XU, C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 1040–1049, abr. 2017.

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. **Journal of Molecular Histology**, v. 49, n. 2, p. 219–228, 13 abr. 2018.

YUAN, Q.; TANG, B.; ZHANG, C. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 182, 9 jun. 2022.

ZHANG, A. et al. Role of VEGF-A and LRG1 in Abnormal Angiogenesis Associated With Diabetic Nephropathy. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 31 ago. 2020.

ZHANG, Y. et al. Vitamin D receptor (VDR) on the cell membrane of mouse macrophages participates in the formation of lipopolysaccharide tolerance: mVDR is related to the effect of artesunate to reverse LPS tolerance. **Cell Communication and Signaling**, v. 21, n. 1, p. 124, 29 maio 2023.

ZHANG, Y.; WU, S.; SUN, J. Vitamin D, vitamin D receptor and tissue barriers. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 1, p. e23118, jan. 2013.

ZHONG, W. et al. Activation of vitamin D receptor promotes VEGF and CuZn-SOD expression in endothelial cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, p. 56–62, mar. 2014.

ZHOU, Y. et al. Verbena Attenuates Adriamycin-Induced Renal Tubular Injury via Inhibition of ROS-ERK1/2-NLRP3 Signal Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–11, 28 set. 2022.

ZHU, Y. et al. P2X7R antagonist protects against renal injury in mice with adriamycin nephropathy. 2022.

ZOCCALI, C. et al. Paricalcitol and Endothelial Function in Chronic Kidney Disease Trial. **Hypertension**, v. 64, n. 5, p. 1005–1011, nov. 2014.

ZOJA, C.; ABBATE, M.; REMUZZI, G. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 5, p. 706–712, 1 maio 2015.

Apêndice

APÊNDICE A - Artigo publicado na revista *Nutrients*



Article

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

Amanda Lima Deluque ^{1,*}, Beatriz Magalhães Oliveira ¹, Cláudia Silva Souza ¹, Ana Lívia Dias Maciel ¹, Heloísa Della Coletta Francescato ¹, Cleonice Giovanini ¹, Lucas Ferreira de Almeida ¹, Francisco José Albuquerque de Paula ², Roberto Silva Costa ³, José Antunes-Rodrigues ⁴ and Terezila Machado Coimbra ^{1,*}

¹ Laboratory of Renal Physiology, Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14040-900, SP, Brazil

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

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

⁴ Laboratory of Neuroendocrinology, Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14040-900, SP, Brazil

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



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

Academic Editor: Sonia Saad

Received: 5 November 2022
Accepted: 8 December 2022
Published: 14 December 2022

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



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

Abstract: Renal endothelial cell (EC) injury and microvascular dysfunction contribute to chronic kidney disease (CKD). In recent years, increasing evidence has suggested that EC undergoes an endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT), which might promote fibrosis. Adriamycin (ADR) induces glomerular endothelial dysfunction, which leads to progressive proteinuria in rodents. The activation of the vitamin D receptor (VDR) plays a crucial role in endothelial function modulation, cell differentiation, and suppression of the expression of fibrotic markers by regulating the production of nitric oxide (NO) by activating the endothelial NO synthase (eNOS) in the kidneys. This study aimed to evaluate the effect of paricalcitol treatment on renal endothelial toxicity in a model of CKD induced by ADR in rats and explore mechanisms involved in EC maintenance by eNOS/NO, angiopoietins (Angs)/endothelium cell-specific receptor tyrosine kinase (Tie-2, also known as TEK) and vascular endothelial growth factor (VEGF)-VEGF receptor 2 (VEGFR2) axis. The results show that paricalcitol attenuated the renal damage ADR-induced with antiproteinuric effects, glomerular and tubular structure, and function protection. Furthermore, activation of the VDR promoted the maintenance of the function and structure of glomerular, cortical, and external medullary endothelial cells by regulating NO production. In addition, it suppressed the expression of the mesenchymal markers in renal tissue through attenuation of (transforming growth factor-beta) TGF- β 1/Smad2/3-dependent and downregulated of Ang-2/Tie-2 axis. It regulated the VEGF/VEGFR2 pathway, which was ADR-deregulated. These effects were associated with lower AT1 expression and VDR recovery to renal tissue after paricalcitol treatment. Our results showed a protective role of paricalcitol in the renal microvasculature that could be used as a target for treating the beginning of CKD.

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

1. Introduction

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

Different types of cells are involved in kidney fibrosis, with fibroblasts as one of the primary mediators of this process. These fibroblasts may originate from the proliferation of resident fibroblasts, recruitment via bone marrow differentiation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and pericytes [2,3]. Additionally, new evidence has demonstrated the role of endothelial cells (EC) in this process [4]. EC may undergo an endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT), which can contribute to about 10% of the origin of these interstitial fibroblasts in response to many molecules, such as transforming growth factor-beta (TGF- β 1) [2]. Furthermore, studies have shown a decrease in the endothelial surface layer (ESL) thickness, which triggers albuminuria in adriamycin-induced injury (ADR) [5]. Glomerular EC dysfunction initiates the development and progression of glomerulopathy. These findings indicate that EC alterations precede podocyte injury [6]. The ADR-induced nephropathy model in rodents is considered one of the most used to mimic focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and nephrotic syndrome (NS), characterized by renal dysfunction, glomerular fibrosis resulting in progressive albuminuria [7], and inflammation in the tubulointerstitial compartment due to the reabsorption of filtered proteins [8].

In healthy kidneys, the balance between pro- and anti-angiogenic factors is essential to renal vascular homeostasis. However, in CKD, this balance is interrupted [9,10], resulting in microvessel loss due to the anti-angiogenic environment, a process known as vascular rarefaction [11]. Angiopoietins (Ang-1 and Ang-2), a family of vascular growth factors, play a significant role in kidney vasculature homeostasis. The binding of Ang-1 to endothelium cell-specific receptor tyrosine kinase (Tie-2, also known as TEK) presents anti-inflammatory and pro-angiogenic activities, whereas Ang-2 has opposite effects. Angs are related to renovascular growth in parallel with vascular endothelial growth factor (VEGF), with roles in endothelial differentiation and survival [12], associated with endothelial repair capacity, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and the availability of nitric oxide (NO) [5]. In the ADR model, downregulation of the eNOS phosphorylation contributes to endothelial dysfunction in the heart, resulting in vascular endothelial dysfunction [13]. Therefore, a better understanding of EC participation at the beginning of the pathogenesis of progressive kidney injury may contribute to developing new therapeutic approaches.

Some evidence has proposed a potential therapeutic role of vitamin D (vit. D) in CKD [14–16]. Paricalcitol (19-nor-1,25-hydroxyvitamin D₂), an analog of calcitriol, and vit. D receptor activators (VDRA) can prevent parathyroid hormone (PTH) secretion and secondary hyperparathyroidism (SHPT) in CKD [17]. Many clinical studies have shown the effects of paricalcitol therapy to attenuate CKD, indicated by efficiency and safety in PTH levels and calcium-phosphorus regulation, and in the reduction in the proteinuria progression when associated with renin-angiotensin system (RAS) blocker in a non-SHPT CKD [18]. RAS activation in renal tissue can be associated with TGF- β 1 expression. The VDR activation suppresses these effects, attenuating EndoMT by regulation of the angiotensin II (AngII) signaling through the AngII type I receptor (AT1) [19]. A previous study has reported that paricalcitol improves hypoxia-induced injury in pericytes on kidney fibrosis by the TGF- β 1/small mothers against decapentaplegic (Smad) pathway and α -smooth-muscle-actin (α -SMA) [20]. VDR activation from paricalcitol ameliorates EC function in 5/6 nephrectomy, independent of PTH levels, and can improve aortic relaxation [21]. Martínez-Miguel et al. [22] have observed that EC treated with vit. D significantly increased NO production by eNOS bioactivity. Strategies to maintain the integrity of ECs with higher NO bioavailability can reduce or prevent kidney injury. In the current literature, little is known about the vit. D effect on endothelial markers, such as Tie-2, Ang-1, and Ang-2 in the ADR-induced nephropathy, even though it has the glomerular EC as a target. Anti-angiogenic factors deficiency, such as thrombospondin-1 and Ang-2, improves proteinuria and renal structure [23–25]. Furthermore, the protective effects of vit. D are supported by our previous work showing that the lack of vit. D during renal development generated glomerular and peritubular capillary rarefaction due to an increased expression of Ang-2 and decreased expression of the renal axes Ang-1/Tie-2, VEGF/VEGFR2, and eNOS/NO, which cause disturbances in EC differentiation

in adulthood [11] while vit. D supplementation increases eNOS and VEGF in unilateral ureteral obstruction (UUO) [26]. Thus, the literature supports the link between vit. D and their effects on endothelial function, and a deficiency in serum vit. D levels has been associated with kidney endothelium dysfunction.

The present work aimed to evaluate the effect of paricalcitol treatment on renal endothelial toxicity in a model of CKD induced by ADR in rats and elucidate two potential mechanisms involved in EC maintenance: Angs/Tie-2 and VEGF/VEGFR2.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Experimental Design

The ethical principles were performed in all experiments for animal experimentation of the Brazilian College of Animal Experimentation, and the Animal Experimentation Committee of the University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School approved the study protocol (COBEA/CETEA/FMRP-USP, protocol no. 194/2017). The animals were housed in a controlled temperature (22 °C) environment and exposed to a 12 h light/12 h dark cycle. They were provided with a chow diet and water ad libitum. Male Sprague-Dawley (180–200 g) were randomly selected for this study.

Paricalcitol (6 ng/day, Zemplar[®], Abbvie Laboratories, North Chicago, IL, USA) and vehicle (0.9% NaCl solution) were administered through a mini osmotic pump (Model 2004, Alzet, Cupertino, CA, USA) implanted in the back of the animal. This dose was selected according to the previously described [27]. Paricalcitol treatment started two days before adriamycin (ADR) administration and continued throughout the observation for 27 days, allowed by the mini osmotic pump model approach. In this case, 48 h after the procedure, the animals received an intravenous (i.v.) injection of ADR (Doxorubicin Hydrochloride/Fauldoxo[®], Libbs, Brazil = 3.5 mg/kg) or vehicle through the tail vein as described previously [28] (Figure 1). The animals were divided into 4 experimental groups: Control ($n = 6$) being the rats that received the vehicle, paricalcitol ($n = 6$) being the rats that received paricalcitol and i.v. of the vehicle, ADR ($n = 7$) being the rats that received i.v. of the adriamycin, and ADR + paricalcitol ($n = 7$) being the rats that received paricalcitol and i.v. of the adriamycin.

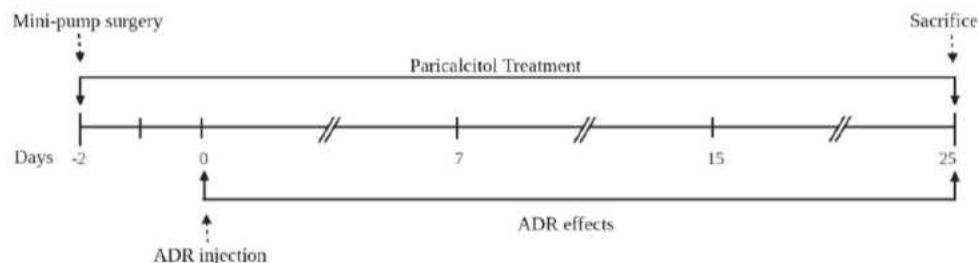


Figure 1. The schematic representation of study design. Male Sprague-Dawley rats underwent mini osmotic pump implanted surgery paricalcitol content two days before ADR administration and continued throughout the observation for 27 days. The animals were divided into 4 experimental groups: Control ($n = 6$): rats that received the vehicle; paricalcitol ($n = 6$): rats that received paricalcitol and i.v. of the vehicle; ADR ($n = 7$): rats that received i.v. of adriamycin, and ADR + paricalcitol ($n = 7$): rats that received paricalcitol and i.v. of the adriamycin.

2.2. Evaluation of Renal Function

The rats were housed in metabolic cages for 24-h urine sample collection on the 7th, 15th, and 25th days after ADR injection. These samples were stored at -20 °C until used for measuring progressive urinary albumin excretion (UAE) using the ELISA method with rat anti-albumin antibody (Bethyl Laboratories, Lab Research, Montgomery, TX, USA) and urinary creatinine using a commercial kit (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brazil).

Furthermore, on the 25th day after ADR injection, we collected 24-h urine to measure urine volume, sodium (9180-electrolyte analyzer, Roche, Wien, Austria), creatinine (using a commercial kit Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brazil), and NO levels. On the 26th day, the rats were weighed and then anesthetized using ketamine/xylazine (0.1 mL/100 g, Cristália, Itapira, Brazil). The blood samples (plasma and serum) were collected from the abdominal artery and stored at -70°C . Plasma was used to analyze creatinine to calculate the glomerular filtration rate (GFR), sodium to perform fractional sodium excretion (FENa), NO levels, and calcium and phosphorus concentrations. Levels of 25 hydroxyvitamin D (25 OHD) and PTH were measured in serum samples. The urine samples were collected directly from the urinary bladder at the time of euthanasia, treated with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma Chemical Company, St. Louis, MS, USA), and were stored at -70°C until analysis for TGF- β 1 levels. Kidneys were removed. One was fixed using methacarn solution for histological and immunohistochemical analyses, and the other was stored at -70°C for ELISA and Western blot analyses.

2.3. Serum 25 Hydroxyvitamin D (25 OHD) Levels, Serum Parathyroid Hormone (PTH), Plasma Calcium (P_{Ca}), and Phosphorus (P_P) Levels Measurement

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. The PTH levels were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method with intact rat anti-PTH (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA), and plasma calcium and phosphorus levels were measured using commercial kits (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brazil).

2.4. NO in Urine, Plasma, and Renal Tissue Measurement

Samples of urine from the 25th day of the experiment, plasma, and renal tissue samples, were mixed/homogenized with 0.1 N acetic acid (3:1), centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min, and aliquoted. Only the kidney tissues were deproteinized with 95% ethanol (4°C) (1:2) and centrifuged ($4000 \times g$ for 5 min) again. The supernatants of urine, plasma, and kidney tissue were subjected to an analysis of NO content using the NO/ozone technique described previously with a Sievers analyzer (Sievers 280 NOA, Frederick, CO, USA) [27]. As described in previous studies, the Bradford method was used to determine protein levels in renal tissue [27]. The median NO values are expressed in $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein in the renal tissue and $\mu\text{g}/\text{mg}$ of plasma or urine creatinine.

2.5. TGF- β 1 Measurement

Samples of urine taken from the bladder and renal tissue were used to quantify the transforming growth factor (TGF)- β 1 content by ELISA (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The results were expressed as pg/mg of creatinine or pg/mg of protein. As described in previous studies, the Bradford method was used to determine protein levels in renal tissue [27].

2.6. Histological Analysis

Kidney tissues were embedded in paraffin, sliced into 4- μm -thick slices, stained with Masson's Trichrome (MT), and visualized using a light microscope (AxioVision Rel. 4.3; Zeiss, Oberkochen, Germany). In this case, 20 consecutive 0.1 mm^2 fields of the cortex and 20 consecutive 0.1 mm^2 fields of the outer medullary compartment were evaluated. Cortical and medullary tubulointerstitial MT expression was quantified using the NIH Image J software 1.52A (Bethesda, MD, USA), and mean values per kidney were calculated. Images are taken and quantified at high magnification ($400\times$). The results were expressed as a percentage of fibrosis in the cortex and medullary compartment.

2.7. Immunohistochemical Analysis

The kidney sections were deparaffinized and hydrated for immunohistochemical analysis. Non-specific antigen binding was blocked by incubation for 20 min with normal goat serum. The sections were then incubated with anti-aminopeptidase P (JG12, BMS1104, 1:500, eBioScience, San Diego, CA, USA) for 60 min at room temperature, anti-vimentin (M0725, 1:50, Dako Corporation, Glostrup, Denmark), anti- α -smooth-muscle-actin (α -SMA [M0851, 1:50, Dako Corporation, Glostrup, Denmark]), anti-collagen I (Col I [AB755, 1/1200, Chemicon, Chicago, IL, USA]) and anti-desmin (M0760, 1/50, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) antibodies overnight at 4 °C. Avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) and DAB (3,3'-diaminobenzidine [Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA]) were used for detection. The sections were then counterstained with methyl green, dehydrated, and mounted. Images are taken and quantified at high magnification (400 \times).

In this case, 30 consecutive 0.1 mm² fields from the cortex and 20 consecutive 0.1 mm² fields from the outer medullary compartment were evaluated for the JG12, α -SMA, vimentin, and Col I. Here, 30 cortical and 20 juxtamedullary glomeruli were evaluated for JG12, α -SMA, Col I, and desmin. Cortical and medullary tubulointerstitial changes were quantified using the NIH Image J software (Bethesda, MD, USA), and mean values per kidney were calculated. The results were expressed as a percentage of the positive cell in the glomerulus, cortex, and outer medulla.

2.8. Western Blot Analysis

The renal tissues were homogenized in a lysis buffer (50 mM Tris_HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; 1 μ g/mL aprotinin; 1 μ g/mL leupeptin; 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride; 1 mM sodium orthovanadate, pH 10; 1 mM sodium pyrophosphate; 25 mM sodium fluoride; 0.001 M EDTA, pH 8) and centrifuged at 4 °C at 10,000 rpm. The proteins (30, 60 μ g, or 90 μ g) were separated by polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, incubated for one h in blocking buffer (TBS, 5% skim milk) or 3% BSA, washed in buffer (TBS, 0.1% Tween 20, pH 7.6) and then incubated with anti-phospho-endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS, sc-12972, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS, sc-376751, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti- α -smooth-muscle-actin (α -SMA, M0851, 1:300, Dako Corporation, Glostrup, CPH, Denmark); anti-vimentin (M0725, 1:1000, Dako Corporation, Glostrup, CPH, Denmark); anti-phospho-small mothers against decapentaplegic 2/3 (p-Smad2/3, 8828S, 1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); anti-small mothers against decapentaplegic 2/3 (Smad2/3, sc-133098, 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-endothelium cell-specific receptor tyrosine kinase (Tie-2, sc-293414, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-angiopoietin 1 (Ang-1, bs-0800R, 1:500, Bioss Antibodies Inc., Woburn, MA, USA); anti-angiopoietin 2 (Ang-2, sc-74402, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-vascular endothelial growth factor (VEGF, sc-53462, 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2, cod. 2472S, 1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); anti-vitamin D receptor (VDR, sc-13133, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); or anti-angiotensin II receptor type-1 (AT1, sc-515884, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibodies overnight at 4 °C. Membranes were incubated with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) monoclonal antibody (cod. 2118L, 1:1000; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) overnight at 4 °C as a loading control. The membranes were then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (P0448, 1:5000; Dako Corporation, Glostrup, CPH, Denmark), anti-rabbit (P0447, 1:2000, 1:5000 or 1:10,000; Dako Corporation, Glostrup, CPH, Denmark), or anti-goat (sc-2768, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibodies for 1 h at room temperature. An imaging system (Kodak Gel Logic 2200, Austin, TX, USA) visualized the membrane-bound antibodies using enhanced chemiluminescence

(ECL) reagents (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The band intensity was quantified by densitometry using ImageJ NIH image software 1.52A (<http://www.nih.gov>, accessed on 1 March 2021) and was reported in arbitrary units. As described in previous studies, protein quantitation was performed using the Bradford method [27].

2.9. Statistical Analysis

The Nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test, was used to analyze non-normally distributed data. The data of renal tissue TGF- β 1 were transformed into \log_e to obtain a normal distribution. An analysis of variance followed by the Newman-Keuls multiple comparisons test was used to analyze normally distributed data by the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The data were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). A p of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The ADR presented a significantly decreased body mass at 27 days of the experiment compared to the paricalcitol group. The ADR + paricalcitol also presented a significant reduction in body weight compared to the paricalcitol group (Table 1).

Table 1. Body weight, 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, plasma calcium concentration, plasma phosphorus concentration, 24-h urine volume, glomerular filtration rate, and fractional excretion of sodium at the end of the experiment in the control, paricalcitol, ADR, and ADR + paricalcitol groups.

	Control	Paricalcitol	ADR	ADR + Paricalcitol
Body Weight (g)	402 \pm 21.70	451 \pm 17.30	392 \pm 11.90 #	354 \pm 12.70 ###
25 OHD (ng/mL)	29 \pm 3.28	34 \pm 1.96	28 \pm 2.19	31 \pm 1.39
PTH (pg/mg)	177 \pm 22.40	180 \pm 36.40	288 \pm 29.50	270 \pm 35.70
P _{Ca} (mg/dL)	9.1 \pm 0.27	9.4 \pm 0.5	9.1 \pm 0.33	9.5 \pm 0.24
P _P (mg/dL)	7.0 \pm 0.46	6.7 \pm 0.33	7.1 \pm 0.23	7.6 \pm 0.20
Urine volume (mL 100 g ⁻¹ 24 h ⁻¹)	5.1 \pm 1.57	10.4 \pm 2.24	8.3 \pm 1.26	9.5 \pm 1.03
GFR (ml min ⁻¹ 100 g ⁻¹)	0.3 \pm 0.04	0.4 \pm 0.03	0.2 \pm 0.02 #	0.4 \pm 0.01 \$
FE _{Na} (%)	0.3 \pm 0.02	0.2 \pm 0.02	0.3 \pm 0.03 #	0.2 \pm 0.01 \$

The data are expressed as mean \pm SEM. $n = 5-7$ for each group. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. paricalcitol; \$ $p < 0.05$ vs. ADR. 25OHD, 25-hydroxyvitamin D; PTH, parathyroid hormone; P_{Ca}, plasma calcium concentration; P_P, plasma phosphorus concentration; GFR, glomerular filtration rate; FE_{Na}, fractional sodium excretion.

Differences in the 25 OHD, PTH, P_{Ca}, and P_P levels in control, paricalcitol, ADR, and ADR + paricalcitol groups were not found (Table 1).

3.1. Paricalcitol Improved ADR-Induced Kidney Dysfunction

Differences in urinary volume were not observed (Table 1). The UAE level on the 7th day after ADR injection was significantly increased in rats of the ADR group compared to the control (Figure 2a). On the 15th and 25th days after injection, this parameter was significantly higher in the ADR group than the control and paricalcitol groups (Figure 2b,c). The ADR + paricalcitol group had attenuation of this change on the 25th after the ADR injection, present significantly decreased compared to the ADR group (Figure 2c). Animals from the ADR group significantly reduced the GFR and increased FE_{Na} compared with the paricalcitol group. These alterations were less intense in the ADR + paricalcitol group than in the ADR group (Table 1).

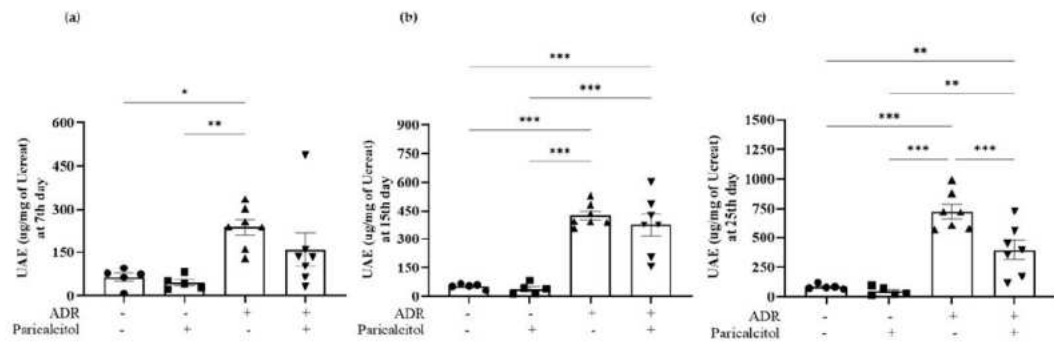


Figure 2. Urinary albumin excretion (UAE) at the 7th-day (a), 15th-day (b), and 25th-day (c) of the experiment. The data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups at 27 days of paricalcitol treatment. $n = 5-7$ for each group. The data are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.2. Paricalcitol Attenuated ADR-Induced Renal Structure Injury

The MT analysis showed tubulointerstitial fibrosis in the cortex, and the outer medulla was detected in the ADR group compared with the control and paricalcitol groups (Figure 3a–c). Additionally, the ADR + paricalcitol significantly attenuated the tubulointerstitial fibrosis in the cortex and the medulla compared with the ADR group (Figure 3a–c).

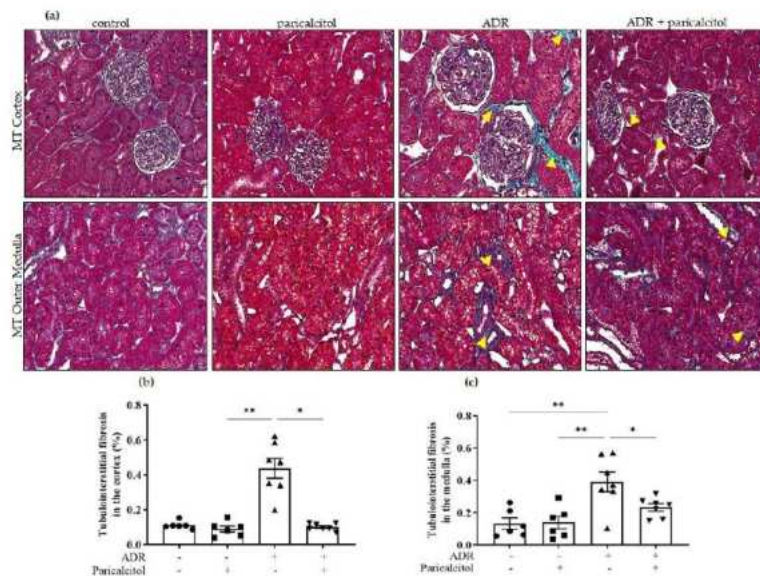


Figure 3. Representative Masson’s trichrome (MT) staining of kidney sections. (a). The top row represents the MT in the renal cortex, and the lower row represents the MT in the medullary compartment. The yellow arrowheads indicate the positive MT expression in tubulointerstitial compartments in the renal tissue. (b). Tubulointerstitial fibrosis in the renal cortex. (c). Tubulointerstitial fibrosis in the medullary compartment. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups at 27 days of paricalcitol treatment. Scale bar = 20 μ m, $n = 6-7$ for each group. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.3. Paricalcitol Treatment Improved Endothelium Structure and Function

The expression of JG12, an EC marker, was reduced in the renal glomerulus and the tubulointerstitial compartments of the renal cortex and outer medulla in the ADR group compared to the control groups. In the animals treated with paricalcitol, there was attenuation in these alterations compared to the ADR group (Figure 4a–d).

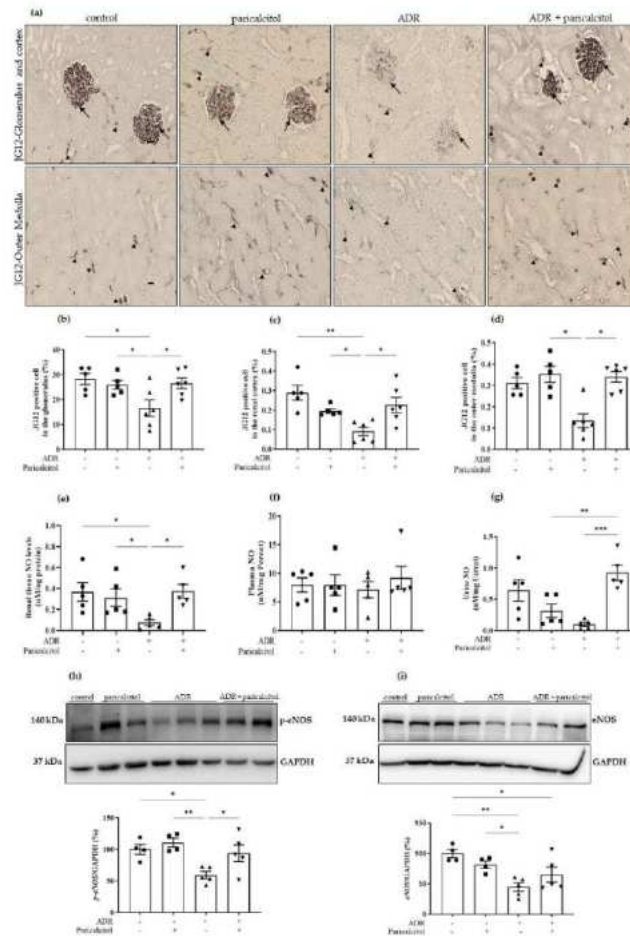


Figure 4. (a). The immunolocalization of JG12 in all renal compartments. The arrows indicate the JG12-positive expression in the glomerulus. The arrowheads indicate the JG12-positive expression in the tubulointerstitial compartments. (b). Percentual of JG12-positive cells in the glomerulus. (c). Percentual of JG12-positive cells in the renal cortex. (d). Percentual of JG12-positive cells in the outer medulla. Immunohistochemical data are expressed as the mean \pm SEM. Scale bar = 20 μ m, n = 5–6 for each group. (e). Renal tissue NO levels. (f). Plasma NO. (g). Urine NO, n = 5–6 for each group. Densitometric ratios among (h) p-eNOS or (i) eNOS and GAPDH were calculated, and data were expressed compared with the control group. The control value was designated as 100%. Data are expressed as mean \pm SEM. n = 4–5 for each group. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. *Pcreat.* Plasma creatinine; *Ucreat.* Urine creatinine.

The quantification of renal tissue NO levels showed a significantly decreased in the ADR group compared to the control and paricalcitol group, which were recovered in the ADR + paricalcitol group (Figure 4e). Urine NO levels decreased in the ADR group compared to the control groups. In contrast, these levels were higher in the ADR + paricalcitol group than in the paricalcitol and ADR groups (Figure 4g). In NO plasma levels, we did not find changes between the groups (Figure 4f). Densitometric ratios of *p-eNOS* (Figure 4h) and *eNOS* (Figure 4i) showed significantly decreased expression in the ADR group compared to the control and paricalcitol groups. Only *p-eNOS* was significantly increased in the ADR + paricalcitol group compared with the ADR group (Figure 4h).

3.4. Paricalcitol Treatment Attenuated the Expression of Mesenchymal Markers

Desmin expression, a podocyte cell dedifferentiation marker in the glomerulus, was significantly increased in the groups that received ADR compared to the control groups. This expression was attenuated by paricalcitol treatment in the ADR + paricalcitol (Figure 5a,b).

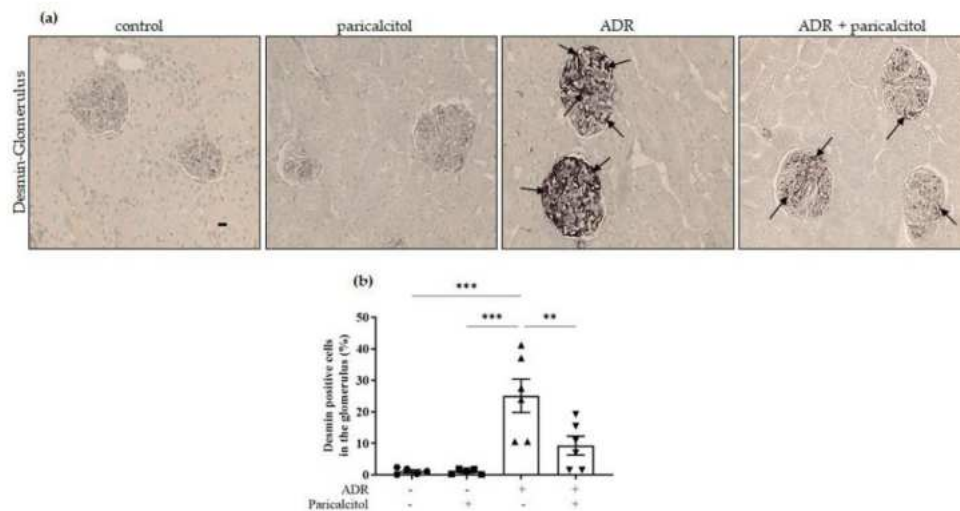


Figure 5. (a). The immunolocalization of desmin in the glomerulus. The arrows indicate the desmin-positive expression in the glomerulus. (b). Percentual of desmin-positive in the glomerulus from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. Immunohistochemical data are expressed as the mean \pm SEM. Scale bar = 20 μ m, $n = 5$ –6 for each group. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

The significantly increased expression of α -SMA was observed in the glomerulus, renal cortex, and outer medulla of animals from the ADR group compared to the control and paricalcitol groups. The ADR + paricalcitol group showed a decrease in this expression in the glomerulus and outer medulla. However, this alteration was not found in the renal cortex (Figure 6a–d). The densitometric analysis of α -SMA expression performed by Western blot studies showed increased expression in the renal tissue of animals from the ADR group compared to the control groups. In contrast, the ADR + paricalcitol group presented a significantly decreased expression of this protein (Figure 6e).

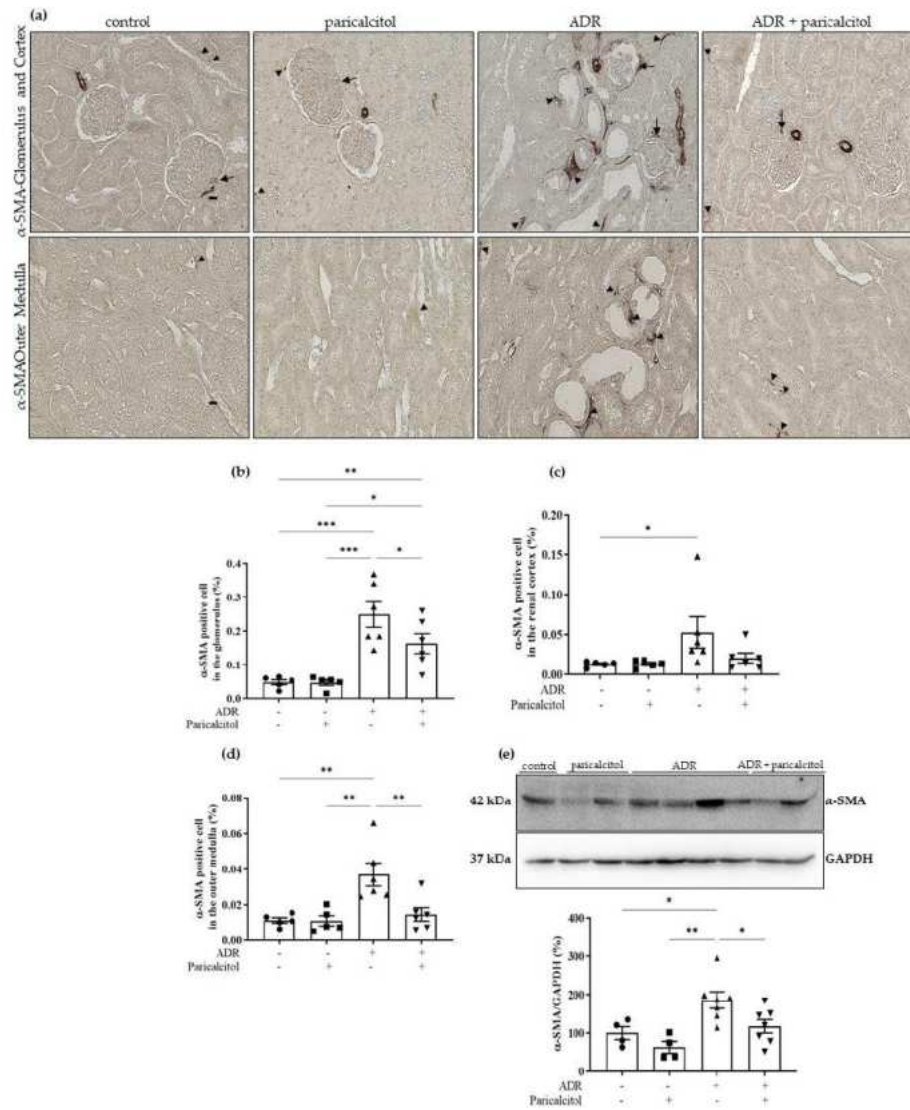


Figure 6. (a). The immunolocalization of α -SMA in all renal compartments. The arrows indicate the α -SMA-positive expression in the glomerulus. The arrowheads indicate the α -SMA-positive expression in the tubulointerstitial compartments. (b). Percentual of α -SMA-positive cells in the glomerulus. (c). Percentual of α -SMA-positive cells in the renal cortex. (d). Percentual of α -SMA-positive cells in the outer medulla. Immunohistochemical data are expressed as the mean \pm SEM. Scale bar = 20 μ m, $n = 5-6$. (e). Densitometric ratios among α -SMA and GAPDH were calculated, and data were expressed compared with the control group. The control value was designated as 100%. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 4-7$ for each group. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

The expression of vimentin was significantly increased in the renal cortex and outer medulla of the animals from the ADR group compared to the control and paricalcitol groups. The ADR + paricalcitol group showed a decrease in this expression in these compartments related to the ADR group (Figure 7a–c). The expression of vimentin performed by Western blot studies showed significantly increased expression in the renal tissue of animals from the ADR group compared to the control and paricalcitol groups. The treatment with paricalcitol inhibited this increase in the ADR + paricalcitol (Figure 7d).

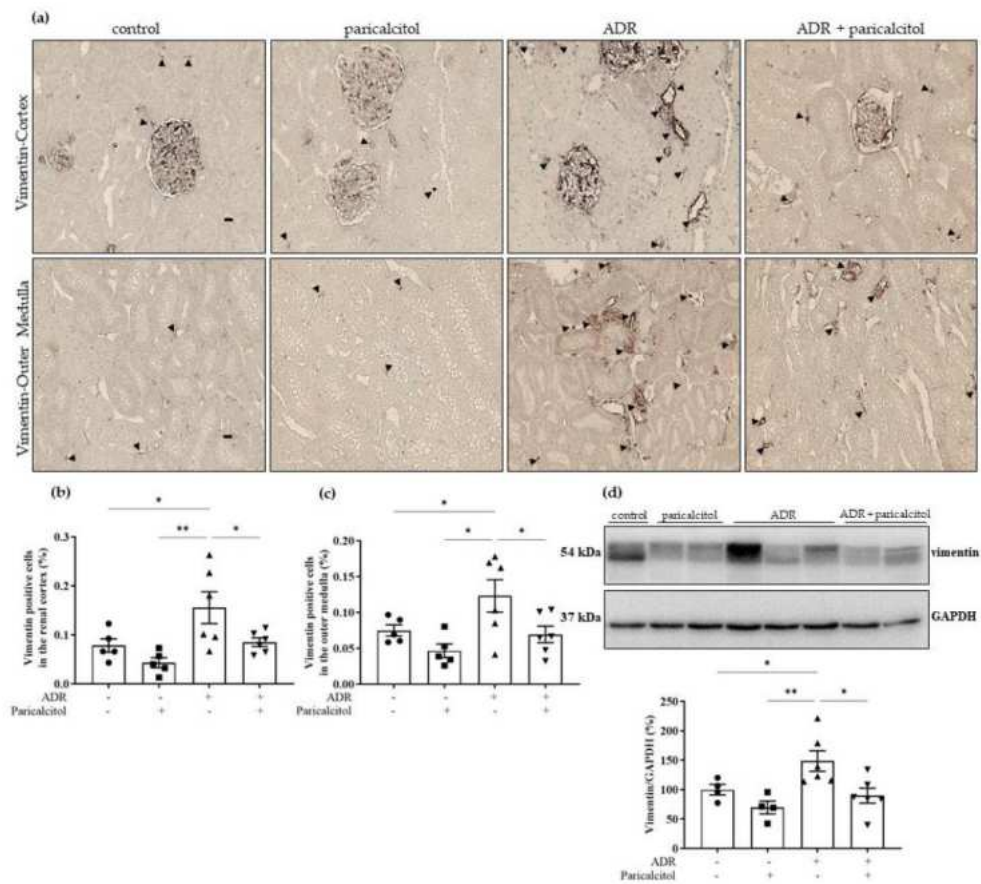


Figure 7. (a). The immunolocalization of vimentin in all renal compartments. The arrowheads indicate the vimentin-positive expression in the tubulointerstitial compartments. (b). Percentual of vimentin-positive cells in the renal cortex (c). Percentual of vimentin-positive cells in the outer medulla. Immunohistochemical data are expressed as the mean ± SEM. Scale bar = 20 µm, n = 5–6. (d). Densitometric ratios among vimentin and GAPDH were calculated, and data were expressed compared with the control group. The control value was designated as 100%. Data are expressed as mean ± SEM. n = 4–6 for each group. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. * p < 0.05; ** p < 0.01.

Finally, we found an increase in the Col I expression in the glomerulus and renal cortex of the ADR animals compared with the control group. The ADR + paricalcitol group

showed a significantly decreased in this expression observed in the renal cortex of the rats from the ADR groups (Figure 8a–c). However, in the outer medulla, the rats from the different groups did not present a change in the Col I expression (Figure 8d).

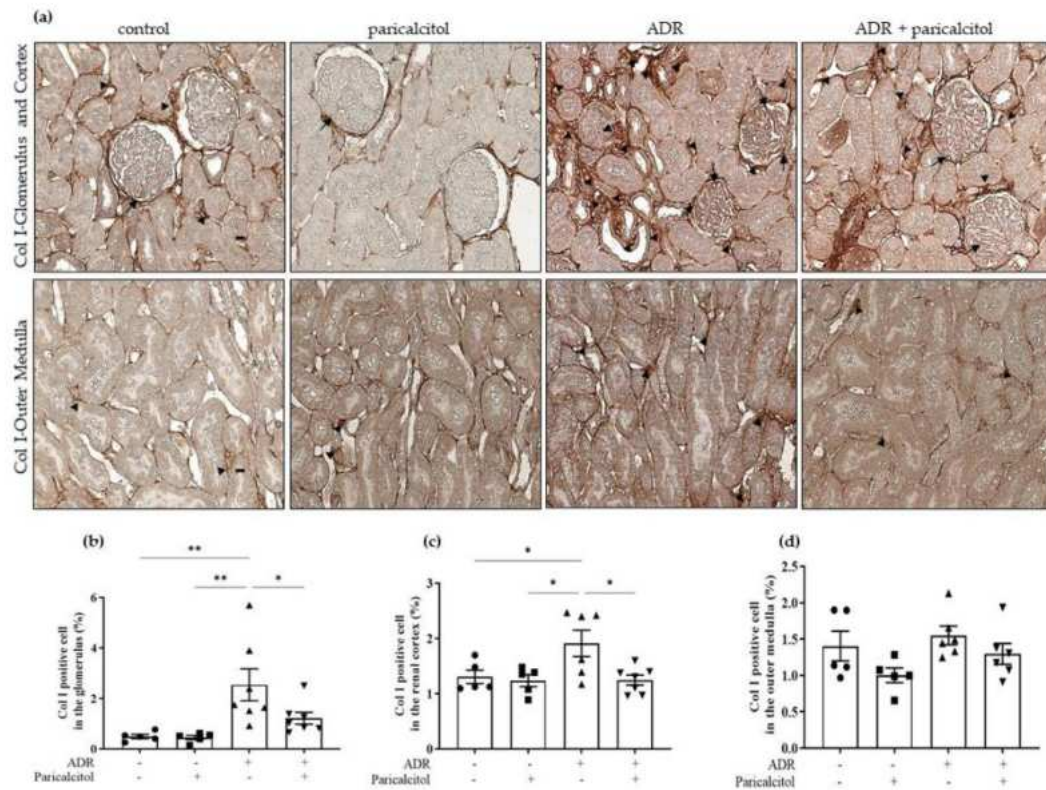


Figure 8. (a). The immunolocalization of Col I in all renal compartments. The arrows indicate the Col I-positive expression in the glomerulus. The arrowheads indicate the Col I-positive expression in the tubulointerstitial compartments. (b). Percentual of Col I-positive in the glomerulus. (c). Percentual of Col I-positive in the renal cortex. (d). Percentual of Col I-positive in the outer medulla. Immunohistochemical data are expressed as the mean \pm SEM. Scale bar = 20 μ m. $n = 5$ –7 for each group. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.5. Paricalcitol Modulated TGF- β 1 through the Smads Pathway

Urine TGF- β 1 was increased in the groups that received adriamycin (ADR and ADR + paricalcitol) compared with the control and paricalcitol groups. The paricalcitol treatment did not change this alteration. In the renal tissue TGF- β 1 levels, the ADR group presented upregulation compared to the control and paricalcitol groups. In contrast, this alteration was significantly attenuated in the ADR + paricalcitol group. The same occurred with p-Smad2/3 and total Smad2/3, which were increased in the ADR group compared to control and paricalcitol groups. The p-Smad2/3 and total Smad2/3 expression were reduced in the animals from ADR + paricalcitol compared to the ADR group (Figure 9a–d).

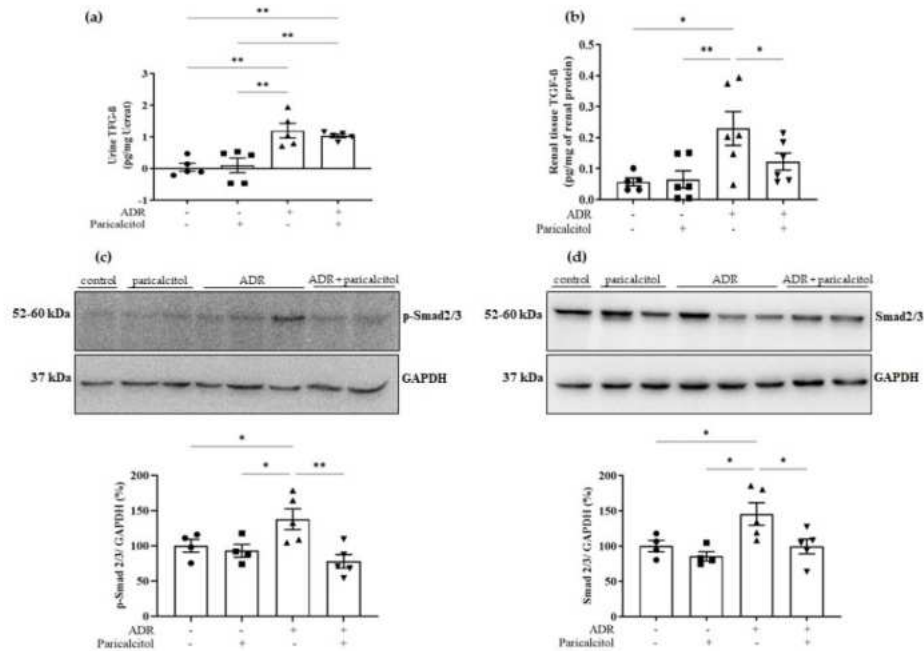


Figure 9. (a). Urine TGF- β 1 levels. (b). Renal tissue TGF- β 1 levels, $n = 5-7$ for each group. (c). Densitometric ratios among p-Smad2/3. (d). Densitometric ratios among Smad2/3. Densitometric ratios among these markers and GAPDH were calculated, and data were expressed compared with the control group. The control value was designated as 100%. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 4-5$ for each group. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.6. Paricalcitol Treatment Attenuated Imbalance in Pro- and Anti-Angiogenic Factors

Differences in Ang-1 expression were not observed (Figure 10a). On the other hand, Ang-2 showed a tendency to increase in the ADR group, which was significantly reduced with paricalcitol treatment (Figure 10b). The expression of Tie-2 was decreased in the ADR group compared to the control group, and treatment with paricalcitol significantly increased this parameter compared to the ADR group (Figure 10c).

VEGF and their endothelial receptor, VEGFR2, decreased expressions in the paricalcitol group compared to the control. The ADR group also presented a significant reduction in this expression compared to the control and paricalcitol groups. In the ADR + paricalcitol group, the animals showed an increase in VEGF and VEGFR2 expression compared with the control and ADR groups (Figure 10c,d).

3.7. Paricalcitol Treatment Modulated AT1 and VDR Expression

The expression of the AT1 receptor was increased in the ADR group compared to the control and paricalcitol groups. The ADR + paricalcitol group presented a significant decrease in this expression ($p < 0.05$) (Figure 11a).

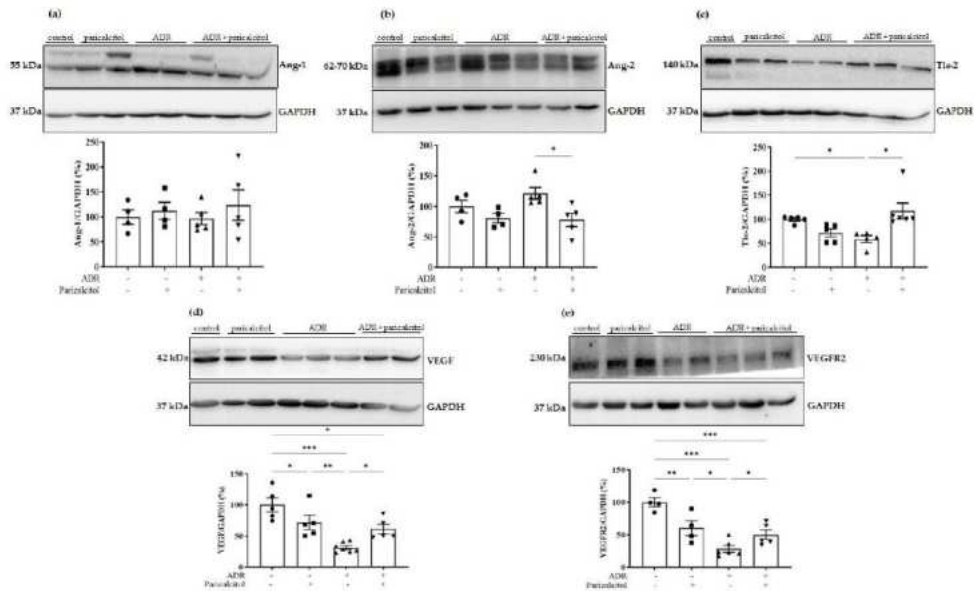


Figure 10. Pro- and anti-angiogenic factors. (a). Densitometric ratios among Ang-1. (b). Densitometric ratios among Ang-2. (c). Densitometric ratios among Tie-2. (d). Densitometric ratios among VEGF and (e). Densitometric ratios among VEGFR2. Densitometric ratios among these markers and GAPDH were calculated, and data were expressed compared with the control group. The control value was designated as 100%. Data are expressed as mean ± SEM. *n* = 5–7 for each group. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001.

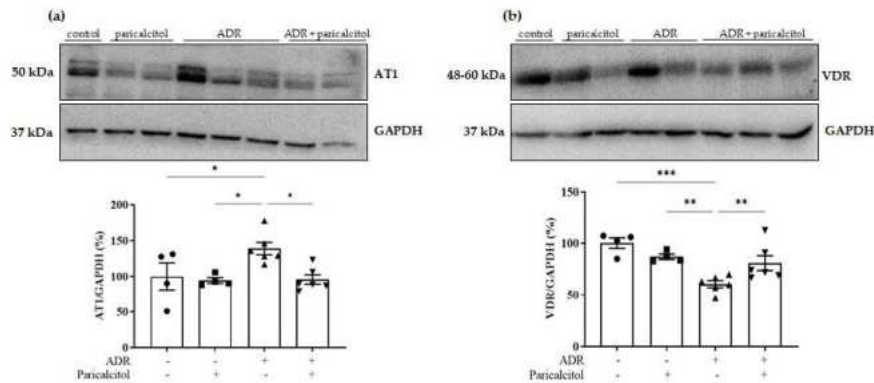


Figure 11. (a). Densitometric ratios among AT1. (b). Densitometric ratios among VDR. Densitometric ratios among these markers and GAPDH were calculated, and data were expressed compared with the control group. The control value was designated as 100%. Data are expressed as mean ± SEM. *n* = 4–6 for each group. Data from the control (dots), paricalcitol (squares), ADR (up triangles), and ADR + paricalcitol (down triangles) groups. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001.

We then investigated whether paricalcitol treatment could modulate VDR expression by itself. VDR expression was remarkably reduced in the ADR group compared to the control and paricalcitol groups. This expression in the ADR + paricalcitol group significantly increased compared to the ADR group (Figure 11b).

4. Discussion

The present work showed that paricalcitol treatment improved renal function and structure through antiproteinuric effects and glomerular and tubular protection. The activation of the VDR promoted the reduction in the renal microvasculature disturbances by attenuating the TGF- β 1/Smad2/3-dependent and downregulation of Ang-2 and AT1 expression, regulating the Angs/Tie-2 and VEGF/VEGFR2 axes, which presents disturbances in ADR-induced nephropathy in rats. Our results showed a protective role of paricalcitol in the renal microvasculature that could be used as a target for treating the beginning of CKD.

Proteinuria is the most common clinical manifestation of glomerular diseases and is directly linked to kidney injury progression [29,30]. Several clinical and experimental studies have shown the participation of proteinuria in the tubulointerstitial lesion observed in glomerulopathies [31,32]. The results showed that renal function was reduced in the animals from the ADR group. A decrease in the GFR and an increase in FE_{Na} and UAE were observed. Histopathological analysis showed tubulointerstitial lesions and fibrosis in response to increased protein glomerular permeability, similar to other studies [33]. The pleiotropic action of vit. D has been recently studied [34]. Paricalcitol selectively activates VDR [20] by binding and interacting with VDR/vit. D response element (VDRE) and is essential in preventing morphological changes of podocytes in the SN model [35]. 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-D3), the active form of vit. D3 reduced a transendothelial albumin passage induced by ADR in vitro and in vivo via the interaction with VDR-heparanase promoter in podocytes [36]. Garsen et al. have suggested that crosstalk could exist between glomerular ECs and podocytes to induce proteinuria and vit. D can modulate this effect in these cells, mainly in podocytes with more VDR [36]. Paricalcitol reduced ADR-induced changes in renal function and structure, independent of 25 OHD and PTH levels. This data may reinforce that paricalcitol improves non-SHPT in CKD by acting directly on albuminuria parameters and reducing side effects without modifying the calcium-phosphorus product.

Previously, our laboratory showed that calcitriol treatment protects endothelial maintenance induced by RAS dysregulation during kidney development [27]. Our results showed an epithelial/EC loss in their phenotype, supported by data demonstrating a significant decrease in JG12, an endothelium marker, and an increased mesenchymal cell phenotype, positive for desmin, α -SMA, vimentin, and Col I in the renal interstitium and glomeruli, as seen previously in other works [3,20,37]. Paricalcitol treatment could reduce α -SMA and vimentin expression in the renal tissue in ADR animals. These data suggest that the alterations provoked by ADR can be modulated by paricalcitol, at least partly, due to its properties in cell differentiation and endothelium maintenance.

TGF- β 1/Smad is the key to fibrogenic pathways in ADR-induced nephropathy [38], which is directly associated with ESRD [39] with Col I and fibronectin expression in renal tissue [1,40]. Smad family molecules are involved in the downstream of TGF- β 1 after its phosphorylation [1], leading to the loss of endothelium function and fibroblastic phenotype [41]. Our data showed that the TGF- β 1/p-Smad2/3 signaling was upregulated in the animals from the ADR group in renal tissue. Smad2 and Smad3 are mediators of extracellular matrix (ECM) production and activation of myofibroblasts via TGF- β 1 [42] by binding to the promoter of collagens and inducing its production in CKD models and α -SMA induction in proximal-tubule epithelial human cells [43]. Tsai et al. have shown that the vit. D decreases p-Smad2/Smad2 expression in the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and, in ADR-induced cardiotoxicity, inhibits tissue fibrosis [44]. The TGF- β 1/p-Smad pathway is associated with the AT1 receptor. AT1 blockade in mitral valve EC contributes to the reduction in EndoMT by the decrease in TGF- β 1/Smad

activation [19]. Our study showed a reduction in the AT1 expression by paricalcitol treatment, indicating less vasoconstriction reflected in GFR and endothelium function. Paricalcitol-VDR activation reduces the RAS activation, decreasing renal *RENIN* and *AT1R* gene expression in CKD [15]. Thus, Vit. D protects microvasculature and tissue perfusion, improving capillary blood flow [45] and decreasing RAS activation and the expression of its components directly associated with the TGF- β 1/Smad pathway in kidney fibrosis. The urinary TGF- β 1 is indicative of CKD and was increased in ADR animals. However, paricalcitol treatment did not attenuate this parameter.

We also observed increased expression of p-eNOS/NO tissue levels in animals treated with paricalcitol. This improvement is due to the increase in either expression or activity of eNOS, resulting in more efficient NO production [46,47]. In the ADR model, there are alterations in the NO pathways, probably due to endotheliotoxicity, inhibiting and uncoupling eNOS, preventing its phosphorylation and NO availability [13,48]. Paricalcitol is involved in regulatory mechanisms in NO pathways preventing reactive oxygen species (ROS) production and free radicals [14,17]. Vit. D/VDR stimulates the NOS3 gene, resulting in higher NO production, which improves vascular function [49]. In this case, eNOS could phosphorylate VEGF and vice-versa, protecting podocyte loss, glomerular and peritubular vascular rarefaction, renal fibrosis [50], and inhibiting the expression of TGF β -Smad3 [51]. Our work evidenced the synergistic effect of VDR activation and pro-angiogenic factors. These effects can cause neovascularization and maintenance of the endothelium by increasing VEGF levels in tissue [52,53], probably by acting on the proliferation and differentiation of cells [10,27]. The VEGF has pro- and anti-fibrotic effects at different times of kidney health and diseases to regulate angiogenesis and also plays a role in the progression of renal fibrosis [51]. We have seen a reduction in the VEGF/VEGFR2 expression in animals from the paricalcitol group, which reinforces the evidence that there is a certain duality of the effects of VEGF that exacerbates or inhibits the process of renal fibrosis. In our study, paricalcitol regulates VEGF to act in different ways.

Vit. D deficiency increases Ang-2 levels in renal tissue associated with lower Ang-1 and Tie-2 receptor [11]. Ang-1 acts as an angiogenic factor stimulating the proliferation and maturation of EC in angiogenesis, fibrosis, and inflammation [11,54] associated with attenuation of myofibroblast activation, ECM accumulation, and peritubular capillary growth observed in UUO model [9,55]. Ang-2 is associated with increased albuminuria and decreased GFR in diabetes mellitus type 2 and advanced CKD [24,25,56]. The higher Ang-1: Ang-2 ratio has been associated with 72% less CKD progression and 82% lower mortality risk in acute kidney injury (AKI) [57]. Paricalcitol treatment attenuated alterations in Ang-2 expression, which reflected in the downregulation of the Ang-2/Tie-2 pathway, reducing the albuminuria, alterations in the GFR, and vascular rarefaction in animals received paricalcitol treatment. Furthermore, Tie-2 and VEGFR2 are specific endothelial receptors that support these data together with the recovery of JG12 and VDR receptor expression in renal cells. This demonstrates that vit. D in its active and circulating form can increase the VDR in the face of the onset of an ADR-induced kidney injury. Our results reinforced the essential role of the renal medulla compartment in kidney development [27] and adulthood kidney function efficiency. Further studies through in vitro experiments using primary endothelial cells of the kidney and angiogenesis assays should be performed to evaluate this process better in the microvasculature of both the renal cortex and the medulla. Despite this, with the limitations involving experimental models, the present study adds to the literature concerning the participation of endothelial cells and their markers in early CKD.

5. Conclusions

In conclusion, paricalcitol attenuates microvasculature alterations in ADR-induced kidney injury in rats. Vit. D had antiproteinuric effects and cellular differentiation by inhibiting the TGF- β 1/Smad2/3 pathway, regulating the Angs/Tie-2, VEGF/VEGFR2, and AT1 axes through recovery endothelial structure and function, and VDR expression

in renal tissue. Our data also emphasized the importance of the renal medulla and peritubular capillaries in maintaining renal function and structure. The results suggest that paricalcitol could potentially be therapeutic in preventing renal fibrosis by targeting the endotheliotoxicity caused by early CKD.

Author Contributions: Conceptualization, A.L.D.; data curation, A.L.D.; funding acquisition, and T.M.C.; investigation, A.L.D., B.M.O., C.S.S., A.L.D.M. and C.G.; methodology, A.L.D.; project administration, A.L.D.; resources, F.J.A.d.P., R.S.C., J.A.-R. and T.M.C.; supervision, H.D.C.F. and T.M.C.; writing—original draft, A.L.D.; writing—review and editing, L.F.d.A. and T.M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001 and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 303252/2021-9).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Brazilian College of Animal Experimentation and the Animal Experimentation Committee of the University of Sao Paulo at Ribeirao Preto Medical School (COBEA/CETEA/FMRP-USP, protocol no. 194/2017).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors want to thank Marta Nakao for assistance with 25 OHD measurements, Milene Mantovani for the nitric oxide measurements, and Guilherme Lemos and Flávio Leite for help with histological sections.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted without any commercial or financial relationships construed as a potential conflict of interest.

References

- Meng, X.; Nikolic-Paterson, D.J.; Lan, H.Y. TGF- β : The Master Regulator of Fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, *12*, 325–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- LeBleu, V.S.; Taduri, G.; O’Connell, J.; Teng, Y.; Cooke, V.G.; Woda, C.; Sugimoto, H.; Kalluri, R. Origin and Function of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1047–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sun, Y.B.Y.; Qu, X.; Caruana, G.; Li, J. The Origin of Renal Fibroblasts/Myofibroblasts and the Signals That Trigger Fibrosis. *Differentiation* **2016**, *92*, 102–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Platel, V.; Faure, S.; Corre, I.; Clere, N. Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 8361945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ebefors, K.; Wiener, R.J.; Yu, L.; Azeloglu, E.U.; Yi, Z.; Jia, F.; Zhang, W.; Baron, M.H.; He, J.C.; Haraldsson, B.; et al. Endothelin Receptor-A Mediates Degradation of the Glomerular Endothelial Surface Layer via Pathologic Crosstalk between Activated Podocytes and Glomerular Endothelial Cells. *Kidney Int.* **2019**, *96*, 957–970. [[CrossRef](#)]
- Sun, Y.B.Y.; Qu, X.; Zhang, X.; Caruana, G.; Bertram, J.F.; Li, J. Glomerular Endothelial Cell Injury and Damage Precedes that of Podocytes in Adriamycin-Induced Nephropathy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55027. [[CrossRef](#)]
- Simic, I.; Tabatabaeifar, M.; Schaefer, F. Animal Models of Nephrotic Syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **2013**, *28*, 2079–2088. [[CrossRef](#)]
- Bryant, C.; Cianciolo, R.; Govindarajan, R.; Agrawal, S. Adriamycin-Induced Nephropathy Is Robust in N and Modest in J Substrain of C57BL/6. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 924751. [[CrossRef](#)]
- Anderson, C.E.; Hamm, L.L.; Batuman, G.; Kumbala, D.R.; Chen, C.-S.; Kallu, S.G.; Siriki, R.; Gadde, S.; Kleinpeter, M.A.; Krane, N.K.; et al. The Association of Angiogenic Factors and Chronic Kidney Disease. *BMC Nephrol.* **2018**, *19*, 117. [[CrossRef](#)]
- Kaur, J.; Kamboj, K.; Yadav, A.K.; Kaur, P.; Kumar, V.; Jha, V. Cholecalciferol Supplementation and Angiogenic Markers in Chronic Kidney Disease. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0268946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ferreira de Almeida, L.; Della Coletta Francescato, H.; Antunes-Rodrigues, J.; Jose Albuquerque de Paula, F.; Giovanni Alves da Silva, C.; Silva Costa, R.; Machado Coimbra, T. Imbalance of Pro- and Anti-Angiogenic Factors Due to Maternal Vitamin D Deficiency Causes Renal Microvasculature Alterations Affecting the Adult Kidney Function. *Nutrients* **2019**, *11*, 1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gnudi, L.; Benedetti, S.; Woolf, A.S.; Long, D.A. Vascular Growth Factors Play Critical Roles in Kidney Glomeruli. *Clin. Sci.* **2015**, *129*, 1225–1236. [[CrossRef](#)]
- He, H.; Wang, L.; Qiao, Y.; Zhou, Q.; Li, H.; Chen, S.; Yin, D.; Huang, Q.; He, M. Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/ENOS/NO Pathway. *Front. Pharmacol.* **2020**, *10*, 1531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Salanova Villanueva, L.; Gil Giraldo, Y.; Santos Sánchez-Rey, B.; Aguilera Peralta, A. Efecto Regulador de Paricalcitol Sobre Parámetros Inflamatorios, Fibróticos y Anticalcificantes En El Paciente Con Enfermedad Renal Crónica. Más Allá de La Regulación de La Enfermedad Óseo-Mineral. *Nefrología* **2020**, *40*, 171–179. [[CrossRef](#)]
15. Martínez-Arias, L.; Panizo, S.; Alonso-Montes, C.; Martín-Virgala, J.; Martín-Carro, B.; Fernández-Villabrille, S.; García Gil-Albert, C.; Palomo-Antequera, C.; Fernández-Martín, J.L.; Ruiz-Torres, M.P.; et al. Effects of Calcitriol and Paricalcitol on Renal Fibrosis in CKD. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2021**, *36*, 793–803. [[CrossRef](#)]
16. Gembllo, G.; Siligato, R.; Amatruda, M.; Conti, G.; Santoro, D. Vitamin D and Glomerulonephritis. *Medicina* **2021**, *57*, 186. [[CrossRef](#)]
17. Demir, F.; Demir, M.; Aygun, H. Evaluation of the Protective Effect of Paricalcitol and Vitamin D 3 at Doxorubicin Nephrotoxicity in Rats with 99m Technetium-Dimercaptosuccinic Acid Renal Scintigraphy and Biochemical Methods. *Hum. Exp. Toxicol.* **2021**, *40*, 274–283. [[CrossRef](#)]
18. Martín-Romero, A.; Perelló-Martínez, J.; Hidalgo-Santiago, J.C.; Michan-Doña, A.; Bosco López Sáez, J.; Gómez-Fernández, P. Efecto de la Administración de Diferentes Formas de Vitamina D en la Presión Arterial y Rigidez Aórticas, y su Implicación en la Reducción de la Albuminuria en la Enfermedad Renal Crónica. *Clin. Investig. Arterioscler.* **2022**, *34*, 311–321. [[CrossRef](#)]
19. Wylie-Sears, J.; Levine, R.A.; Bischoff, J. Losartan Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transformation in Mitral Valve Endothelial Cells by Blocking Transforming Growth Factor- β -Induced Phosphorylation of ERK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 870–875. [[CrossRef](#)]
20. Lim, J.-H.; Yook, J.-M.; Oh, S.-H.; Jeon, S.-J.; Noh, H.W.; Jung, H.-Y.; Choi, J.-Y.; Cho, J.-H.; Kim, C.-D.; Kim, Y.-L.; et al. Paricalcitol Improves Hypoxia-Induced and TGF- β 1-Induced Injury in Kidney Pericytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9751. [[CrossRef](#)]
21. Wu-Wong, J.R.; Li, X.; Chen, Y. Different Vitamin D Receptor Agonists Exhibit Differential Effects on Endothelial Function and Aortic Gene Expression in 5/6 Nephrectomized Rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *148*, 202–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Martínez-Miguel, P.; Valdivielso, J.M.; Medrano-Andrés, D.; Román-García, P.; Cano-Peñalver, J.L.; Rodríguez-Puyol, M.; Rodríguez-Puyol, D.; López-Ongil, S. The Active Form of Vitamin D, Calcitriol, Induces a Complex Dual Upregulation of Endothelin and Nitric Oxide in Cultured Endothelial Cells. *Am. J. Physiol. Metab.* **2014**, *307*, E1085–E1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Maimaitiyiming, H.; Zhou, Q.; Wang, S. Thrombospondin 1 Deficiency Ameliorates the Development of Adriamycin-Induced Proteinuric Kidney Disease. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, S.; Li, H.; Zhang, C.; Li, Z.; Wang, Q.; Guo, J.; Luo, C.; Wang, Y. Urinary Angiopoietin-2 Is Associated with Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, *2015*, 1–7. [[CrossRef](#)]
25. Chang, F.-C.; Lai, T.-S.; Chiang, C.-K.; Chen, Y.-M.; Wu, M.-S.; Chu, T.-S.; Wu, K.-D.; Lin, S.-L. Angiopoietin-2 Is Associated with Albuminuria and Microinflammation in Chronic Kidney Disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54668. [[CrossRef](#)]
26. Arfian, N.; Kusuma, M.H.H.; Anggorowati, N.; Nugroho, D.B.; Jeffilano, A.; Suzuki, Y.; Ikeda, K.; Emoto, N. Vitamin D Upregulates Endothelin-1, ETBR, ENOS mRNA Expression and Attenuates Vascular Remodelling and Ischemia in Kidney Fibrosis Model in Mice. *Physiol. Res.* **2018**, *67* (Suppl. 1), S137–S147. [[CrossRef](#)]
27. 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](#)]
28. Faleiros, C.M.; Francescato, H.D.C.; Papoti, M.; Chaves, L.; Silva, C.G.A.; Costa, R.S.; Coimbra, T.M. Effects of Previous Physical Training on Adriamycin Nephropathy and Its Relationship with Endothelial Lesions and Angiogenesis in the Renal Cortex. *Life Sci.* **2017**, *169*, 43–51. [[CrossRef](#)]
29. Chang-Chien, C.; Chuang, G.-T.; Tsai, I.-J.; Chiang, B.-L.; Yang, Y.-H. A Large Retrospective Review of Persistent Proteinuria in Children. *J. Formos. Med. Assoc.* **2018**, *117*, 711–719. [[CrossRef](#)]
30. Han, X.; Dai, R.; Zhai, Y.; Shen, Q.; Sun, L.; Liu, H.; Xu, H. Anti-Proteinuria Effect of Antibody against ANGPTL3 Coil-Coiled Domain on Adriamycin-Induced Nephropathy in Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *516*, 812–818. [[CrossRef](#)]
31. Zoja, C.; Abbate, M.; Remuzzi, G. Progression of Renal Injury toward Interstitial Inflammation and Glomerular Sclerosis Is Dependent on Abnormal Protein Filtration. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2015**, *30*, 706–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wang, C.; Li, Q.; Zhen, J.; Xu, Y.; Sun, S. Simvastatin Ameliorates Renal Lipidosis through the Suppression of Renal CXCL16 Expression in Mice with Adriamycin-Induced Nephropathy. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 15696–15707. [[PubMed](#)]
33. Silveira, K.D.; Barroso, L.C.; Vieira, A.T.; Cisalpino, D.; Lima, C.X.; Bader, M.; Arantes, R.M.E.; dos Santos, R.A.S.; Simões-e-Silva, A.C.; Teixeira, M.M. Beneficial Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Mas Receptor in a Murine Model of Adriamycin-Induced Nephropathy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66082. [[CrossRef](#)]
34. Christakos, S.; Dhawan, P.; Verstuyf, A.; Verlinden, L.; Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 365–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhang, Q.; Jiang, X.; Wen, D.; Zhang, Y.; Mao, J.; Ni, L.; Chen, J. Vitamin D Receptor/Vitamin D Response Element Directly Modulate Nestin Transcription to Ameliorate PAN-Induced Podocyte Morphological Changes. *Nephron* **2022**, *146*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Garsen, M.; Sonneveld, R.; Rops, A.L.; Huntink, S.; van Kuppevelt, T.H.; Rabelink, T.J.; Hoenderop, J.G.; Berden, J.H.; Nijenhuis, T.; van der Vlag, J. Vitamin D Attenuates Proteinuria by Inhibition of Heparanase Expression in the Podocyte. *J. Pathol.* **2015**, *237*, 472–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Ito, I.; Waku, T.; Aoki, M.; Abe, R.; Nagai, Y.; Watanabe, T.; Nakajima, Y.; Ohkido, I.; Yokoyama, K.; Miyachi, H.; et al. A Nonclassical Vitamin D Receptor Pathway Suppresses Renal Fibrosis. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 4579–4594. [[CrossRef](#)]
38. Chang, X.; Zhen, X.; Liu, J.; Ren, X.; Hu, Z.; Zhou, Z.; Zhu, F.; Ding, K.; Nie, J. The Antihelminthic Phosphate Niclosamide Impedes Renal Fibrosis by Inhibiting Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 Expression. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 612–624. [[CrossRef](#)]
39. Qiu, Y.; Zhou, J.; Zhang, H.; Zhou, H.; Tang, H.; Lei, C.; Ye, C.; You, C.; Chen, Y.; Wang, Y.; et al. Rhodajaponin II Attenuates Kidney Injury by Regulating TGF- β 1/Smad Pathway in Mice with Adriamycin Nephropathy. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *243*, 112078. [[CrossRef](#)]
40. Samarakoon, R.; Overstreet, J.M.; Higgins, S.P.; Higgins, P.J. TGF- β 1 \rightarrow SMAD/P53/USF2 \rightarrow PAI-1 Transcriptional Axis in Ureteral Obstruction-Induced Renal Fibrosis. *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 117–128. [[CrossRef](#)]
41. van Meeteren, L.A.; ten Dijke, P. Regulation of Endothelial Cell Plasticity by TGF- β . *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 177–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Liu, Z.-H.; Zhang, Y.; Wang, X.; Fan, X.-F.; Zhang, Y.; Li, X.; Gong, Y.; Han, L.-P. SIRT1 Activation Attenuates Cardiac Fibrosis by Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *118*, 109227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pardali, E.; Sanchez-Duffhues, G.; Gomez-Puerto, M.; ten Dijke, P. TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2157. [[CrossRef](#)]
44. Tsai, T.-Z.; Lin, C.-J.; Hang, C.-L.; Chen, W.-Y. Calcitriol Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction and Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Mice. *Cells* **2019**, *8*, 865. [[CrossRef](#)]
45. Lundwall, K.; Jörneskog, G.; Jacobson, S.H.; Spaak, J. Paricalcitol, Microvascular and Endothelial Function in Non-Diabetic Chronic Kidney Disease: A Randomized Trial. *Am. J. Nephrol.* **2015**, *42*, 265–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zoccali, C.; Curatola, G.; Panuccio, V.; Tripepi, R.; Pizzini, P.; Versace, M.; Bolignano, D.; Cutrupi, S.; Politi, R.; Tripepi, G.; et al. Paricalcitol and Endothelial Function in Chronic Kidney Disease Trial. *Hypertension* **2014**, *64*, 1005–1011. [[CrossRef](#)]
47. Vanhoutte, P.M.; Shimokawa, H.; Feletou, M.; Tang, E.H.C. Endothelial Dysfunction and Vascular Disease—A 30th Anniversary Update. *Acta Physiol.* **2017**, *219*, 22–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mu, H.; Liu, H.; Zhang, J.; Huang, J.; Zhu, C.; Lu, Y.; Shi, Y.; Wang, Y. Ursolic Acid Prevents Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Mice through ENOS Activation and Inhibition of ENOS Uncoupling. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 2174–2183. [[CrossRef](#)]
49. Andrukhova, O.; Slavic, S.; Zeitz, U.; Riesen, S.C.; Heppelmann, M.S.; Ambrisko, T.D.; Markovic, M.; Kuebler, W.M.; Erben, R.G. Vitamin D Is a Regulator of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Arterial Stiffness in Mice. *Mol. Endocrinol.* **2014**, *28*, 53–64. [[CrossRef](#)]
50. Fu, J.; Lee, K.; Chuang, P.Y.; Liu, Z.; He, J.C. Glomerular Endothelial Cell Injury and Cross Talk in Diabetic Kidney Disease. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2015**, *308*, F287–F297. [[CrossRef](#)]
51. Miao, C.; Zhu, X.; Wei, X.; Long, M.; Jiang, L.; Li, C.; Jin, D.; Du, Y. Pro- and Anti-Fibrotic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor in Chronic Kidney Diseases. *Ren. Fail.* **2022**, *44*, 881–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Grundmann, M.; Haidar, M.; Placzko, S.; Niendorf, R.; Darashchonak, N.; Hubel, C.A.; von Versen-Höyneck, F. Vitamin D Improves the Angiogenic Properties of Endothelial Progenitor Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2012**, *303*, C954–C962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhong, W.; Gu, B.; Gu, Y.; Groome, L.J.; Sun, J.; Wang, Y. Activation of Vitamin D Receptor Promotes VEGF and CuZn-SOD Expression in Endothelial Cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *140*, 56–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Loganathan, K.; Salem Said, E.; Winterrowd, E.; Orebrand, M.; He, L.; Vanlandewijck, M.; Betsholtz, C.; Quaggin, S.E.; Jeansson, M. Angiopoietin-1 Deficiency Increases Renal Capillary Rarefaction and Tubulointerstitial Fibrosis in Mice. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0189433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Singh, S.; Manson, S.R.; Lee, H.; Kim, Y.; Liu, T.; Guo, Q.; Geminiani, J.J.; Austin, P.F.; Chen, Y.M. Tubular Overexpression of Angiopoietin-1 Attenuates Renal Fibrosis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158908. [[CrossRef](#)]
56. Chang, F.-C.; Lee, M.-C.; Chiang, C.-K.; Liu, J.-S.; Lai, T.-S.; Chiang, W.-C.; Chen, Y.-M.; Chu, T.-S. Angiopoietin-2 Is Associated with Metabolic Syndrome in Chronic Kidney Disease. *J. Formos. Med. Assoc.* **2021**, *120*, 2113–2119. [[CrossRef](#)]
57. Mansour, S.G.; Bhatraju, P.K.; Coca, S.G.; Obeid, W.; Wilson, F.P.; Stanaway, I.B.; Jia, Y.; Thiessen-Philbrook, H.; Go, A.S.; Ikizler, T.A.; et al. Angiopoietins as Prognostic Markers for Future Kidney Disease and Heart Failure Events after Acute Kidney Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2022**, *33*, 613–627. [[CrossRef](#)]

APÊNDICE B - Artigo publicado como coautora na revista *International Journal of Molecular Science*



International Journal of
Molecular Sciences



Article

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

Beatriz M. Oliveira¹, Lucas Ferreira de Almeida¹, Amanda L. Deluque¹, Cláudia S. Souza¹, Ana Lúcia D. Maciel¹, Heloísa D. C. Francescato¹, Roberto S. Costa², Cleonice Giovanini¹, Francisco José A. de Paula² and Terezila M. Coimbra^{1,*}

¹ Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 140490-900, São Paulo, Brazil

² Department of Medical Clinic, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 140490-900, São 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 ± 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 **; ●
GFR (mL/min ¹ 100 g ¹)	0.79 ± 0.03	1.46 ± 0.21	0.03 ± 0.01 ***; ●●●	0.52 ± 0.15 **; ●●; ■

Data are expressed as mean ± 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).

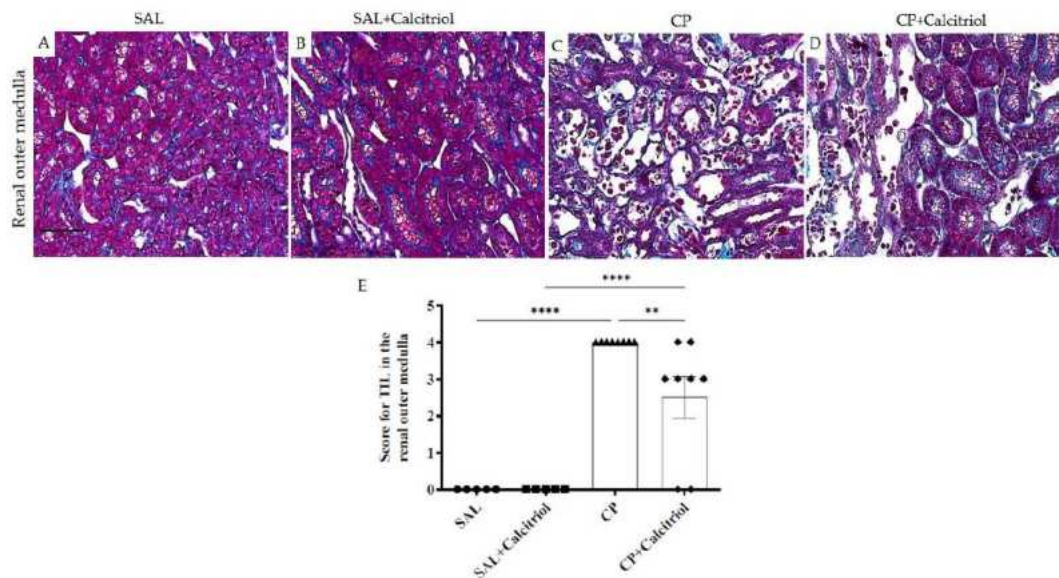


Figure 1. Histological sections stained with Masson's Trichrome representative of the renal outer medulla of groups SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) (bar represents 50 μ m). The score for TIL in the renal outer medulla (E) of all experimental groups. Data are expressed as 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).

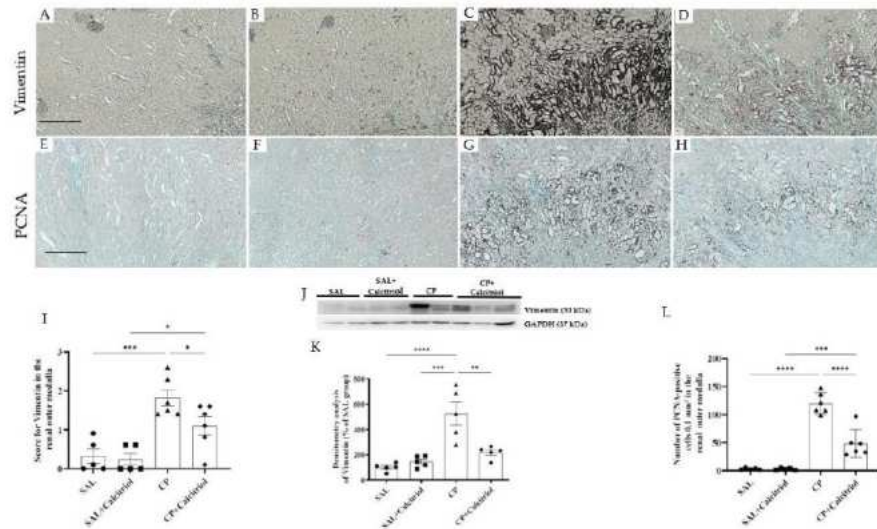


Figure 2. Immunolocalization of vimentin (A–D) and PCNA (E–H) in the renal outer medulla of the SAL (A,E), SAL + calcitriol (B,F), CP (C,G) and CP + calcitriol (D,H) groups. The bar indicates 200 μ m. The score for vimentin (I) and the number of PCNA+ cells (L) in the renal outer medulla in the different 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, $\times 100$.

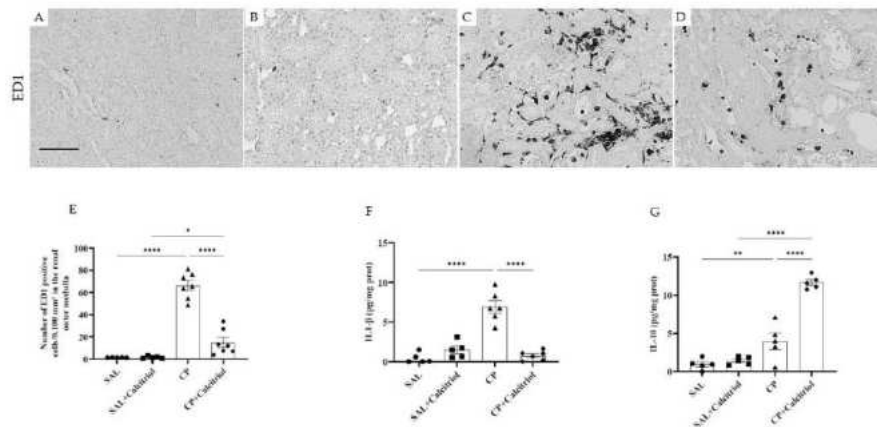


Figure 3. Immunolocalization of ED1-positive cells (macrophages) in the outer renal medulla of the SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) groups (bar represents 50 μ m). The number of ED1-positive cells in all experimental groups' outer renal medulla (E). Values are given as the 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).

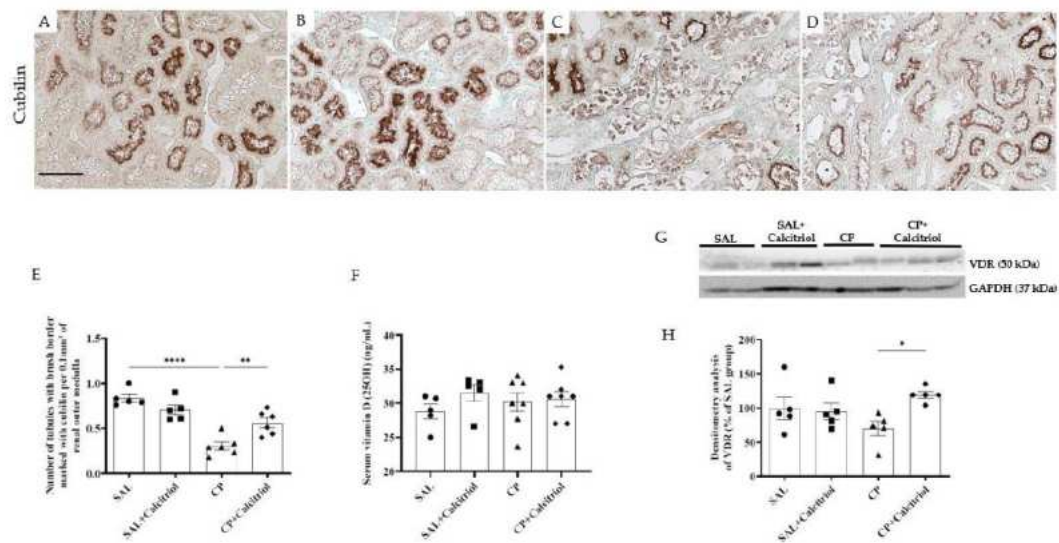


Figure 4. Immunolocalization of cubilin in the renal outer medulla of the SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) groups (bar indicates 50 μ m). The number of tubules with a brush border marked with cubilin (E) from all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol). Serum levels of 25(OH) 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.

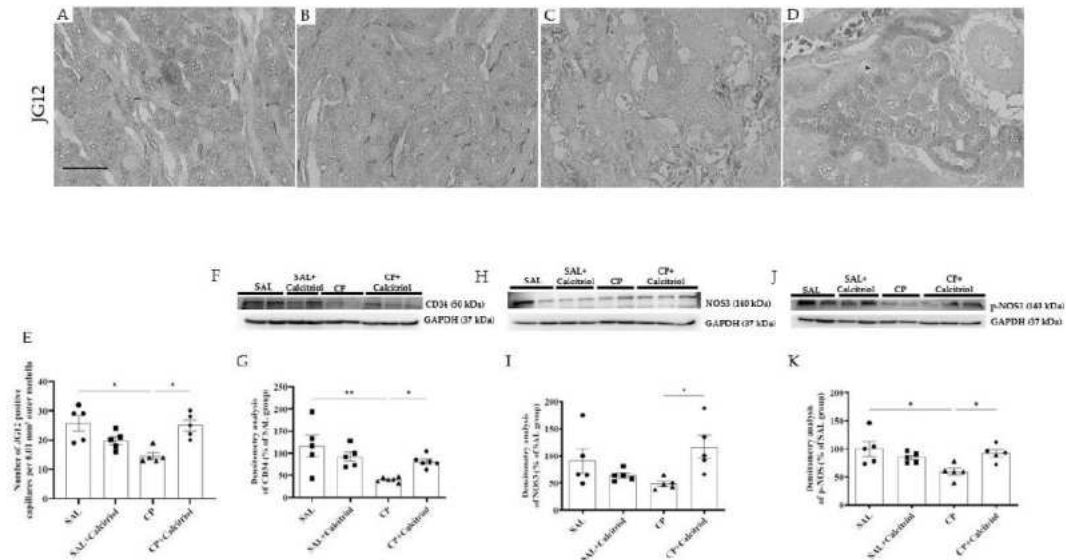


Figure 5. Immunolocalization of JG12 (A–D) in the renal outer medulla of the SAL (A), SAL + calcitriol (B), CP (C) and CP + calcitriol (D) animals. The bar indicates 50 μm . The number of JG12-positive capillaries in all experimental groups' outer renal medulla (E). Western blot analysis of CD34 (F), 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 ($n = 5\text{--}8$ 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.

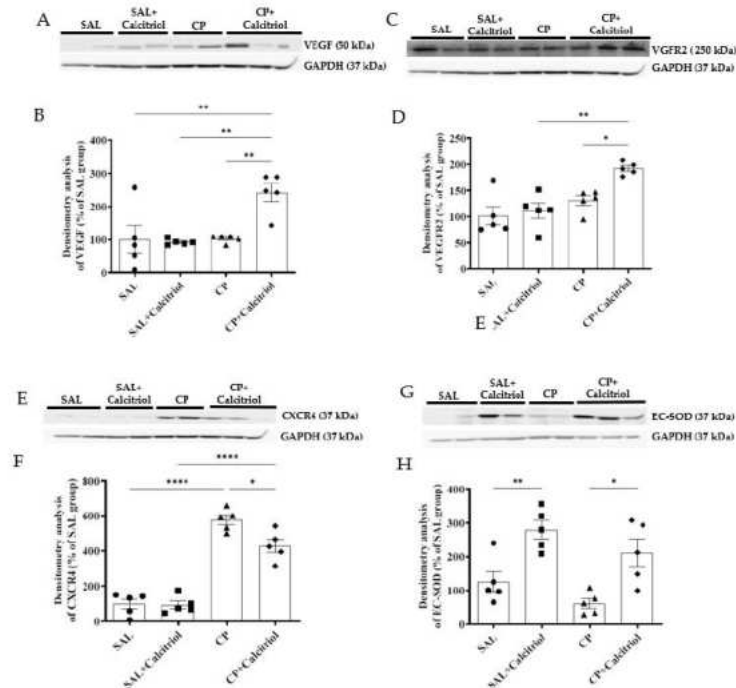


Figure 6. Western blot analysis of VEGF (A), VEGFR2 (C), CXCR4 (E) and EC-SOD (G) in the renal tissue from all experimental groups (SAL, SAL + calcitriol, CP, CP + calcitriol). Densitometry of VEGF (B), VEGFR2 (D), CXCR4 (F) and EC-SOD (H). The densitometric ratio between VEGF, VEGFR2, CXCR4, EC-SOD 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.; Adebisi, 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 nebivolol 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: Extraskelatal 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.; Hande, 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.; Francescato, 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.; Khosravi, 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. Cyp11b1 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](#)]

APÊNDICE C - Artigo publicado como coautora na revista *Nutrition & Diabetes*


Nutrition & Diabetes

www.nature.com/nutd

ARTICLE OPEN



Vitamin D deficiency contributes to the diabetic kidney disease progression via increase ZEB1/ZEB2 expressions

Cláudia Silva Souza¹ [✉], Amanda Lima Deluque¹, Beatriz Magalhães Oliveira¹, Ana Livia Dias Maciel¹, Cleonice Giovanini¹, Patrícia Aline Boer², Francisco José Albuquerque de Paula³, Roberto Silva Costa³, Heloísa Della Colleta Franscicato¹, Lucas Ferreira de Almeida¹ and Terezila Machado Coimbra¹

© The Author(s) 2023

BACKGROUND: Diabetic kidney disease (DKD) remains one of the main causes of end-stage renal disease (ESRD) and mortality in diabetic patients worldwide. Vitamin D deficiency (VitDD) is one of the main consequences of different chronic kidney disease (CKD) types and is associated with rapid progression to ESRD. Nevertheless, the mechanisms that lead to this process are poorly understood. This study aimed to characterize a model of diabetic nephropathy progression in VitDD and the epithelial-mesenchymal-transition (EMT) role in these processes.

METHODS: *Wistar Hannover* rats received a diet with or without VitD before type 1 diabetes (T1D) induction. After this procedure, the rats were accompanied for 12 and 24 weeks after T1D induction and the renal function, structure, cell transdifferentiating markers and zinc finger e-box binding homeobox 1/2 (ZEB1/ZEB2) contribution to kidney damage were evaluated during the DKD progression.

RESULTS: The results showed an increase in glomerular tuft, mesangial and interstitial relative areas and renal function impairment in VitD-deficient diabetic rats compared to diabetic rats that received a VitD-containing diet. These alterations can be associated with increased expression of EMT markers, ZEB1 gene expression, ZEB2 protein expression and TGF- β 1 urinary excretion. Decreased miR-200b expression, an important post-transcriptional regulator of ZEB1 and ZEB2 was also observed.

CONCLUSION: Our data demonstrated that VitD deficiency contributes to the rapid development and progression of DKD in diabetic rats induced by increase ZEB1/ZEB2 expressions and miR-200b downregulation.

Nutrition and Diabetes (2023)13:9; <https://doi.org/10.1038/s41387-023-00238-2>

INTRODUCTION

Diabetic kidney disease (DKD) is the most frequent and severe diabetic chronic complication [1]. Renal fibrosis is the endpoint of the progressive lesions in the DKD that can lead to end-stage renal disease (ESRD) [2]. The epithelial-mesenchymal-transition (EMT) is a critical mechanism for the progression of fibrosis in the diabetic kidney [3]. EMT is characterized by the loss of the cell epithelial markers and the acquisition of a mesenchymal phenotype [4]. The transforming growth factor beta (TGF- β) is the main inducer of the EMT process by signaling pathways that are dependent or independent of Smad proteins [5]. During this fibrotic process, the TGF- β leads, among other factors, to the increase of zinc finger e-box binding homeobox 1/2 (ZEB1/2) proteins expressions [5]. ZEB1 and ZEB2 act as transcription co-repressors [6] and can promote cell proliferation, transdifferentiating, migration and invasion [7] which are important events of the EMT. In this sense, studies demonstrated an increase of ZEB1/2 expressions TGF- β 1-induced during tubular EMT in vitro [6, 8]. These studies also demonstrated a significant increase in ZEB1/ZEB2 expression in the kidneys of rats with chronic kidney disease (CKD) induced by unilateral ureteral obstruction (UO) [6, 8]. Sene et al.

demonstrated an increase in ZEB2 gene expression in isolated glomeruli in fetal-programmed adult rats with low protein levels independent of increases in TGF- β expression [9].

MicroRNAs (miR) are small endogenous non-coding RNA molecules, with a length of 21–25 nucleotides and act by binding to the gene 3'-UTR region inhibiting translation or inducing the degradation of the mRNA target [10]. MiR-200 family, which includes five members (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 and miR-429) epigenetically regulates both ZEB1 and ZEB2 [11]. The ZEB1 and ZEB2 mRNA have eight and nine sites in the 3'UTRs for the miR-200 family, respectively, that bind to these regions and repress ZEB1/2 transcription and translation, impairing the EMT evolution [6, 12]. It has been demonstrated that downregulation of miR-141, miR-200a, miR-200b, and miR-429 were related to EMT in isolated glomeruli of fetal-programmed adult rats with low protein levels [9]. Additionally, Xiong et al. (2012) showed that miR-200 family all members were downregulated during renal tubular EMT both in vivo in the UO model and in vitro using NRK-52E cells (rat renal tubular epithelial cells) [8].

VitD deficiency emerged as a risk factor for the development of type one diabetes (T1D) and DKD [13]. The kidney is one of the

¹Department of Physiology of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil. ²Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil. ³Department of Internal Medicine of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil. ✉email: cau.souzaa07@gmail.com

Received: 26 December 2022 Revised: 30 May 2023 Accepted: 20 June 2023
Published online: 01 July 2023

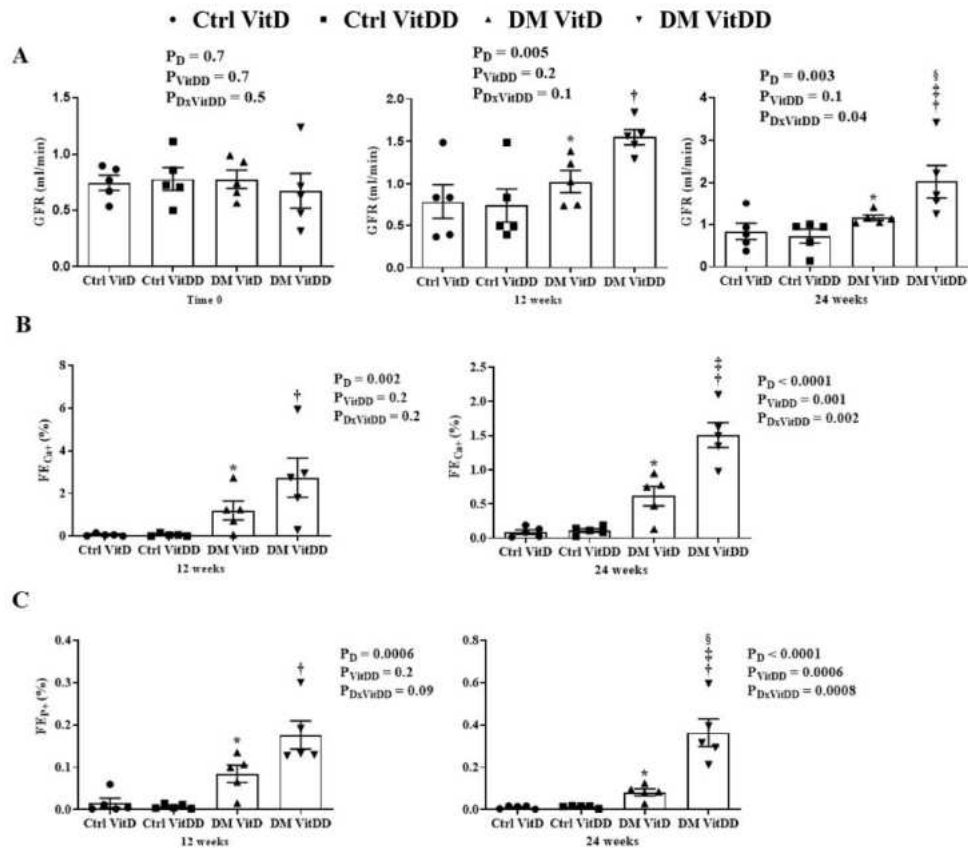


Fig. 1 Renal function of control (Ctrl) and diabetic (DM) rats deficient in vitamin D (VitDD) or not (VitD). **A** Glomerular Filtration Rate (GFR). **B** Fractional Excretion Calcium (FE_{Ca}). **C** Fractional Excretion Phosphorus (FE_P). *versus Ctrl VitD, †versus Ctrl VitDD, ‡versus DM VitD, §versus DM VitDD of 12 weeks after diabetes induction. P_D interaction between DM VitD and Ctrl VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; P_{VitDD} interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; $P_{D \times VitDD}$ interaction between DM VitDD and DM VitD.

main sites where VitD changes in its active metabolite, the 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃ [1 α ,25(H)₂D₃] [14]. The main physiological role of 1 α ,25(H)₂D₃ is the maintenance of extracellular levels of calcium (Ca²⁺) and phosphorus (P³⁺) ions in the body [15]. In addition, it was observed that VitD is important for maintaining the podocyte structure, prevention of EMT and reducing albuminuria [5]. Its deficiency has been widely reported in clinical and experimental studies of CKD associated or not with diabetes mellitus (DM) [15–17]. Even with VitD replacement and current therapies to retard progression to ESRD, mainly based on glycemic and blood pressure control, the incidence of DKD is still increasing. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of the VitD deficiency in the progression of DKD and the ZEB1 and ZEB2 contribution to this process in rats with T1D.

MATERIALS AND METHODS

Animals, VitD deficiency and diabetes induction

The experiments were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Ribeirão Preto Medical School at São Paulo University, with protocol number 002/2019. Forty-eight *Wistar Hannover* rats (180–200 g)

were housed under controlled environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle, 22 ± 2 °C) with food and water *ad libitum*. The rats were divided into two groups with 24 rats/each: one group received a standard diet, that consisted of a ration produced according to the AIN-93G protocol, including 1,000.0 IU/kg of VitD₃ (VitD) and another group received a VitD₃-free diet (VitDD). The composition of the diets is available in Reeves et al. (1993) [18]. Six weeks after the VitD or VitDD diet introduction, the T1D induction was performed by the administration of a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; Sigma Aldrich, USA; 45 mg/kg, diluted in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5) after 12 h of fasting. The control groups received a single intraperitoneal injection of diluent. Seventy-two hours after STZ administration, diabetes induction (DI) was confirmed by fasting blood glucose (FBG) evaluation. All rats presented FBG equal to or greater than 250 mg/dL and were considered diabetic [19–24]. After that, the rats remained for 12 or 24 weeks fed a VitD or VitDD diet. The rats were then subdivided into 4 groups: control fed with a VitD diet (Ctrl VitD; $n = 10$), control fed with a VitDD diet (Ctrl VitDD; $n = 10$), diabetic fed with a VitD diet (DM VitD; $n = 14$), and diabetic fed with a VitDD diet (DM VitDD; $n = 14$). At 12 and 24 weeks after vehicle or STZ injections, the rats were euthanized under anesthesia using xylazine (0.1 ml/100 g) and ketamine (0.05 ml/100 g). All diabetic rats received 1 U/day of NPH insulin (Humulin[®], Lilly) to maintain a blood glucose level of around 300–350 mg/dL simulating a decompensated blood glucose that occurs in humans [25].

Table 1. Histology renal data of controls (Ctrl) and diabetic (DM) rats vitamin D deficient (VitDD) or not (VitD).

Variable	GROUP				ANOVA		
	Ctrl VitD	Ctrl VitDD	DM VitD	DM VitDD	P_D	P_{VitDD}	$P_{D \times VitDD}$
Glomerular tuft area (μm^2)							
12 weeks	5097 ± 182	5577 ± 324	5764 ± 109	5965 ± 200	0.05	0.1	0.5
24 weeks	5799 ± 22	5648 ± 98	6550 ± 86 ^a	7148 ± 175 ^{b,c}	0.003	0.06	< 0.0001
Fractional mesangial area							
12 weeks	0.06 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.5	0.7	0.5
24 weeks	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.03	0.13 ± 0.01 ^d	0.18 ± 0.01 ^{b,c,d}	0.08	0.02	0.0002
Relative interstitial area (%)							
Cortex							
12 weeks	0.0(0.0;0.6)	0.0(0.0;0.8)	0.4(0.2;0.8)	0.4(0.0;1.2)			
24 weeks	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.7	3.7 ± 1.0 ^d	11 ± 2.6 ^{b,c,d}	0.001	0.09	0.02
Medulla							
12 weeks	0.0(0.0;0.5)	0.0(0.0;0.8)	0.6(0.1;0.8)	0.6(0.0;1.4)			
24 weeks	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.8	8.6 ± 1.3 ^d	14 ± 2.4 ^{b,c,d}	0.06	0.07	< 0.0001

Table 1. Data are presented as mean ± SEM and in median (25th and 75th percentile), $n = 5$ /each.

^aversus Ctrl VitD.

^bversus Ctrl VitDD.

^cversus DM VitD.

^dversus respective 12 weeks group.

PD: interaction between DM VitD and Ctrl VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; PVitDD: interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; PDxVitDD: interaction between DM VitDD and DM VitD.

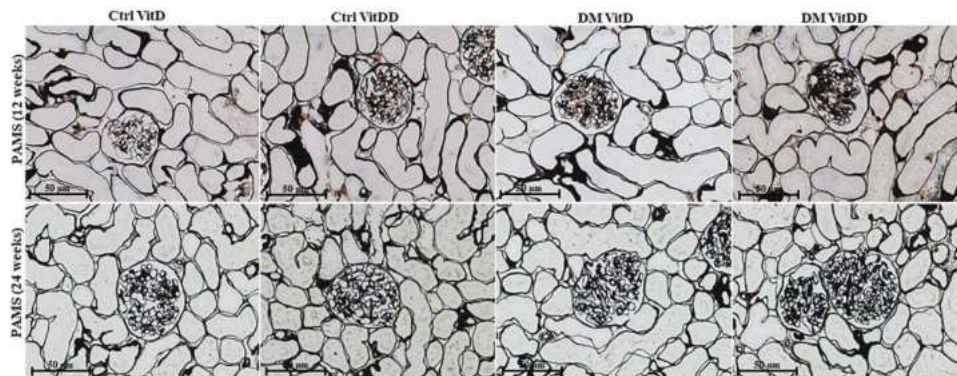


Fig. 2 Representative photomicrographs of glomerular histological changes staining with Periodic Acid Methenamine of Silver (PAMS) of control (Ctrl) and diabetic (DM) rats deficient in vitamin D (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. Original magnification $\times 400$.

Assessments of 25-hydroxyvitamin D, glycemia, parathyroid hormone, Ca^{2+} , and P^{2+} plasma and mean arterial pressure

Serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] was evaluated by the direct competitive test based on the chemiluminescence principle (CLIA) (DiaSorin, Liaison[®], Saluggia, Italy). Plasma glucose level was measured using a blood glucose monitoring system (ACCU-CHEK Active, Roche Diabetes Care GmbH). Parathyroid hormone (PTH) was determined in serum samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit according to the manufacturer's guidelines (Rat Intact PTH ELISA—Quidel, USA). The Ca^{2+} and P^{2+} in the plasma and urine were quantified by colorimetric method (Kit Labtest Diagnostica S.A) and the excretion fractions of these ions were calculated. Mean arterial pressure (MAP) measurements were performed every 4 weeks by tail plethysmography (CODA Non-Invasive Blood Pressure System, Kent Scientific Corporation, 2010).

Renal function

The glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the creatinine clearance. Creatinine plasma and urine levels were determined using the colorimetric method (Kit Labtest Diagnostica S.A). Urinary albumin excretion (UAE) was evaluated by electroimmunoassay [26].

Renal structure

Kidney fragments collected at the time of euthanasia were immersed in a methacarn solution (60% methanol, 30% chloroform and 10% acetic acid) for 24 h. After this period, the solution was replaced by 70% alcohol. Kidney tissue was embedded in paraffin and histological sections $4 \mu\text{m}$ thick were stained with Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) and Masson's Trichrome (MT). PAMS staining was used to determine glomerular tufts areas and fractional mesangial areas evaluated in 50 glomeruli of the renal tissue biopsy in consecutive microscopic fields.

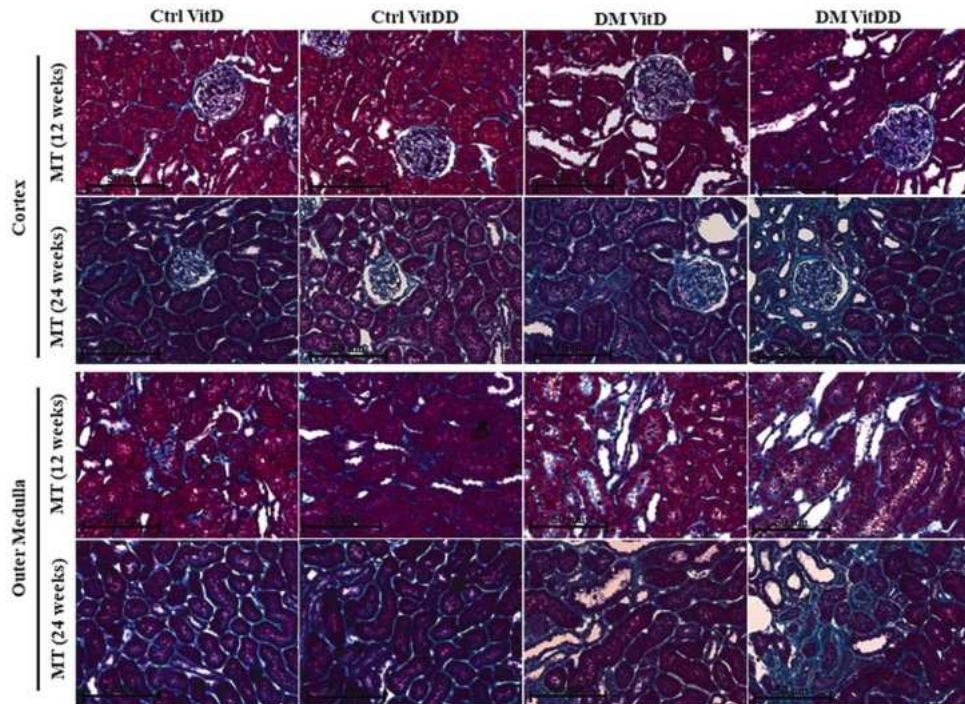


Fig. 3 Representative photomicrographs of relative interstitial area staining with Masson's Trichrome (MT), of control (Ctrl) and diabetic (DM) rats deficient in vitamin D (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. Original magnification $\times 400$.

(0.267 mm^2). The relative interstitial area was determined by the quantification of the fibrosis area in 30 consecutive microscopic fields (0.267 mm^2) in the renal cortex and 20 consecutive microscopic fields in the outer medulla from tissue stained with MT. The results were expressed as a percentage of the area marked for MT corrected for the total area of the field [27]. The analysis corresponding to glomerular tufts, mesangial expansion and fibrosis areas was performed by computerized morphometry using the ImageJ 1.44p program (National Institute of Health, USA). The images were acquired using the Zeiss Axio microscope coupled with an AxioCam MRc (AxioVision Release 4.8.3; Zeiss, Germany).

Immunohistochemistry studies

Immunohistochemistry studies were performed on fragments of $4\text{-}\mu\text{m}$ -thick paraffinized renal tissue mounted on glass slides coated with Entellan[™] (Merck Millipore). Kidney sections were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-desmin (1:100, Dako, Denmark), anti-vimentin (1:200, Dako, Denmark) and anti-alpha-smooth muscle actin (α -SMA, 1:200, Dako, Denmark). Secondary antibodies were used according to the primary antibody. The sections of renal tissue were revealed with avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, USA) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma, USA). The sections were counterstained with methyl green. The evaluations of the immunoreaction for desmin (50 glomeruli), vimentin (30 cortical fields), and alpha-smooth muscle actin (α -SMA, 30 cortical and 20 outer medulla interstitial fields) were performed by computational morphometry using ImageJ 1.44p program (National Institute of Health, USA) and the results expressed as the percentage of the marked area for each of these antibodies. The results corresponding to the desmin immunostaining area were corrected for the corresponding glomerular tuft area and vimentin and α -SMA for the total area of the cortex and medulla per field. The average values per sample were calculated and expressed as a percentage [27].

Western blotting studies

Renal tissue homogenate was obtained from a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, pH 10, 1 mM sodium pyrophosphate, 25 mM sodium fluoride, 0.001 M EDTA, pH 8) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma, USA). Samples were incubated at 4°C for 15 min and then centrifuged at 2000g and protein concentrations were quantified using the Bradford assay method (Quick Start[™] Bradford 1x Dye Reagent—Bio-Rad) [28]. Proteins were separated on a 10% polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane overnight at 4°C , and blocked for 60 minutes with 5% skim milk diluted in TBST (Tris, NaCl, EDTA/L, and Tween-20), and incubated with the following primary antibodies: anti-VitD receptor (VDR, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-ZEB2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) and anti-Smad2/3 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA). To assess the equivalence of protein loading and/or transfer, membranes were also incubated with anti-GAPDH polyclonal antibody (1:1000, Cell Signaling, USA). Finally, the membranes were washed and incubated with polyclonal anti-rabbit IgG (1:5000, Dako, Denmark) or anti-mouse monoclonal IgG antibodies (1:5000, Dako, Denmark) conjugated to peroxidase for 1 h at room temperature. Membrane-bound antibodies were detected using the chemiluminescent substrate Supersignal West Pico (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA). The intensity of the bands was identified and quantified by densitometry using ImageJ NIH software and the results were presented in arbitrary units.

ZEB1/2 and miR-200a/b/c gene expression

Gene expression studies were performed as described by Sene et al. [9]. Briefly, RNA total renal tissue was extracted from all groups ($n = 5/\text{each}$) using Trizol reagent (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's guidelines, and quantity was determined using Agilent Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, USA). Reverse transcription (RT) of

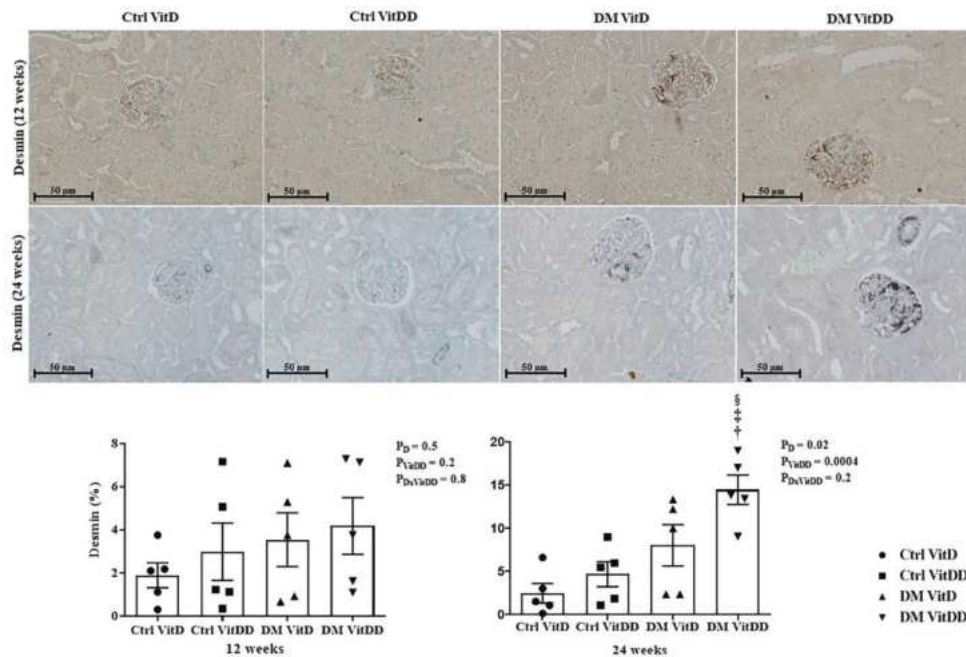


Fig. 4 Immunolocalization and quantification for desmin in the glomeruli of controls (Ctrl) and diabetic (DM) rats vitamin D deficient (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. ¹versus Ctrl VitDD, ²versus DM VitD, ³versus DM VitDD of 12 weeks after diabetes induction. P_D interaction between DM VitD and Ctrl VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; P_{VitDD} interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; $P_{DM VitDD}$ interaction between DM VitDD and DM VitD. Original magnification $\times 400$.

ZEB1/2 and miR-200a/b/c was performed using High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, USA) and TaqMan[®] microRNA RT kit combined with Stem-loop RT Primers (Life Technologies, USA), according to the instructions specified by the manufacturer, respectively. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used for the analysis of ZEB1/2 mRNAs and miR-200a/b/c expressions. The RT-qPCR for ZEB1/2 was carried out with SYBR green[®] Master Mix (Merck, Germany) and miR-200a/b/c was performed using TaqMan[®] MicroRNA Assay (Life Technologies, USA). The StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystem, USA) was used to perform the RT-qPCR reactions. The differential expression of mRNA for ZEB1/2 and miR-200a/b/c was compared between the DM VitD and DM VitDD groups and their respective control groups. Normalization of ZEB1/2 mRNA expression was performed by GAPDH and for miR-200a/b/c by small nuclear RNA (snRNA) U6 and U87 reference genes. Relative gene expression was evaluated by comparative quantification using StepOne[™] v2.1 Software (Applied Biosystem, USA) and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. All primer sequences used are available in Sene et al (2013) [9].

TGF- β 1 measurements

The TGF- β 1 levels were measured in renal tissue lysate (as described in the section on western blotting studies) and in urine samples from the bladder. This profibrotic cytokine was measured in both biological materials using ELISA kits according to the manufacturer's guidelines (Promega, USA). Bladder urine was treated with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, USA) after collection and stored at -70°C until analysis [28].

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and with medians and percentiles 25 and 75. The data with normal distribution were submitted to the Two-Way Analysis of Variance followed by the Bonferroni multiple comparison test. Data that did not present a

normal distribution were subjected to the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn multiple comparisons test. Student's *t* test was used for intragroup comparisons between different experimental times. The level of significance was set at $P < 0.05$. Statistical analyzes were performed using Graph Pad Prism version 9.0 for Windows (Graph Pad Software, La Jolla, USA).

RESULTS

Experimental model characterization

The rats of Ctrl VitDD and DM VitDD groups were deficient in VitD at baseline (Time 0), 12 and 24 weeks after diabetes induction or citrate injection ($P < 0.0001$) (Supplementary Fig. 1A). Fasting blood glucose (FBG) was maintained between 300 and 350 mg/dL in diabetic animals throughout the experimental protocol ($P < 0.0001$) (Supplementary Table 1). There were no statistical differences in serum PTH levels, in Ca^{2+} and P^{3-} plasma between the experimental groups of 12 weeks and 24 weeks ($P > 0.05$) (Supplementary Fig. 1B–D). Eight weeks after diabetes induction, was observed a gentle increase in MAP in the DM VitDD group when compared to the Ctrl VitDD and DM VitD groups ($P = 0.04$) (Supplementary Table 1). The rats of Ctrl VitDD and DM VitDD presented a significant reduction of VDR protein expression 24 weeks after diabetes induction when compared to Ctrl VitD and DM VitD groups ($P = 0.0007$) (Supplementary Fig. 1E).

Kidney function

The rats of DM VitD and DM VitDD groups showed an increase in GFR at 12 weeks after diabetes induction when compared to their respective controls ($P = 0.005$) (Fig. 1A). Twenty-four weeks after

6

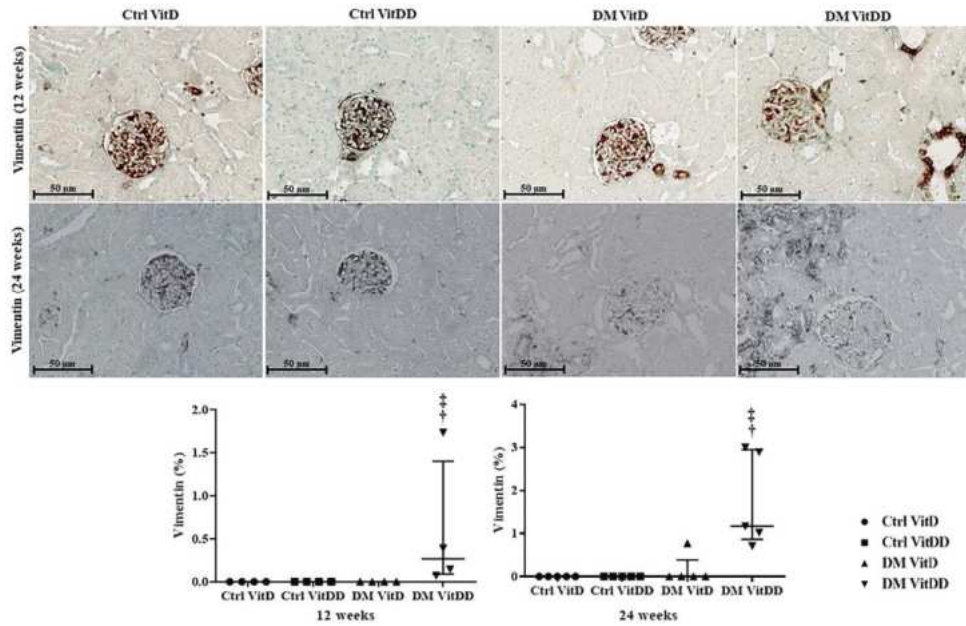


Fig. 5 Immunolocalization and quantification for vimentin in the cortex of controls (Ctrl) and diabetic (DM) rats vitamin D deficient (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. [†]versus Ctrl VitDD, [†]versus DM VitD. P_{D} : interaction between DM VitD and Ctrl VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; P_{VitDD} : interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; $P_{DMVitDD}$: interaction between DM VitDD and DM VitD. Original magnification $\times 400$.

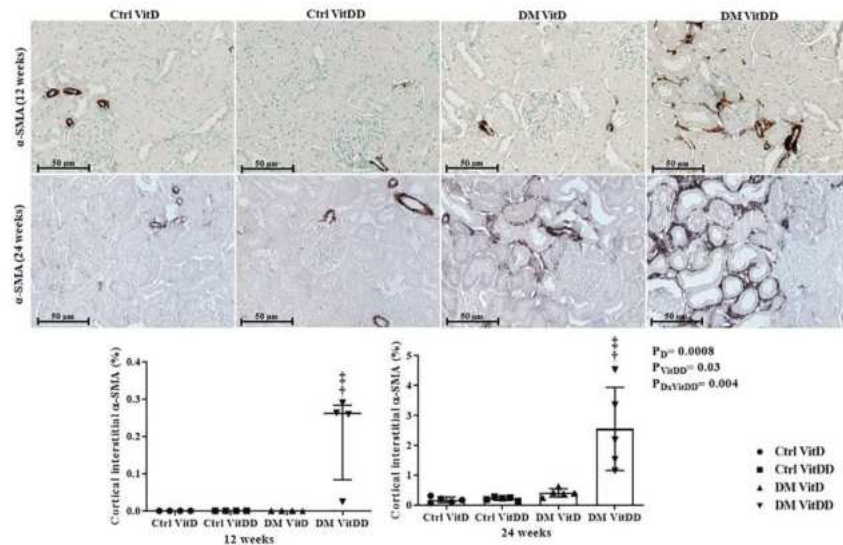


Fig. 6 Immunolocalization and quantification for α -SMA in the cortex of controls (Ctrl) and diabetic (DM) rats vitamin D deficient (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. [†]versus Ctrl VitDD, [†]versus DM VitD. P_{D} : interaction between DM VitD and Ctrl VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; P_{VitDD} : interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; $P_{DMVitDD}$: interaction between DM VitDD and DM VitD. Original magnification $\times 400$.

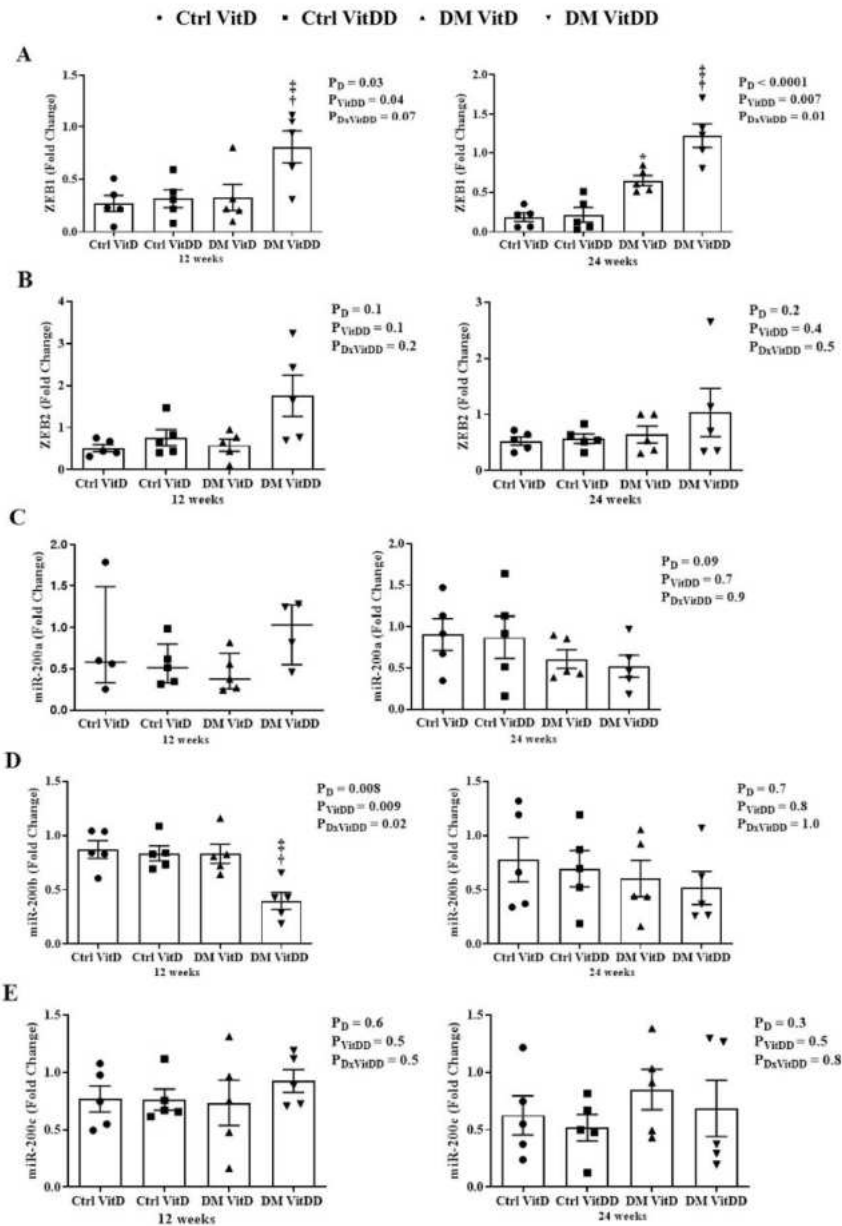


Fig. 7 Gene expression of the epithelial-mesenchymal transition process regulators in renal tissue of controls (Ctrl) and diabetic (DM) rats vitamin D deficient (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. **A** ZEB1, **B** ZEB2, **C** miR-200a, **D** miR-200b, and **E** miR-200c transcripts levels. [†]versus Ctrl VitDD, [‡]versus DM VitD. PD: interaction between DM VitD and Ctrl VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; P_{VitDD}: interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; P_{DxVitDD}: interaction between DM VitDD and DM VitD.

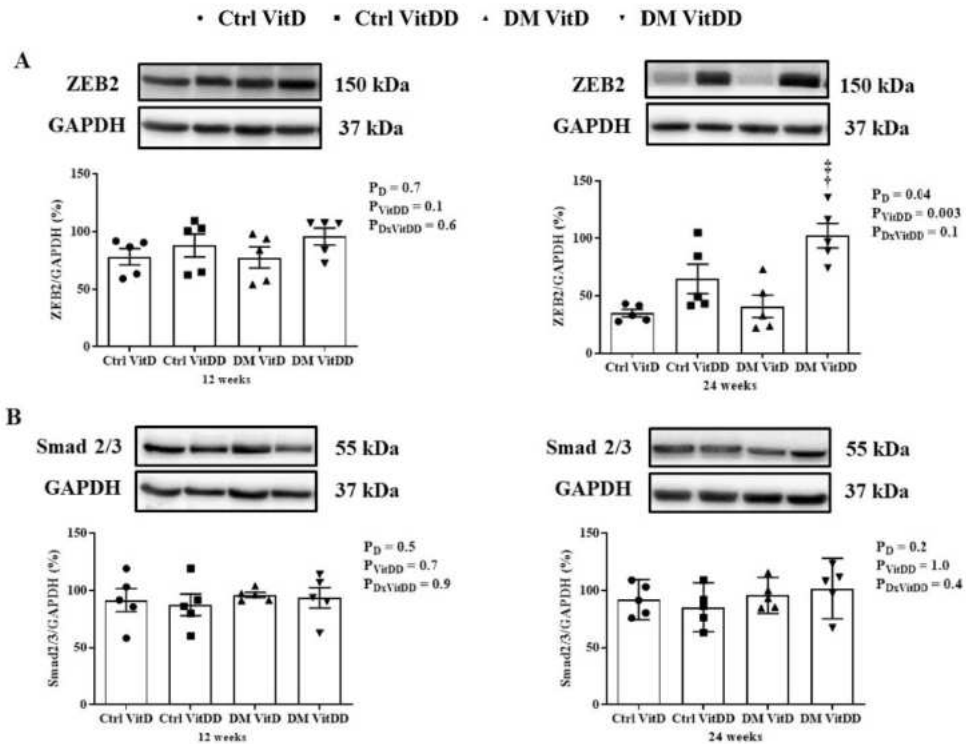


Fig. 8 Protein expression of the epithelial-mesenchymal transition markers in renal tissue of control (Ctrl) and diabetic (DM) rats vitamin D deficient (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. **A** ZEB2 and **B** Smad2/3 protein levels. ¹versus Ctrl VitDD, ²versus DM VitD. PD: interaction between DM VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; PVitDD: interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; PDxVitDD: interaction between DM VitDD and DM VitD.

the diabetes induction, VitD deficiency contributed to the GFR remained high in the DM VitDD group compared to CtrlVitD and DM VitD groups (interaction between diabetes and VitDD, $P < 0.04$) (Fig. 1A). A progressive increase in UAE was observed in DM VitD and DM VitDD groups when compared with their respective controls ($P < 0.05$) (Supplementary Table 1). An increase in the fractional excretion calcium ($FE_{Ca^{2+}}$) ($P = 0.002$, $P = 0.002$, respectively) and phosphorus ($FE_{P^{3+}}$) ($P = 0.0006$, $P = 0.0008$, respectively) at 12 and 24 weeks after the diabetes induction in the DM VitDD group was evidenced when compared to the Ctrl VitDD and DM VitD groups (Fig. 1B, C). At 24 weeks after the diabetes induction, the increase in the fractional excretion of these ions was directly influenced by VitD deficiency (interaction between diabetes and VitDD, $P = 0.002$ and $P = 0.0008$, respectively) (Fig. 1B, C).

Kidney structure

The morphometric data showed an increase in the glomerular tuft area in DM VitD and DM VitDD groups 24 weeks after diabetes induction compared to the respective controls ($P < 0.0001$). Nevertheless, this change was higher in diabetic VitD-deficient rats than in diabetic rats with normal VitD levels (interaction between diabetes and VitDD, $P < 0.0001$) (Table 1, Fig. 2). Vitamin deficiency also led to an increase in fractional mesangial, cortical and medullary relative tubulointerstitial areas in the DM VitDD group when compared to the Ctrl VitDD and DM VitD groups 24 weeks after diabetes induction (interaction between diabetes

and VitDD, $P = 0.0002$, $P = 0.02$, $P < 0.0001$, respectively) (Table 1, Figs. 2, 3). No statistical differences in these changes between the experimental groups of 12 weeks were observed ($P > 0.05$) (Table 1, Figs. 2, 3).

EMT expression

The DM VitDD group showed a significant increase in desmin immunostaining at 24 weeks after diabetes induction ($P = 0.0004$) (Fig. 4) compared to rats of the Ctrl VitDD and DM VitD groups. The same observation was made for vimentin at 12 and 24 weeks after diabetes induction ($P = 0.002$, $P = 0.001$, respectively) (Fig. 5). Increased immunostaining for cortical α -SMA at 12 weeks after diabetes induction was observed when compared to rats of the Ctrl VitDD and DM VitD groups ($P = 0.002$) (Fig. 6). Furthermore, VitD deficiency led to increase in the cortical and outer medulla expression of α -SMA at 24 weeks after diabetes induction when compared to the Ctrl VitDD and DM VitD groups (interaction between diabetes and VitDD, $P = 0.004$, $P = 0.03$, respectively) (Fig. 6, Supplementary Fig. 2).

ZEB1/2 and miR-200a/b/c gene expression

The DM VitDD group presented an increase in ZEB1 gene expression at 12 weeks ($P = 0.04$) after diabetes induction compared to Ctrl VitDD and DM VitD groups (Fig. 7A). At 24 weeks, VitD deficiency favored increased expression of ZEB 1 in the DM VitDD group compared to Ctrl VitDD and DM VitD groups

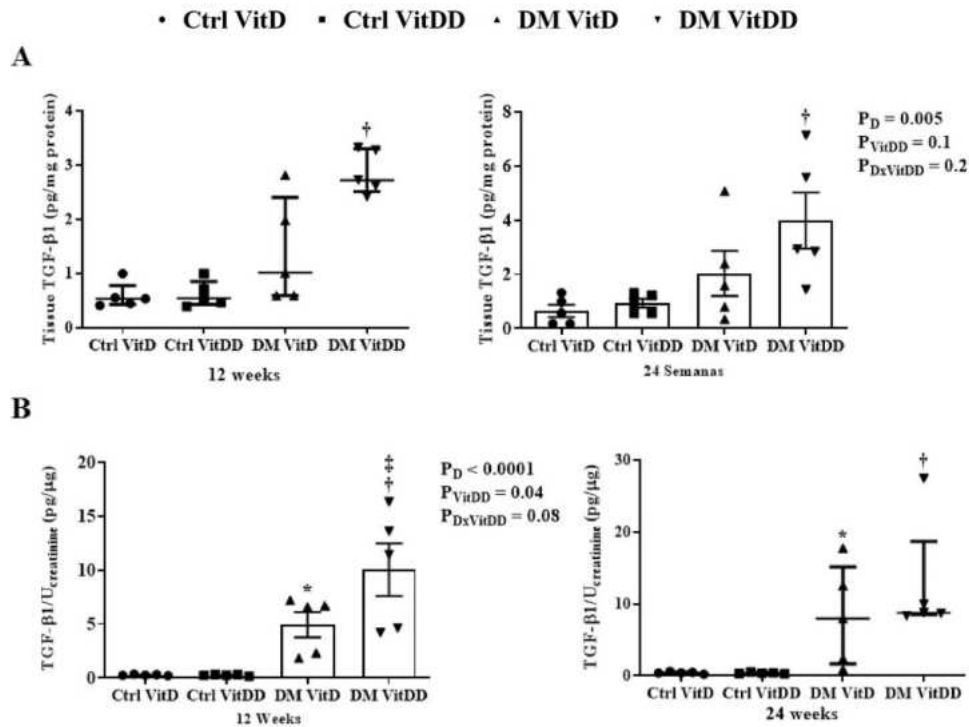


Fig. 9 TGF- β 1 levels in renal tissue and urine of control (Ctrl) and diabetic (DM) rats vitamin D deficient (VitDD) or not (VitD) at 12 and 24 weeks after diabetes induction. **A** Renal tissue levels and **B** urinary excretion of TGF- β 1. *versus Ctrl VitD, †versus Ctrl VitDD, ‡versus DM VitD. PD: interaction between DM VitD and Ctrl VitD and DM VitDD and Ctrl VitDD; PVitDD: interaction between Ctrl VitDD and Ctrl VitD and DM VitDD and DM VitD; PDxVitDD: interaction between DM VitDD and DM VitD.

(interaction between diabetes and VitDD, $P = 0.01$) (Fig. 7A). Vitamin D deficiency also led to a reduction in miR-200b gene expression in the DM VitDD group compared to Ctrl VitDD and DM VitD groups at 12 weeks after diabetes induction (interaction between diabetes and VitDD, $P = 0.02$) (Fig. 7D). No statistical difference was observed for ZEB2 mRNA, miR-200a/c between the experimental groups either (Fig. 7B, C, E).

ZEB2 and Smad2/3 protein expression

The DM VitDD group presented an increase of ZEB2 protein expression at 24 weeks after diabetes induction compared to Ctrl VitDD and DM VitD groups ($P = 0.003$) (Fig. 8A). No statistical difference for Smad2/3 between the experimental groups was observed ($P > 0.05$) (Fig. 8B).

TGF- β 1 levels

The tissue levels and urinary excretion TGF- β 1 were higher in the rats of the DM VitD and DM VitDD groups when compared to Ctrl VitD and Ctrl VitDD groups ($P < 0.05$) (Fig. 9A, B). However, this increase was more intense in the DM VitDD group (Fig. 9A, B) and significantly different in urinary excretion at 12 weeks compared to the DM VitD group ($P = 0.04$) (Fig. 9B).

DISCUSSION

This study evaluated the VitD deficiency influence in the progression of DKD and the ZEB1/ZEB2 contribution in this process. Our results

demonstrated that VitD-deficient diabetic rats have an increase in the renal structural changes, in the transdifferentiating markers in the different kidney cells, ZEB1/2 expressions, TGF- β 1 levels, a decrease in renal function and miR-200b downregulation compared to the diabetic rats with normal VitD levels.

Our data demonstrated an increase in blood pressure (BP) in VitD-deficient diabetic rats eight weeks after diabetes induction. Clinical and experimental studies have reported an increased prevalence of hypertension associated with VitD deficiency [29, 30]. In a previous study by our laboratory, it was demonstrated that the increase in BP of the adult offspring of mothers submitted to VitD deficiency during pregnancy and the period of renal development was related to the increase in the renin renal tissue expression and of the receptor for type 1 angiotensin II [28]. Andersen et al. (2015) demonstrated that VitD depletion led to increasing endogenous and human renal expression of renin mRNA in dTGR rats (double-transgenic rats expressing human renin and angiotensinogen) and increased hypertension in this experimental model [29].

In the 24th week after the diabetes induction, we observe a reduction in VDR expression in the VitD-deficient rats. As in our findings, Bragança et al. (2018) also showed reduced VDR expression in VitD-deficient 5/6 nephrectomized and sham rats [31]. Studies demonstrated that VDR-knockout mice increase the glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis in the UUO model [32], deteriorate renal function and tubular injury in cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) [33] and contribute to severe

albuminuria, worsen of tubular injuries, an increase of inflammation and to defective autophagy in the DKD [34].

Hypovitaminosis D is frequently related to the development of mild albuminuria [13], sustained decline in the renal function and increase glomerular and tubular lesions in diabetic patients [35–37]. In our study, VitD deficiency worsens changes in renal structure and function in diabetic rats. Previous reports demonstrated that VitD deficiency increases glomerulosclerosis and relative interstitial area, and impairs renal function in the progression to CKD after ischemia/reperfusion (I/R) and in the 5/6 nephrectomized rats [31, 38]. Studies suggest that these alterations occur due to a lower VDR modulation [39], local overactivation of the renin angiotensin aldosterone system [28, 32, 40] and/or secondary factors such as elevated PTH levels in VitD deficiency [41]. However, the mechanisms by which VitD deficiency contributes to the worsen of these changes, mainly in DKD, should be further explored.

The EMT is an important mediator in the development and progression of DKD [4, 5]. During this fibrotic process, the renal cells change their phenotype to myofibroblasts and start to express mesenchymal marker-positive epithelial cells such as desmin, vimentin and α -SMA [42]. Our data demonstrated an increase in EMT in the VitD-deficient diabetic rats. Similar to our findings, previous studies have also demonstrated that VitD deficiency is related to increase expression of vimentin and α -SMA in tubular and tubulointerstitial cells, respectively, of the rats submitted to a high-fat diet [43] and in rats euthanized sixty days after I/R renal injury [38]. An increase in the desmin, vimentin and α -SMA expressions may contribute to the accumulation of ECM and consequent glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis considered the end common pathway to all progressive kidney diseases and which can culminate in ESRD [42, 44]. Despite this, the mechanisms that lead to the accumulation of these proteins in a DKD model in VitD deficiency are still poorly studied. In our study, we investigated the ZEB1/2 participation, an important transcriptional co-repressors related to the EMT process. Our data demonstrated an increase in the expression of these transcription factors. Associated with this, was observed an increase in TGF- β 1 levels and miR-200b downregulation in VitD-deficient diabetic rats, main regulators of ZEB1/2 expression.

The relevance of both ZEB proteins is mainly due to their roles in tumorigenesis related to cell proliferation and tumor invasion, metastasis and resistance to chemotherapy drugs [45]. ZEB1/2 bind directly to the promoter of genes encoding epithelial proteins, suppressing their expression while inducing the expression of proteins with mesenchymal characteristics [7]. Several studies have also demonstrated the importance of the ZEB1/2 signaling pathway in renal fibrosis [6, 8, 9, 46]. Wei et al. (2014) demonstrated that aldose reductase negatively regulates the miR-200a expression and this was associated with the upregulation of TGF1/2 and ZEB1/2 expressions and consequent increase in fibrogenesis and EMT in mesangial cell culture and diabetic mice [46]. Studies in renal tubular cells culture demonstrated that overexpression of all members of miR-200 family leads to the reduction of ZEB1/2 and TGF- β 1 gene and protein expression at the early stage of EMT [8], and miRNA-200b alone was able to suppress EMT induced by TGF- β 1 via reducing ZEB1/2 expression [47]. Additionally, in vitro studies demonstrated that miR-200b overexpression decreases the proliferation, migration and metastasis in lung [48] and breast [49] cancer cells. Taken together, these studies show that regulation of ZEB1/2 by the miR-200 family and TGF- β plays an essential role in renal EMT. To date, no studies were found showing the relationship between VitD deficiency and ZEB1/2 regulation in renal diseases. Nevertheless, it was demonstrated that VitD deficiency contributed to increasing expression of TGF- β 1 and ZEB1, which in turn, mediated EMT in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [50].

In conclusion, our data demonstrate that VitD deficiency provided a favorable condition for ZEB1/2 upregulation and miR-200b downregulation, which contributed to the EMT process

and consequently increase in the structure and function renal changes in diabetic rats.

DATA AVAILABILITY

The author confirms that all data generated or analyzed during this study are included in this published article.

REFERENCES

- Fouli GE, Gnudi L. The future: experimental therapies for renal disease in diabetes. *Nephron*. 2019;143:3–7.
- Srivastava SP, Hedayat AF, Kanasaki K, Goodwin JE. microRNA crosstalk influences epithelial-to-mesenchymal, endothelial-to-mesenchymal, and macrophage-to-mesenchymal transitions in the kidney. *Front Pharm*. 2019;10:904–17.
- Srivastava SP, Koya D, Kanasaki K. MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT. *Biomed Res Int*. 2013;2013:125469.
- Xu Y, Ouyang C, Lyu D, Lin Z, Zheng W, Xiao F, et al. Diabetic nephropathy exacerbates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) via miR-2467-3p/Twist1 pathway. *Biomed Pharmacother*. 2020;125:109920.
- Hua W, Dijke PT, Kostidis S, Giera M, Hornsveid M. TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77:2103–23.
- Pu J, Zhang Y, Zhou J. Effect of Hual Qi Huang on epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells through miR-200a. *Evid Based Complement Altern Med*. 2016;2016:8612190.
- Caja L, Tan EJ. Epithelium to Mesenchyme Transition. In: Boffetta P, Hainaut P, eds. *Encyclopedia of Cancer*. 3rd Edition. New York: Tisch Cancer Institute; Grenoble: Institute for Advanced Biosciences. Academic Press of Elsevier; 2019. p. 14–23.
- Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, et al. The miR-200 family regulates TGF- β 1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2012;302:F369–79.
- Sene LB, Mesquita FF, Moraes LN, Santos DC, Carvalho R, Gontijo JAR, et al. Involvement of Renal Corpuscle microRNA Expression on Epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. *PLoS ONE*. 2010;8:e71310.
- Guo C, Dong G, Liang X, Dong Z. Epigenetic regulation in AKI and kidney repair: mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15:220–39.
- Cavallari I, Ciccarese F, Sharova E, Urso L, Raimondi V, Silic-Benusi M, et al. The miR-200 family of microRNAs: fine tuners of epithelial-mesenchymal transition and circulating cancer biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2021;13:5874–907.
- Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer*. 2013;132:745–54.
- Felicio JS, Luz RM, Melo FC, Resende FS, Oliveira AF, Peixoto AS, et al. Vitamin D on early stages of diabetic kidney disease: a cross-sectional study in patients with type 1 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:149.
- Manucha W, Juncos LI. The protective role of vitamin D on the heart and the kidney. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2017;11:12–19.
- Thethi TK, Bajwa MA, Ghanim H, Jo C, Weir M, Goldfine AB, et al. Effect of paricalcitol on endothelial function and inflammation in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *J Diabetes Complications*. 2015;29:433–7.
- Hu X, Liu W, Yan Y, Liu H, Huang Q, Xiao Y, et al. Vitamin D protects against diabetic nephropathy: Evidence-based effectiveness and mechanism. *Eur J Pharm*. 2019;845:91–98.
- Joergensen C, Hovind P, Schmedes A, Parving HH, Rossing P. Vitamin D levels, microvascular complications, and mortality in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:1081–5.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939–51.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969;48:2129–39.
- Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Bohmer KP, Storz RB. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:71–9.
- Rodrigues AM, Bergamaschi CT, Araújo RC, Mouro MG, Rosa TS, Higa EM. Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type 1 diabetic rats. *Exp Biol Med*. 2011;236:1180–7.
- Culshaw GJ, Costello HM, Binnie D, Stewart KR, Czopek A, Dhaun N, et al. Impaired pressure natriuresis and non-dipping blood pressure in rats with early type 1 diabetes mellitus. *J Physiol*. 2019;597:767–80.

- C.S. Souza et al. 11
23. Derakhshanian H, Djazayeri A, Javanbakht MH, Eshraghian MR, Mirshafiey A, Zarei M, et al. The effect of vitamin D on cellular pathways of diabetic nephropathy. *Rep. Biochem Mol Biol.* 2019;7:217–22.
 24. Venkat P, Ning R, Zacharek A, Culmone L, Liang L, Landschoot-Ward J, et al. Treatment with an Angiotensin-1 mimetic peptide promotes neurological recovery after stroke in diabetic rats. *CNS Neurosci Ther.* 2021;27:48–59.
 25. Volpini RA, Giovanini C, Costa RS, Coimbra TM. Effect of enalapril and losartan on the events that precede diabetic nephropathy in rats. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003;19:43–51.
 26. Laurell CB. Electroimmuno assay. *Scand J Clin Lab Invest.* 1972;29:21–37.
 27. Souza CS, Oliveira BSS, Viana GN, Correia TML, Bragança AC, Canale D, et al. Preventive effect of exercise training on diabetic kidney disease in ovariectomized rats with type 1 diabetes. *Exp Biol Med.* 2019;244:758–69.
 28. Almeida LF, Francescato HDC, Antunes-Rodrigues J, de Paula FJA, Giovanni C, Costa RS, et al. Imbalance of pro- and anti-angiogenic factors due to maternal vitamin D deficiency causes renal microvasculature alterations affecting the adult kidney function. *Nutrients.* 2019;11:1929–44.
 29. Andersen LB, Przybyl L, Haase N, Versen-Höyneck F, Qadri F, Jorgensen JS, et al. Vitamin D depletion aggravates hypertension and target-organ damage. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001417.
 30. Darraj H, Badedi M, Poore KR, Hummadi A, Khawaji A, Solan Y, et al. Vitamin D deficiency and glycemic control among patients with type 2 diabetes mellitus in Jazan City, Saudi Arabia. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12:853–62.
 31. Bragança AC, Canale D, Gonçalves J, Shimizu MHM, Seguro AC, Volpini RA. Vitamin D deficiency aggravates the renal features of moderate chronic kidney disease in 5/6 nephrectomized rats. *Front Med.* 2018;5:282–97.
 32. Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:966–73.
 33. Hu Z, Zhang H, Yi B, Yang S, Liu J, Hu J, et al. VDR activation attenuate cisplatin induced AKI by inhibiting ferroptosis. *Cell Death Dis.* 2020;11:1–11.
 34. Li A, Yi B, Han H, Shikun Y, Hu Z, Zheng L, et al. Vitamin D-VDR (vitamin D receptor) regulates defective autophagy in renal tubular epithelial cell in streptozotocin-induced diabetic mice via the AMPK pathway. *Autophagy.* 2022;18:877–90.
 35. Schiller A, Gadalean F, Schiller O, Timar R, Bob F, Munteanu M, et al. Vitamin D deficiency prognostic marker or mortality risk factor in end stage renal disease patients with diabetes mellitus treated with hemodialysis—a prospective multicenter study. *PLoS ONE.* 2015;10:e0126586.
 36. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1911–30.
 37. Zhou T, Shen L, Li Z, Jia J, Xing H, Wang N, et al. Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency may predict poor renal outcomes in patients with biopsy-proven diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1–8.
 38. Gonçalves JG, Bragança AC, Canale D, Shimizu MHM, Sanches TR, Moyses RMA, et al. Vitamin D deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury. *PLoS ONE.* 2014;9:e107228.
 39. Zhang X, Song Z, Guo Y, Zhou M. The novel role of TRPC6 in vitamin D ameliorating podocyte injury in STZ-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2015;399:155–65.
 40. Chokhandre MK, Mahmoud MI, Hakami T, Jafer M, Inamdar AS. Vitamin D & its analogues in type 2 diabetic nephropathy: a systematic review. *J Diabetes Metab Disord.* 2015;14:58–68.
 41. Mäkitäipale J, Sankari S, Sievänen H, Laitinen-Vapaavuori O. The relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone concentration in assessing vitamin D deficiency in pet rabbits. *BMC Vet Res.* 2020;16:403–11.
 42. Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB, Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transpl.* 1997;12:43–50.
 43. Bernardo DRD, Canale D, Nascimento MM, Shimizu MHM, Seguro AC, Bragança AC, et al. The association between obesity and vitamin D deficiency modifies the progression of kidney disease after ischemia/reperfusion injury. *Front Nutr.* 2022;9:952028.
 44. Song Z, Xiao C, Jia X, Luo C, Shi L, Xia R, et al. Vitamin D/VDR protects against diabetic kidney disease by restoring podocytes autophagy. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2021;14:1681–93.
 45. Sánchez-Tillo E, Siles L, Cuatrecasas BOM, Vaquero EC, Castells A, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res.* 2011;1:897–912.
 46. Wei J, Zhang Y, Luo Y, Wang Z, Bi S, Song D, et al. Aldose reductase regulates miR-200a-3p/141-3p to coordinate Keap1-Nrf2, Tgfβ1/2, and Zeb1/2 signaling in renal mesangial cells and the renal cortex of diabetic mice. *Free Radic Biol Med.* 2014;67:91–102.
 47. Tang O, Chen XM, Shen S, Hahn M, Pollock CA. MiRNA-200b represses transforming growth factor-β1-induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2013;304:F1266–73.
 48. Jin HF, Wang JF, Song TT, Zhang J, Wang L. MiR-200b inhibits tumor growth and chemoresistance via targeting p70S6K1 in lung cancer. *Front Oncol.* 2020;10:643.
 49. Zheng Q, Cui X, Zhang D, Yang Y, Yan X, Liu M, et al. miR-200b inhibits proliferation and metastasis of breast cancer by targeting fucosyltransferase IV and α1,3-fucosylated glycans. *Oncogenesis.* 2017;6:e358.
 50. Li SR, Tan ZX, Chen YH, Hu B, Zhang C, Wang H, et al. Vitamin D deficiency exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis partially through aggravating TGF-β/Smad2/3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Respiratory Res.* 2019;20:266–76.
- ACKNOWLEDGEMENTS**
The authors are grateful to Marta Nakao for helping with 25(OH)D dosages, Ize Perhans de Lima for the support in carrying out the RT-qPCR experiments, and Guilherme de Paula Lemos and Flávio Henrique Leite for tissue processing and performing histological sections. This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 303252/2021-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Financing Code 001).
- AUTHOR CONTRIBUTIONS**
CSS and TMC designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript. CSS, ALD, BMO, ALDM, CG, HDCF, LFA participated in the collection of all biological materials, carrying out experiments and data analysis. PAB performed RTq-PCR analysis and other related experiments. FJAP performed the analysis of VitD concentrations. RSC contributed to the histology and immunohistochemistry analyses.
- COMPETING INTERESTS**
The authors declare no competing interests.
- ADDITIONAL INFORMATION**
Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41387-023-00238-2>.
- Correspondence** and requests for materials should be addressed to Cláudia Silva Souza.
- Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>
- Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.
-  **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
- © The Author(s) 2023

ANEXO A - Comitê de ética 194/2017



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

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeito do tratamento com Vitamina D na evolução da nefropatia induzida pela administração de adriamicina em ratos*”, registrado com o número **194/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de outubro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 50 ratos Wistar-Old machos pesando 200g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/10/2017 a 30/06/2019.

We certify that the Protocol *n*° 194/2017, entitled “*Effect of Vitamin D treatment on the progression of nephropathy induced by administration of adriamycin in rats*” is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/25/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 50 male Wistar-Old rats weighing 200g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 06/30/2019.

Ribeirão Preto, 30 de outubro de 2017


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

ANEXO B - Adendo do comitê de ética



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





DECLARAÇÃO

Declaramos que o Adendo ao Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número **194/2017** sobre o projeto intitulado *“Efeito do tratamento com calcitriol (vitamina D ativada) na evolução da lesão renal induzida pela administração de adriamicina em ratos: mecanismos envolvidos”*, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra**, está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** na data de 26 de agosto de 2019.

We declare that the Addendum to the Protocol *n° 194/2017*, entitled *“Effect of calcitriol (vitamin D activated) on the evolution of adriamycin-induced renal injury in rats: involved mechanisms”*, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved in *08/26/2019* by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo.

Ribeirão Preto, 26 de agosto de 2019



Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel. (16) 3315-3301 / 3315-3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br