ANA CAROLINA DE BRAGANÇA VICIANA

Estudo da deficiência de vitamina D no modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Lúcia da Conceição Andrade

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Viciana, Ana Carolina de Bragança
Estudo da deficiência de vitamina D no modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos / Ana Carolina de Bragança Viciana. -- São Paulo, 2014.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Nefrologia.
Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Lesão renal aguda 2.Deficiência de vitamina D 3.Receptores de vitamina D 4.Inibidor de quinase dependente de ciclina p21 5.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-196/14

Trabalho realizado no laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM12), Disciplina de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através do auxílio à pesquisa (Proc. nº BEX 6102/13-1) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através do auxílio à pesquisa (Proc. nº 2010/52294-0).

Dedico este trabalho aos dois grandes amores da minha vida: à minha mãe, Carmen, pelo amor incondicional e verdadeiro, e ao meu marido, Igor, meu parceiro da vida e eterno amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela benção de viver bem todos os dias.

À Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade, uma profissional brilhante e muito dedicada ao trabalho e às pessoas. Agradeço pela oportunidade de ter sido sua aluna, pelos ensinamentos científicos e pela amizade e carinho que construímos ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Rildo A. Volpini, um profissional extremamente focado e integrado em tudo o que faz. Obrigado por ter sido meu co-orientador, vou levar sempre comigo os longos dias de bancada, as sugestões e pela amizade e carinho que com certeza foram muito importantes para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro, chefe do Laboratório de Pesquisa Básica – LIM-12, pelas aulas didáticas, por ter autorizado meu afastamento para conclusão do doutorado-sanduíche e pelas sugestões muito bem vindas.

Ao Prof. Dr. David P. Basile, do Departamento de Fisiologia Integrativa e Celular da Universidade de Indiana/EUA, obrigada por ter me recebido tão bem em seu grupo, assim como em seu laboratório. Essa experiência única com certeza me enriqueceu e, além disso, sei que foi o início de uma parceria científica.

À Dra. Maria Heloisa M. Shimizu, por me ensinar a realizar os experimentos do clearance de inulina e as dosagens necessárias, assim como, pela amizade e toda a ajuda prestada.

À Dra. Daniele Canale, por caminhar junto comigo na construção desta tese e por termos vivenciado fortes momentos juntas, que com certeza fizeram a gente crescer e amadurecer e, também, pela amizade e toda a ajuda prestada.

À mestranda Janaína Garcia Gonçalves, por participar e ajudar a desenvolver este projeto, pelas comidinhas, pelas conversas sensatas e pela amizade.

À Dra. Talita Rojas Cunha Sanches, minha eterna amizade e agradecimento pelo carinho, apoio e disponibilidade em ajudar, principalmente na execução da qPCR.

À Profa. Dra. Rosa Maria Affonso Moysés, por nos ajudar a direcionar nossas discussões e por participar da minha banca de qualificação que com certeza colaborou para enriquecer o trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Helou e à Profa. Dra. Mirian Boim, por participar da minha banca de qualificação e pelas colocações pertinentes.

À mestranda Letícia Urbano Cardoso de Castro, pelo prazeroso convívio diário e pela sua amizade.

À funcionária Denise Ariane de Jesus, por toda a ajuda e cuidado com os animais de biotério, essencial para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Antonio José Barros Magaldi, ao funcionário Nivaldo Francisco da Silva e à funcionária Eloá de Souza Neves, pelo apoio e ajuda administrativa.

E a todos os colegas, alunos e funcionários do LIM-12, por toda a ajuda e apoio prestado.

Ao Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, pelo fornecimento dos animais de laboratório.

Aos funcionários do LIM-16 e do LIM-29, por toda a ajuda prestada e pelo apoio técnico.

À FAPESP e a CAPES, por todo o apoio financeiro.

Ao Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da USP, principalmente ao Prof. Dr. Rui Toledo Barros e ao Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann e, aos secretários Pedro e Eliana, por todo o apoio e ajuda prestada.

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão.”

Jean de la Bruyere

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos".

Isaac Newton

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO 1

1.2. IRA e p21 2

1.3. Vitamina D 3

1.4. Vitamina D e o receptor de vitamina D 4

1.5. Klotho e FGF-23 6

1.6. Deficiência de Vitamina D 6

2. OBJETIVOS 9

3. MATERIAIS E MÉTODOS 10

3.1. Indução da Isquemia/Reperfusão em ratos – indução da IRA 10

3.2. Delineamento esquemático do protocolo de estudo 11

3.3. Estudo de gaiola metabólica 11

3.4. Determinação da taxa de filtração glomerular, fluxo sanguíneo renal e pressão arterial média 12

3.5. Extração da proteína e Western Blotting 13

3.6. Análise histomorfométrica 14

3.6.1. Área intersticial relativa (AIR) 14

3.6.2. Análise imuno-histoquímica 15

3.7. Análise da expressão gênica: reação em cadeia da polimerase quantitativa 16

3.7.1. Extração de RNA 16

3.7.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativa - qPCR 16

3.8. Análise estatística 17

4. RESULTADOS 18

5. DISCUSSÃO 39

6. CONCLUSÃO 47

7. ANEXO 48

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25 $(OH)_2$ D	1,25 di-hidroxivitamina D (Calcitriol)
25 (OH) D	25 hidroxivitamina D (Calcidiol)
AGT	Angiotensinogênio
AIR	Área intersticial relativa
AQP1	Aquaporina 1
AQP2	Aquaporina 2
AQP3	Aquaporina 3
AQPs	Aquaporinas
AT1a	Receptor AT1 da angiotensina II tipo a
ATP	Adenosina trifosfato
C	Controle
CD3	Linfócitos T
cDNA	DNA complementar
C_{in}	Clearance de inulina
DBP D	*Vitamin D binding protein*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dVD	Deficiência de vitamina D
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ED1	antígeno citoplasmático presente em monócitos e macrófagos
EPM	Erro padrão da média
FECa	Fração de excreção de cálcio
FEP	Fração de excreção de fósforo
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblasto 23
FSR	Fluxo sanguíneo renal
HE	Hematoxilina-eosina
IRA	Injúria renal aguda
Isq	Isquemia/reperfusão renal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaPi	Co-transportador sódio/fosfato
NO	Óxido nítrico

PAM	Pressão arterial média
P_{Ca}	Concentração plasmática de cálcio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
P_P	Concentração plasmática de fósforo
PTH	Paratormônio
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RVR	Resistência vascular renal
RXR	Receptor retinóide X
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
U_{osm}	Osmolalidade urinária
UTIs	Unidades de Tratamento Intensivo
VDR	Receptor de vitamina D
Vitamina D2	Ergocalciferol
Vitamina D3	Colecalciferol

RESUMO

Viciana, ACB. **Estudo da deficiência de vitamina D no modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos.** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

A deficiência de vitamina D (dVD) aumenta o risco de morte em pacientes hospitalizados. A injúria de isquemia/reperfusão renal (Isq) ativa vias de necrose e/ou apoptose e proliferação celular. A injúria renal aguda (IRA) induz a ativação de inibidores do ciclo celular, incluindo a p21, uma inibidora de kinase dependente de ciclina, a qual possui efeito protetor na IRA. A p21 é um alvo genômico da 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D], a qual, atuando através de receptores de vitamina D (VDRs), possui efeitos imunomoduladores potentes e antiproliferativos, sugerindo a participação deste hormônio na fisiopatologia da doença renal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar a participação da deficiência de vitamina D no modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos. Foram utilizados ratos Wistar que foram divididos em quatro grupos: controle (C), animais que receberam dieta padrão por 30 dias; dVD, animais que receberam dieta livre de vitamina D por 30 dias; Isq, animais que receberam dieta padrão por 30 dias e no 28º dia foram submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão em ambos os rins por 45 minutos; e dVD+Isq, animais que receberam dieta livre de vitamina D por 30 dias e no 28º dia foram submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão em ambos os rins por 45 minutos. Ao final dos 30 dias e após 48 horas da realização da isquemia/reperfusão, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de sangue, urina e tecido renal foram coletados para o estudo dos mecanismos de lesão renal. A injúria renal aguda associada à deficiência de vitamina D levou a uma queda da filtração glomerular e aumento da proteinúria; aumento da relação peso renal/peso corporal, sugerindo maior proliferação e hipertrofia; induziu uma diminuição na ativação dos receptores de vitamina D e da expressão da proteína p21 e aumento da expressão de caspase-3; observou-se déficit de concentração urinária com diminuição da expressão da AQP2; e um maior dano morfológico caracterizado pela análise da área intersticial e presença de necrose tubular. Nossos dados mostraram que alterando os níveis da p21 na IRA isquêmica, a vitamina D, via VDRs, controla a inflamação renal, a proliferação e a lesão celular.

Descritores: Lesão renal aguda, deficiência de vitamina D, receptores de vitamina D, inibidor de quinase dependente de ciclina p21, ratos Wistar.

SUMMARY

Viciana, ACB. **Study of Vitamin D deficiency in rats submitted to renal ischemia/reperfusion** [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Vitamin D deficiency (VDD) increases the risk of death in hospitalized patients. Ischemia/reperfusion injury activates pathways of necrosis and/or apoptosis and cell proliferation. Acute kidney injury (AKI) induces the activation of cell cycle inhibitors, including p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinase, which has a protective effect on the IRA. The p21 is a genomic target of 25-hydroxyvitamin D [25 (OH) D], which, acting through vitamin D receptors (VDRs), has potent antiproliferative and immunomodulatory effects, suggesting the involvement of this hormone in the pathophysiology of renal disease. Thus, the aim of this study was to assess the role of vitamin D deficiency in rats submitted to renal ischemia/reperfusion. Wistar rats were divided into four groups: control (C), animals that received a standard diet for 30 days; VDD, animals that received vitamin D-free diet for 30 days; IRI, animals that received standard diet for 30 days and on day 28 were subjected to the ischemia/reperfusion insult (IRI) in both kidneys for 45 minutes; and VDD+IRI, animals that received vitamin D-free diet for 30 days and on day 28 were subjected to the IRI in both kidneys for 45 minutes. At the end of 30 days and 48 hours after the IRI insult, the animals were euthanized and samples of blood, urine and kidney tissue were collected to study the mechanisms of renal injury. Acute kidney injury associated with vitamin D deficiency led to a decrease in glomerular filtration rate and increased proteinuria; increased relative kidney weight/body weight, suggesting greater proliferation and hypertrophy; induced a decrease in the activation of vitamin D receptors and the p21 protein expression and, increased caspase-3 expression; renal concentration impairment with decreased AQP2 expression, as well as greater morphological damage characterized by interstitial area analysis and presence of tubular necrosis. Our data showed that altering the levels of p21 in ischemic-AKI, vitamin D via VDRs, controls kidney inflammation, proliferation and cell injury.

Descriptors: Acute kidney injury, vitamin D deficiency, vitamin D receptors, cyclin-dependent kinase inhibitor p21, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

A injúria renal aguda (IRA) é caracterizada pelo aumento reversível da concentração de creatinina e de resíduos de produtos nitrogenados no sangue e pela inabilidade do rim em regular fluidos e eletrólitos adequadamente [1,2]. A IRA tem sido tradicionalmente descrita como uma rápida diminuição da função renal ou mais precisamente definida como uma redução "abrupta" da função renal diagnosticada pelo aumento da creatinina plasmática através de exame laboratorial [3].

As taxas de mortalidade entre pacientes com IRA continuam inaceitavelmente altas e a incidência da IRA está relacionada com as condições socioeconômicas e com a distribuição geográfica da população mundial [4]. A lesão de isquemia/reperfusão renal (I/R) ainda é a maior causa de IRA [5]. A isquemia leva a interrupção do fluxo sanguíneo para as células resultando em hipóxia ou anóxia que imediatamente reduz os citocromos mitocondriais e interrompe a fosforilação oxidativa. Durante o processo isquêmico, a falta de oxigênio leva a degeneração e morte celular como a degradação e diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), levando a um prejuízo da função normal celular e interferindo nos processos de recuperação. Nos rins, as células epiteliais edemaciadas contribuem para a obstrução da luz tubular [6,7]. Além da disfunção mitocondrial também pode ocorrer diretamente acúmulo intracelular de sódio, cálcio e de espécies reativas de oxigênio. Indiretamente, pode ocorrer ativação de múltiplas enzimas incluindo proteases, síntese de óxido nítrico (NO), fosfolipases e endonucleases a qual resulta em ruptura e desorganização do citoesqueleto associado com perda da polaridade, dano a membrana celular e ao DNA podendo levar à morte celular [8].

Durante a injúria de isquemia/reperfusão renal (I/R) ocorre uma intensa e persistente vasoconstrição renal que reduz cerca de 50% do fluxo sanguíneo normal para o órgão. Os mecanismos que estão envolvidos com as alterações hemodinâmicas incluem modificações do endotélio celular com alterações de substâncias vasoativas, como o aumento de vasoconstrictores e diminuição de vasodilatadores, e também o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) [2,8].

A injúria de I/R também está associada com distúrbios de concentração renal com uma marcante redução da expressão de proteínas denominadas aquaporinas (AQPs) [8].

As mudanças fisiopatológicas que são responsáveis pela lesão pós-isquêmica renal e que afetam as funções renais na IRA continuam pouco conhecidas. É sabido que a IRA é causada por um processo multifatorial, e que a prevenção e o tratamento precoce continuam sendo a melhor escolha terapêutica [5].

1.2. IRA e p21

Na IRA ocorre ativação de vias de necrose, apoptose e proliferação celular. Em modelos experimentais de IRA, o aparecimento de necrose é uma característica marcante e é observada predominantemente no segmento S3 do túbulo proximal; a apoptose também ocorre, mas na minoria das células, especialmente na porção do néfron distal [2,9]. Menos do que 1% das células do túbulo renal estão em divisão; a grande maioria está quiescente, isto é, não estão se dividindo. Em geral, estão na fase G0 do ciclo celular. Em resposta a injúria, é sabido que muitas células renais normais quiescentes entram no ciclo celular. Esse processo se inicia logo após a injúria. Entretanto, há ativação de genes, como p21 e 14-3-3 sigma, que tentam inibir tanto em G1 quanto em G2, respectivamente, a entrada da célula no ciclo [2,9].

Está claro que, o dano causado na célula que resultou em morte celular também pode resultar em proliferação celular. Estes eventos ocorrem por causa do estresse e/ou morte celular, mas não se sabe o tamanho da contribuição para a lesão ou para a recuperação [10].

A divisão celular é uma sequência sincronizada de eventos na qual o DNA genômico é replicado formando duas células similares. Após muitos anos de estudos, concluiu-se que a divisão do ciclo celular é composta por quatro fases: G1, S (síntese do DNA), G2, e M (mitose) [9,10].

Para que a progressão do ciclo celular seja ordenada, ou seja, entre em uma fase para outra, várias proteínas efetoras respondem a danos no DNA, e à síntese incompleta do DNA; e assim pode-se concluir com êxito a mitose. Essas proteínas efetoras ou “checkpoint effectors” (proteínas de checagem do ciclo celular) como foram

denominadas, atualmente são conhecidas como inibidoras de quinases dependentes de ciclinas, e são responsáveis principalmente pelo controle da entrada da célula nas fases S e M, ambas inibindo ou estimulando as ciclinas [10]. Nos humanos e nos vertebrados existem duas famílias dessas proteínas inibidoras de quinase dependente de ciclina. A primeira proteína caracterizada dessas famílias foi a p21, uma proteína de 21 KDa que constitutivamente é expressa em baixos níveis, e também conhecida como WAF1 ou CIP1 [10,11]. A proteína p21 está muito expressa antes da diferenciação terminal e em cultura de células senescentes. E ainda, o gene p21 é induzido após lesão do DNA via p53, uma proteína que regula a transcrição de genes envolvidos na parada do ciclo celular e na apoptose, assim como participa da regulação da senescência celular. A indução do gene p21 e a super expressão da proteína p21 estão associadas com a interrupção do ciclo celular e a parada da fase G1. A proteína p21 tem sido responsável pela inibição de uma ou mais ciclinas ativadas por kinases. A proteína também pode se ligar e inibir o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), especialmente na replicação ou reparação do DNA [11].

Quando células renais são lesadas e entram no ciclo celular, rapidamente há indução da p21, e isso já foi demonstrado em vários modelos de IRA, incluindo trabalhos com cisplatina, I/R e obstrução ureteral [12]. A proteína p21 foi localizada nas células do túbulo renal tanto na porção distal como na proximal através da técnica de imunohistoquímica [10].

1.3. Vitamina D

A vitamina D é um hormônio circulante no organismo e está envolvido na regulação de várias funções fisiológicas essenciais como a osteogênese e a manutenção da homeostase mineral. A síntese da vitamina D é um processo já bem conhecido que começa na pele e continua através do fígado e do rim até produzir a forma biologicamente ativa, a 1,25 di-hidroxivitamina D (1,25 $(OH)_2$ D) [13].

A expressão “vitamina D” é empregada para designar vários compostos, entre eles, o colecalciferol (vitamina D3) e o ergocalciferol (vitamina D2). O colecalciferol é produzido pelas células da pele chamadas queratinócitos a partir de um produto residual do colesterol, o 7-di-hidroxicolesterol (precursor do colesterol), em resposta aos raios

solares UVB. O ergocalciferol é derivado de um esteróide vegetal e a molécula resultante apresenta pequenas diferenças estruturais em relação ao colecalciferol. No entanto, nenhuma dessas moléculas tem qualquer atividade no organismo. Assim, cada molécula precisa ser modificada por uma série de enzimas através de um processo denominado hidroxilação, que acrescenta dois terços de água à molécula a fim de gerar 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D). Esse processo ocorre no fígado, onde tanto a vitamina D_2 quanto a vitamina D_3 são entregues por intermédio de proteínas específicas (DBP D - *vitamin D binding protein)* e se transformam em 25 (OH) D, ou seja, a forma circulante no organismo. A produção da 25 (OH) D no fígado, além de rápida, sofre pouca regulação. Deste modo, seus níveis plasmáticos refletem a reserva corporal de vitamina D. A conversão final, ou seja, a forma biologicamente ativa ocorre nos rins, nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais do rim, onde a 25 (OH) D é novamente hidroxilada pela ação da enzima 1-α-hidroxilase, presente também em outros tecidos, se transformando em 1,25 di-hidroxivitamina D (1,25 $(OH)_2$ D) ou calcitriol. Essa passagem renal, ao contrário da hepática, é estreitamente regulada por vários fatores. Entre eles destacam-se o paratormônio (PTH), o fósforo e o fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) [14].

A elevação plasmática do PTH e a diminuição do fosfato estimulam a atividade da 1-α-hidroxilase. A 1,25 $(OH)_2$ D retro-regula sua produção, inibindo a atividade da 1-α-hidroxilase, o mesmo ocorrendo com a redução do PTH e a elevação do fosfato. A síntese renal é responsável por gerar boa parte do estoque de 1,25 $(OH)_2$ D circulante no organismo [13,15,16,17]. O fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF-23) é um hormônio secretado pelos osteócitos que suprime a transcrição da enzima 1-α-hidroxilase, e estimula a fosfatúria, reduzindo a síntese de 1,25 $(OH)_2$ D [16,18].

1.4. Vitamina D e o receptor de vitamina D

A vitamina D vem recebendo atenção cada vez maior do meio científico nas últimas décadas. Além do seu conhecido papel na homeostase do cálcio e do fósforo, e a mineralização óssea, sabe-se que a 1,25 $(OH)_2$ D atua em vários sistemas biológicos do organismo. Para exercer suas funções, o calcitriol precisa se ligar a um receptor nuclear, o receptor de vitamina D (VDR). Para chegar ao núcleo, o calcitriol inicialmente

penetra na célula por difusão simples através da membrana, pois é um hormônio lipossolúvel, e/ou por ligação a receptores na membrana. Em seguida, o calcitriol liga-se ao VDR presente no citoplasma ou núcleo celular [19,20]. Além disso, o calcitriol junto com o VDR pode combinar-se com o receptor retinóide X (RXR), para formar um heterodímero, VDR-RXR. O complexo formado se conecta a uma região específica do DNA que induz o mecanismo celular a iniciar a transcrição gênica (via genômica). É importante ressaltar que a 25 (OH) D também é um ativador de VDR em células que não expressam a 1-α-hidroxilase, pois esta molécula pode diretamente se ligar e ativar o VDR. Embora sua afinidade pelo VDR seja de 100-200 vezes menor que a do calcitriol, a concentração da 25 (OH) D no organismo é da ordem de ng/ml, enquanto que a do calcitriol sérico é da ordem de pg/ml. E ainda, a 25 (OH) D induz uma ação rápida denominada via não genômica, a qual não envolve ação "direta" sobre o núcleo celular. Com relação à via não genômica, acredita-se que tanto o calcitriol como a 25 (OH) D podem se ligar a um receptor de membrana com propriedades diferentes das encontradas nos receptores nucleares e citosólicos, e sinalizar a abertura de canais de cálcio, ativando a síntese de mensageiros intracelulares, como o AMP cíclico. Sendo assim, podem rapidamente modular o transporte de cálcio no intestino, os níveis de cálcio intracelular e/ou a fosforilação, e a localização e atividade de proteínas via VDR [20,21].

O receptor ou proteína VDR é encontrado em vários tecidos do organismo, assim como em células imunológicas circulantes, indicando que a forma ativa da vitamina D tem a função de regular a atividade gênica de vários tecidos, como do cérebro, ossos, intestino, rins, fígado, pâncreas, entre outros [13,22].

Atualmente, sabe-se que o VDR está presente nas células do túbulo proximal no rim, onde a 1,25 $(OH)_2$ D via VDR atua no transporte de fosfato através do co-transportador sódio/fosfato (NaPi). Também já está bem descrito na literatura que a 1,25 $(OH)_2$ D regula a reabsorção de cálcio no túbulo distal e ductos coletores na presença do VDR nestes segmentos do néfron. O VDR também já foi identificado nas células da mácula densa e nos podócitos, sugerindo que o calcitriol tem um efeito direto nestas células em condições normais [22,23].

A ativação do VDR pelo calcitriol, tanto pela forma circulante produzida em sua maior parte no rim (túbulo proximal), como pelo produzido localmente pelos inúmeros tipos de células, modula a expressão de genes que previnem ou diminuem o

desenvolvimento do hiperparatiroidismo secundário, as doenças ósseas, os distúrbios da homeostase do cálcio e do fósforo que predispõe a calcificações ectópicas e, aos danos cardiovasculares, levando a uma diminuição das taxas de morbidade e mortalidade [24].

1.5. Klotho e FGF-23

O Klotho foi originalmente identificado como um gene de supressão da idade com funções pleiotrópicas. O Klotho é expresso no rim onde age como um co-receptor para o FGF-23 e desempenha um importante papel no metabolismo do fosfato. A proteína Klotho possui múltiplas funções distintas, incluindo a regulação de vários canais de íons e do estresse oxidativo. Estudos recentes demonstraram que o Klotho pode estar envolvido na renoproteção de glomerulonefrite crônica. Dados sobre Klotho na injúria renal aguda são limitados. Entretanto, já foi mostrado que o mRNA e a proteína Klotho no rim estão diminuídas um dia após o insulto de isquemia/reperfusão renal [25].

A via de sinalização Klotho-FGF-23 estimula a proliferação e previne a vitamina D de induzir apoptose, além disso, participam da homeostase mineral. No camundongo, a deficiência de Klotho causa distúrbios na via de transdução de sinal entre Klotho e FGF-23 resultando num aumento da produção de 1,25 $(OH)_2$ D, podendo promover uma absorção de fosfato e cálcio do intestino, induzindo não apenas hiperfosfatemia, mas também hipercalcemia. A deficiência de Klotho leva também ao aumento do estresse oxidativo. Na ausência de Klotho, a função do FGF-23 é abolida [26].

O Klotho também pode influenciar na via de sinalização do p53/p21. De acordo com *Oliveira*, após a lesão no DNA, a diminuição do Klotho pode induzir envelhecimento precoce em células de fibroblastos humanos primários e em células endoteliais vasculares umbilicais humanas através da via p53/p21 [27].

1.6. Deficiência de Vitamina D

A maioria dos seres humanos depende da exposição à luz solar para atender as necessidades de vitamina D de que o organismo precisa. Estações do ano, latitude, hora

do dia, idade, pigmentação da pele e uso de protetores solares, entre outros fatores, interferem na produção de vitamina D_3 pela pele [28]. Na ausência de exposição ao sol, recomenda-se a ingestão de vitamina D através de fontes exógenas, como peixes gordurosos (arenque, cavala, salmão, sardinha, atum), óleo de fígado de peixes, como o de bacalhau, fígado, ovos, carne de vitela, cogumelos, manteiga, alimentos fortificados (leite de vaca, leite de soja, suco de laranja e cereais) e suplementações. A suplementação dessa vitamina cresceu consideravelmente nos últimos anos e vem sendo cada vez mais recomendada, em particular durante os meses de inverno em que a exposição ao sol é reduzida [29].

A deficiência de vitamina D atinge níveis epidêmicos nos Estados Unidos (EUA), assim como em vários outros países do mundo. Na Europa, ela é maior nos países mais ensolarados da região do mediterrâneo do que nos países escandinavos. Assim, em países ensolarados como o Brasil também ocorre deficiência dessa vitamina [28]. Esse paradoxo parece ser resultado do uso de métodos de prevenção contra a exposição aos raios UV.

Os principais indicadores das reservas corporais de vitamina D são os níveis plasmáticos de 25 (OH) D, entretanto, as concentrações plasmáticas ideais desse hormônio para a manutenção das funções fisiológicas normais ainda são motivo de discussão na literatura. Os resultados de vários estudos sugerem que a concentração sérica ótima da 25 (OH) D seria em torno de 75 nmol/L, onde a deficiência de vitamina D é definida entre 20-25 nmol/L ou menos e a insuficiência assume concentrações entre 25 e 75 nmol/L de 25 (OH) D [28].

A deficiência de vitamina D em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTIs) raramente é levada em consideração, assim como seu tratamento. Entretanto, vários são os casos que tem sido reportado e apontado que a deficiência de vitamina D é um potente precursor para o desenvolvimento de várias complicações agudas [30,31,32]. Um estudo realizado pelo Departamento de endocrinologia do Hospital de St. Vincent´s (Sidney-EUA) entre janeiro de 2007 a janeiro de 2008 mostrou que a prevalência de pacientes com hipovitaminose D é alta, onde dos 42 pacientes internados na UTI, 55% apresentava os níveis da 25 (OH) D insuficientes, 38% deficientes, e 17% foi considerado não detectável. E ainda, esses dados vieram acompanhados com uma alta taxa de mortalidade dos pacientes internados, permitindo associar a deficiência de vitamina ao aumento da mortalidade. A causa da

hipovitaminose D provavelmente é multifatorial, mas a pouca exposição à luz solar durante a doença renal é um fator importante, que altera o metabolismo da vitamina D e da paratireóide, devendo ser monitorada [32].

O papel clássico da vitamina D é o de manter a homeostase do cálcio no organismo. A hipocalcemia é comum ocorrer em pacientes hospitalizados e está presente entre 15-88% dos adultos nas UTIs. O cálcio é importante em vários processos fisiológicos, e não é surpresa que a hipocalcemia pode estar associada a várias doenças, e consequentemente com as elevadas taxas de mortalidade [33].

Um quadro de hipocalcemia severa é difícil ocorrer em pacientes não-críticos, devido à presença de um múltiplo mecanismo de compensação envolvendo o paratormônio (PTH) e a vitamina D para manter o cálcio em níveis normais. Os receptores sensíveis ao cálcio presentes nas glândulas da paratireóide são sensíveis às mudanças na concentração de cálcio plasmático. Assim, baixas concentrações de cálcio plasmático levam a um aumento da absorção de cálcio no intestino, reabsorção de cálcio no rim e liberação de cálcio do esqueleto ósseo, mediada pela 1,25 $(OH)_2$ D [33].

A carência de vitamina D em crianças com doença renal coloca este grupo de pacientes em alto risco de ter o metabolismo de cálcio e fósforo comprometidos, assim como seu desenvolvimento ósseo. Com a taxa de filtração glomerular comprometida, a conversão da 25 (OH) D para 1,25 $(OH)_2$ D fica reduzida e a concentração de fósforo plasmático se eleva em resposta a diminuição do clearance renal, levando a uma queda do cálcio plasmático em consequência do quadro de hiperparatiroidismo. A produção elevada do PTH é devida ao prejuízo da função renal, mas o alto nível de PTH no organismo também pode ser devido à deficiência de vitamina D [34].

Desta forma, há um interesse crescente do meio científico em investigar a fisiopatologia e os mecanismos pelo qual a vitamina D ou a falta desta podem estar envolvidas nos eventos agudos ou na progressão e na instalação da doença renal.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Estudar o efeito da deficiência de vitamina D no modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos.

Objetivos específicos:

a- Estabelecer o modelo de deficiência de vitamina D em ratos;

b- Estudar se a deficiência de vitamina D potencializa a lesão renal de isquemia/reperfusão;

c- Se a deficiência de vitamina D agravar a lesão renal induzida pela isquemia/reperfusão, estudar os possíveis mecanismos envolvidos:

- inibição ou ativação de vias de proliferação celular: p21, PCNA;
- inflamação: infiltração de macrófagos e monócitos;
- metabolismo do fósforo e do cálcio;
- vias de necrose/apoptose: escore de lesão tubular e caspase total.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus novergicus*) machos, com o peso em torno de 180-200 g. Os animais foram mantidos em nosso biotério e receberam dieta normal e dieta livre de vitamina D (0,4% Ca e 0,4 % P) da marca MP Biomedicals (Irvine, CA, EUA) por um período de 30 dias. Para avaliação da quantidade de dieta consumida, os grupos de animais foram colocados em gaiolas individuais onde receberam dieta, com livre acesso à água. Foi efetuado, quinzenalmente, o balanço da ingestão de dieta e água. O peso dos animais foi verificado semanalmente e após a indução da isquemia renal.

O procedimento experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP n° 133/10).

3.1. Indução da Isquemia/Reperfusão em ratos – indução da IRA

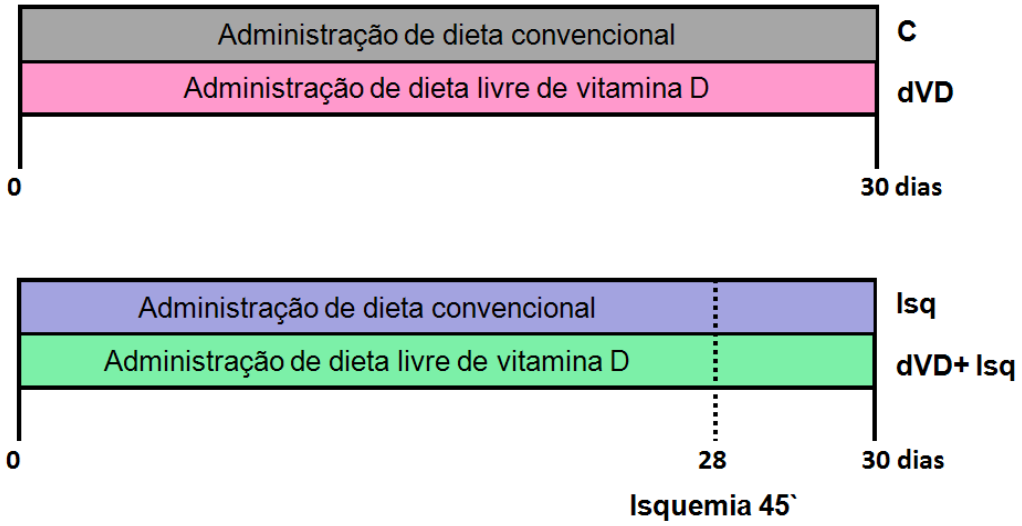
Foram estudados quatro grupos de animais:

1) **Controle (C):** recebeu dieta normal por 30 dias e o clearance de inulina foi realizado ao final deste período (n=7).
2) **Isquemia/reperfusão renal (Isq):** recebeu dieta normal por 30 dias e no 28° dia foi feita a isquemia/reperfusão renal e o clearance de inulina foi realizado 48 h após a isquemia (n=7).
3) **Deficiência de vitamina D e Isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq):** recebeu dieta livre de vitamina D por 30 dias e no 28° dia foi feita a isquemia/reperfusão renal e o clearance de inulina foi realizado 48 h após a isquemia (n=8).
4) **Deficiência de vitamina D (dVD):** recebeu dieta livre de vitamina D por 30 dias e o clearance de inulina foi realizado 48 h após o insulto cirúrgico (n=8).

No 28° dia após o início dos tratamentos, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1 mL/100 g de rato) e uma incisão abdominal foi feita para a realização da cirurgia de isquemia/reperfusão renal. A isquemia renal foi realizada

clampeando-se as artérias de ambos os rins por 45 minutos, seguido de uma reperfusão. O clearance de inulina foi feito após 48 h da isquemia/reperfusão renal.

3.2. Delineamento esquemático do protocolo de estudo



3.3. Estudo de gaiola metabólica

Os animais foram colocados em gaiola metabólica com livre acesso a água um dia antes do experimento de clearance de inulina para a coleta da urina de 24 horas. Foram analisadas nas amostras de urina as concentrações de cálcio, fósforo e proteínas utilizando sistema colorimétrico através de kits comerciais (LabTest, MG, Brasil). As frações de excreção de cálcio (FECa) e fósforo (FEP), assim como a excreção de proteínas foram determinadas. A osmolalidade foi verificada através da análise de ponto de congelamento (The Advanced ™OSMOMETHER 3D3). Ao final do experimento foram avaliados o volume urinário e a ingestão de água.

3.4. Determinação da taxa de filtração glomerular, fluxo sanguíneo renal e pressão arterial média

Para a determinação da filtração glomerular, fluxo sanguíneo renal e pressão arterial média foram realizados os seguintes experimentos: os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg). A traquéia foi canulada com cateter PE-240, e a respiração foi mantida espontaneamente. A veia jugular foi canulada com cateter PE-60 para a infusão de inulina e de fluidos. Para o controle da pressão arterial média (PAM) e para a coleta de amostras de sangue, a artéria carótida foi cateterizada com cateter de PE-50. Para a coleta de amostras de urina, foi feita uma incisão abdominal e a bexiga do animal foi canulada com cateter de PE-240. Após o procedimento cirúrgico, uma dose única de inulina (100 mg/kg diluída em 1 mL de solução salina a 0,9%) foi administrada pela veia jugular. Em seguida, uma infusão constante de inulina foi mantida (10 mg/kg em solução salina a 0,9%) a 0,04 mL/min do início ao fim do experimento. Foram coletadas três amostras de urinas a cada 30 minutos e amostras de sangue no início e no fim do experimento.

Os valores do clearance de inulina representam a média de três períodos de experimento. As concentrações de inulina no sangue e na urina foram determinadas pelo método da Antrona.

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

Ao final do experimento de clearance, o sangue total dos animais foi colhido para as seguintes análises no plasma: cálcio iônico (ABL800 Flex, Radiometer – eletrodo sensível), fósforo (COBAS C111, Roche® – sistema colorimétrico), 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D) (Kit DiaSorin® - RIA), e PTH (Kit Comercial Elisa Immutopics, San Clemente, CA, EUA). Após a coleta do sangue, os rins foram perfundidos com solução de tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). Em seguida, o rim direito foi removido, congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80º C para análises da expressão de proteínas pela técnica de

Western blotting ou por qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa). O rim esquerdo foi pesado e em seguida fixado em formalina tamponada 10% ou solução de *methacarn* e mantido nestes mesmos fixadores por um período de 24 horas. Após esse período, os fixadores foram substituídos por álcool 70% e o tecido foi embebido em parafina e cortado em secções de 4 μm para estudos de imuno-histoquímica.

3.5. Extração da proteína e Western Blotting

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

A extração da proteína seguiu o protocolo descrito por Burnette [35], com pequenas modificações. As amostras dos tecidos renais foram homogeneizadas (Polytron PT 10-35) em solução K-Hepes (20 mM Mannitol; 80 mM Hepes; 41 KOH, pH 7,5) com coquetel de inibidores de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 g por 15 minutos a 4ºC para remover núcleo, mitocôndrias e *debris* celulares. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Reagente de Bradford, Bioagency Laboratórios, SP, Brasil). As amostras foram separadas de acordo com o peso molecular em minigéis SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) em tampão de corrida (Tris/Glicina/SDS 10%, pH 8,3) e a transferência para membrana de nitrocelulose (PVDF, GE Healthcare Limited, Little Chanfont, UK) foi feita com tampão de transferência (Tris/Glicina/metanol 20%). A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em TBS-T (24,2g Tris base, 29,2g NaCl, 3,36g EDTA/L, e 0,1% de Tween-20, pH 7,4) por 1 hora. A incubação primária foi feita com anticorpo anti-Aquaporina 2, anti-Actina, anti-p21, anti-VDR e anti-Klotho (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA), e anti-caspase-3 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, EUA) em solução de TBS-T, *overnight* a 4°C. A incubação secundária foi realizada com anticorpo anti-cabra ou anti-coelho (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) também em solução de TBS-T com 0,1% de leite desnatado. O procedimento de detecção foi baseado em quimioluminescência (ECL, GE Healthcare Limited, Little

Chanfont, UK). A semi-quantificação das proteínas foi feita pelo *software* Scion Image for Windows (Scion Corporation – NIH Image).

3.6. Análise histomorfométrica

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

Para avaliação da extensão das áreas acometidas por lesões renais, entre 40 a 60 campos medindo 0,245 mm^2 foram sequencialmente analisados. Cada campo foi avaliado através de escores que variavam de 0 a 4, de acordo com o seguinte critério: 0, menos do que 5% da área apresentando edema celular, degeneração vacuolar, dilatação tubular, necrose e descamação; I, entre 5-25% da área com comprometimento; II, 25-50% da área apresentando lesões renais; III, alterações envolvendo entre 50-75% do campo analisado; IV, mais do que 75% da área analisada apresentando lesões renais. Em seguida, um escore médio para cada rato foi calculado [36].

3.6.1. Área intersticial relativa (AIR)

Cortes de 4 μm de espessura de tecido renal dos animais foram submetidas à análise do comprometimento túbulo-intersticial. Na avaliação histomorfométrica para avaliação da área intersticial relativa, as imagens obtidas pela microscopia ótica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (Axiovision, Carl Zeiss, Eching, Alemanha). Analisaram-se 30 campos de 0,087 mm^2 no córtex de cada rim. As áreas intersticiais foram demarcadas manualmente e em seguida medidas de forma percentual em relação ao campo óptico, excluindo-se os glomérulos [37].

3.6.2. Análise imuno-histoquímica

3.6.2.1. Anticorpos:

Os seguintes anticorpos foram utilizados: anticorpo monoclonal contra antígeno citoplasmático presente em monócitos e macrófagos (ED1) (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) na concentração 1:100, *overnight* a 4°C; anticorpo monoclonal contra antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) na concentração 1:500, 60 minutos em temperatura ambiente; anticorpo monoclonal contra linfócitos T (CD3) (DAKO, Glostrup, Dinamarca) na concentração 1:100, 60 minutos em temperatura ambiente; e anticorpo policlonal contra p21 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) na concentração 1:40, 60 minutos em temperatura ambiente.

3.6.4.2. Imuno-histoquímica:

Cortes de tecido renais foram submetidas à reação de imuno-histoquímica de acordo com cada protocolo desenvolvido para cada anticorpo primário. O produto dessa reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primário e secundário em solução de PBS contendo albumina bovina 1%. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz. Para os anticorpos ED1, PCNA e CD3 foram analisados entre 30 a 50 campos do córtex renal. A avaliação quantitativa dos resultados da imunorreação foi feita através da contagem do número de células positivas por campo (0,087 mm^2) para determinado anticorpo e em seguida foi determinado o número médio de células/campo de cada biópsia analisada. Para avaliação da imunorreação para p21, as proporções de volume de áreas positivas no tecido renal, determinadas pelo limite de cor, foram obtidas pela análise de imagem usando o software Image-Pro® Plus 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silverspring, MD, EUA) em um computador compatível ligado a uma câmera digital

acoplada a um microscópio (Carl Zeiss Axioskop 40, Eching, Alemanha). A proporção de volume é expressa como a área positiva (μm^2) para p21 dividida pela área total do campo analisado (μm^2). Os resultados foram expressos como porcentagens [38].

3.7. Análise da expressão gênica: reação em cadeia da polimerase quantitativa

3.7.1. Extração de RNA

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

3.7.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativa - qPCR

Fitas únicas de cDNA foram sintetizadas a partir das amostras de RNA isolado utilizando-se o reagente SuperScript® VILO™ MasterMix (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), na proporção de 4 µl do reagente para até 2,5 µg de RNA. A reação em cadeia da polimerase (qPCR) foi feita por TaqMan (Applied Biosystem, EUA) para as seguintes moléculas: renina sonda Rn00561847_m1, angiotensinogênio (AGT) sonda Rn00593114_m1, enzima conversora de angiotensina (ECA) sonda Rn00561094_m1, receptor AT1 da angiotensina II tipo a (AT1a) sonda Rn02758772_s1, VDR sonda Rn00690616-m1, klotho sonda Rn00580123-m1. A sonda para GAPDH Rn01775763_g1 foi utilizada como controle. Todas as reações de qPCR foram conduzidas em duplicata, utilizando-se o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, CA, EUA). Controles negativos sem amostras de cDNA foram feitos para cada sonda. As condições de ciclagem foram as seguintes: 2 min a 50°C seguidos de 10 min a 95°C; posteriormente, as amostras foram submetidas a 40 ciclos

de 15 segundos a 95°C seguido de 1 minuto a 60°C. Os valores de Ct (ciclo limiar) do gene alvo foram normalizados pelos valores de Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct_{alvo} - Ct_{referência}$). Pelo fato do Ct do gene de referência permanecer constante, a alteração no valor de ΔCt corresponde a uma variação na expressão do gene alvo. Pela comparação do valor de ΔCt de amostras desconhecidas com o ΔCt de uma amostra controle, o valor de ΔΔCt é obtido. Assim, a expressão gênica relativa é calculada aplicando-se a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para quantificar a expressão de genes [39].

3.8. Análise estatística

A análise estatística dos dados dos grupos estudados foi o de variância ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido pelo teste de Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas através do programa de estatística GraphPad Prism e foram expressos em média ± erro padrão da média. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

4. RESULTADOS

Os níveis plasmáticos da 25 (OH) D (ng/mL), a forma circulante da vitamina D, foi menor nos grupos dVD e dVD+Isq (4,10±0,79 e 3,84±0,23) quando comparados aos grupos C e Isq (14,79±0,88 e 12,98±1,04), demonstrado na tabela 2, figura 1.

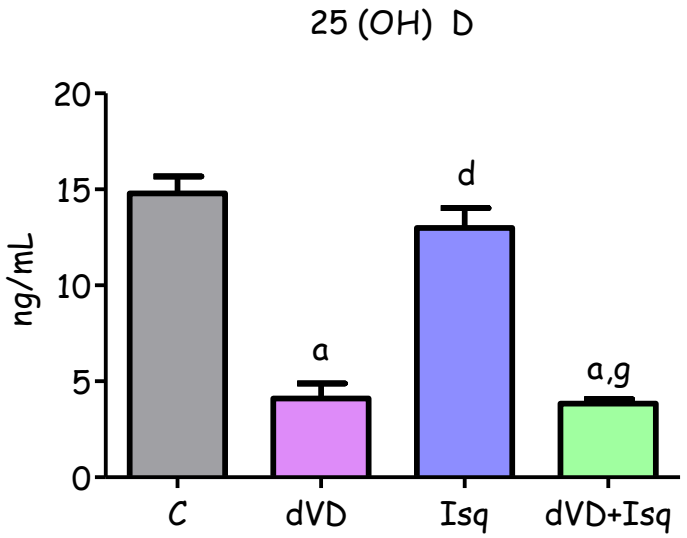


Figura 1 – Concentração plasmática de 25 (OH) D de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{d}p < 0,001$ vs. dVD; $^{g}p < 0,001$ vs. Isq.

O clearance de inulina (mL/min/100g) do grupo dVD (0,76±0,03) foi estatisticamente menor do que aquele apresentado pelo grupo C (0,93±0,05). Os animais do grupo Isq também apresentaram uma redução significativa da função renal (0,43±0,04) em relação aos grupos C e dVD. Os animais do grupo dVD+Isq tiveram uma redução ainda mais evidente do clearance de inulina (0,29±0,03), apresentando diferença estatística em relação aos demais grupos, demonstrado na tabela 1, figura 2.

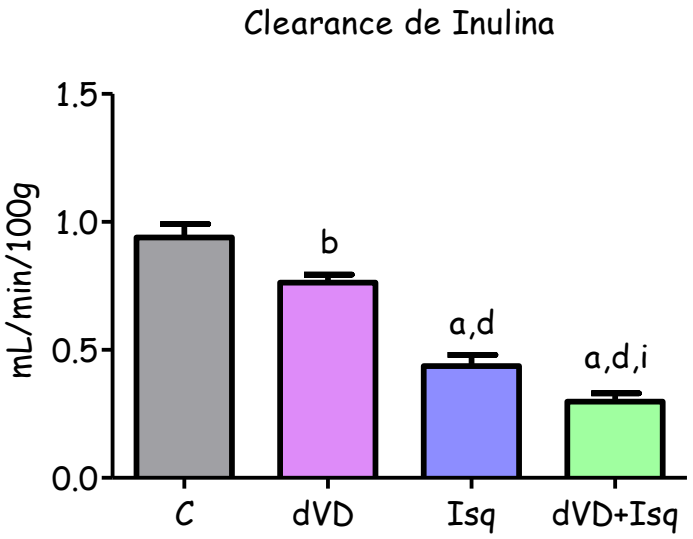


Figura 2 - Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada pelo clearance de inulina de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{b}p < 0,01$ vs. C; $^{d}p < 0,001$ vs. dVD; $^{i}p < 0,05$ vs. Isq.

O peso (g) dos animais dos grupos Isq e dVD+Isq (320,4±4,41 e 337,4±7,0) foi estatisticamente menor quando comparados aos grupos C e dVD (389,4±9,4 e 396±9,4), demonstrado na tabela 1.

A relação peso renal/peso corpóreo apresentou aumento significativo, sugerindo hipertrofia renal nos grupos Isq e dVD+Isq (0,52±0,01 e 0,58±0,02) em relação aos grupos C e dVD (0,40±0,02 e 0,41±0,01). No grupo dVD+Isq, o aumento dessa relação estava ainda mais evidente quando comparado ao grupo Isq, demonstrado na tabela 1, figura 3.

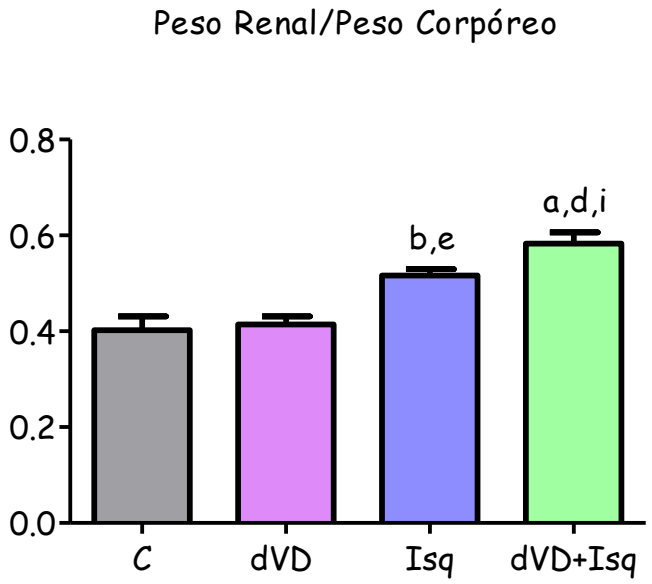


Figura 3 – Relação entre peso renal/peso corpóreo de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em médi ±EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{b}p < 0,01$ vs. C; $^{d}p < 0,001$ vs. dVD; $^{e}p < 0,01$ vs. dVD; e $^{i}p < 0,05$ vs. Isq .

Tabela 1. Peso renal, parâmetros funcionais e hemodinâmicos

Parâmetros	**Controle**	**dVD**	**Isq**	**dVD+Isq**
C_{In} (ml/min/100 g)	0,93 ± 0,05	0,76 ± 0,03^{b}	0,43 ± 0,04^{a,d}	0,29 ± 0,03^{a,d,i}
Peso (g)	389,7±9,4	396,4±9,40	320,1±4,41^{a,d}	337,4±7,0^{a,d}
Peso renal/peso corpóreo	0,40±0,02	0,41±0,01	0,52±0,01^{b,e}	0,58±0,02^{a,d,i}
PAM (mmHg)	118,9±4,2	134±3,4^{c}	136,5±4,3^{b}	139±4,2^{c}
RVR (mmHg/ml/min)	21,0±0,7	23,86±0,6^{c}	24,49±0,7^{b}	24,56±0,7^{c}

Os dados são expressos com média±EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C, $^{b}p < 0,01$ vs. C, e $^{c}p < 0,05$ vs. C, $^{d}p < 0,001$ vs. dVD, $^{e}p < 0,01$ vs. dVD, $^{i}p < 0,05$ vs. Isq. C_{In}, clearance de inulina; PAM, pressão arterial média; RVR, resistência vascular renal.

O número de células PCNA positivas estava aumentado nos grupos Isq e dVD+Isq (29,41±5,12 e 33,17±5,88) quando comparados aos grupos C e dVD (0,21±0,06 e 1,20±0,14), demonstrado na tabela 4, figura 4.

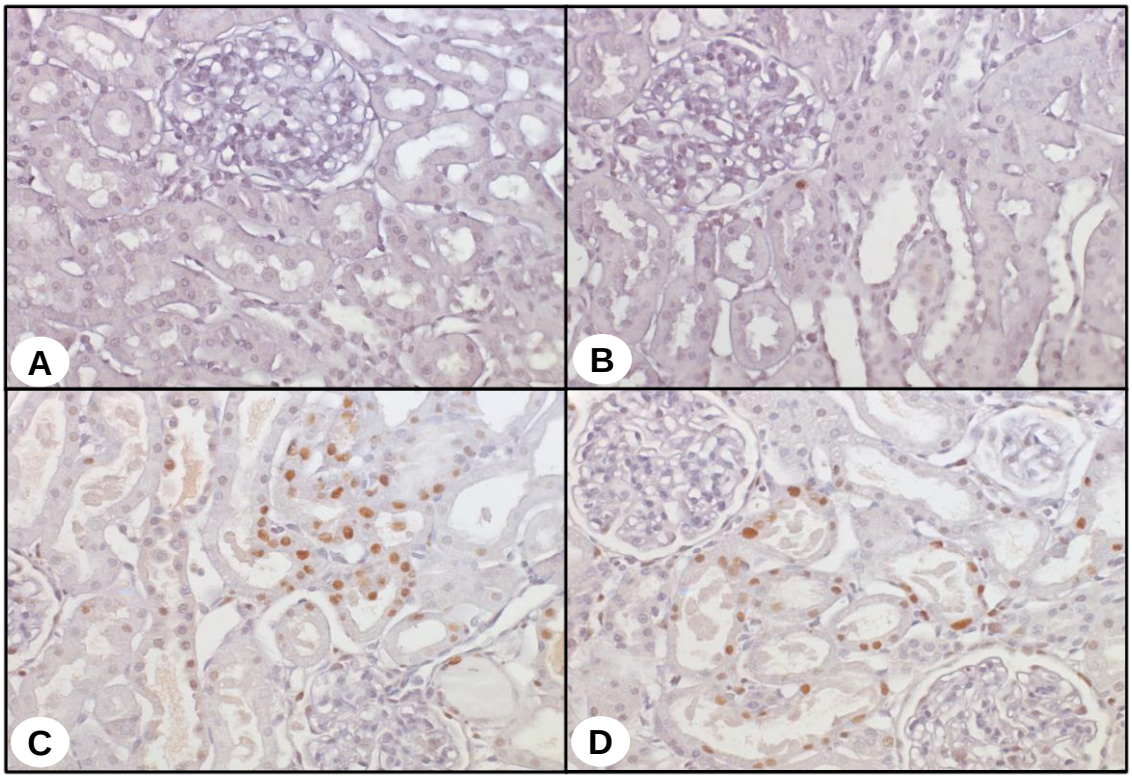


Figura 4 – Imunolocalização de células PCNA positivas no córtex renal de ratos – Controle (A), deficiente em vitamina D (B), isquemia/reperfusão renal (C) e deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal (D). Notar que o número de células positivas é maior em C e D.

A pressão arterial média (PAM, mmHg) dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (134±3,4, 136,5±4,3 e 139±4,2) apresentou aumento significativo quando comparada ao grupo C, demonstrado na tabela 1.

No intuito de estudarmos as alterações observadas na pressão arterial média, a expressão gênica dos componentes do SRAA foi avaliada. Não houve diferenças significativas do SRAA entre os grupos estudados, entretanto verificamos uma tendência ao aumento do grupo dVD quando comparado ao grupo C. Os grupos Isq e

dVD+Isq apresentaram uma diminuição dos genes que codificam a renina, AGT e AT1a quando comparados aos grupos C e dVD. Com relação ao gene que codifica a ECA, os grupos Isq e dVD+Isq apresentaram uma tendência ao aumento quando comparados ao grupo C, e uma diminuição quando comparados ao grupo dVD, demostrado na tabela 5, figura 5.

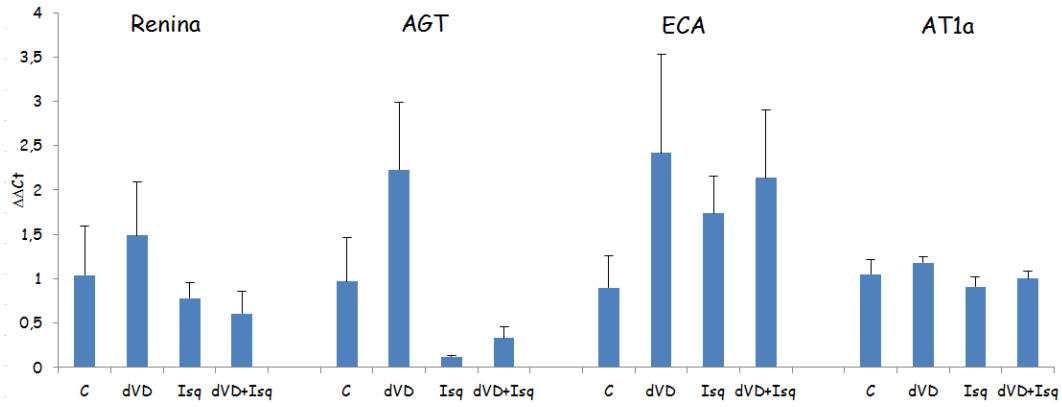


Figura 5 – Expressão gênica dos componentes do SRAA realizados pela técnica de qPCR de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM.

A resistência vascular renal (RVR, mmHg/mL/min) dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (23,86±0,6, 24,49±0,7 e 24,56±0,7) apresentou aumento significativo quando comparada ao grupo C, demonstrado na tabela 1.

A proteinúria (mg/24h) do grupo dVD+Isq (48,00±6,53) apresentou aumento significativo em relação aos grupos C, dVD e Isq (20,93±1,15, 33,20±2,15 e 33,33±6,09 respectivamente), demonstrado na tabela 2, figura 6.

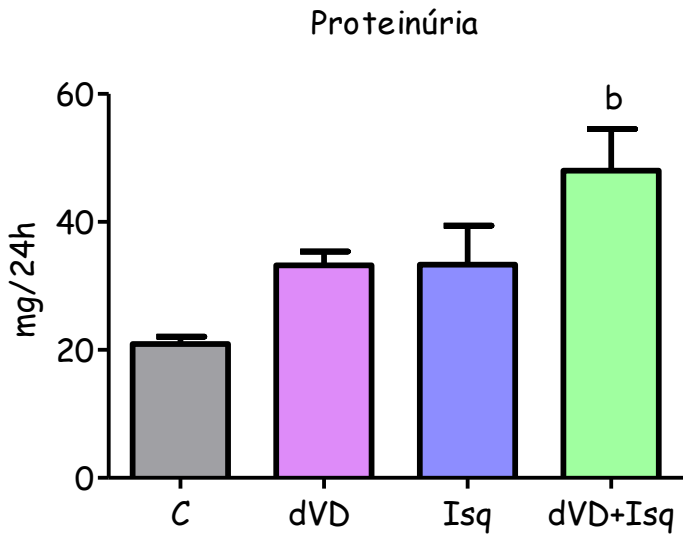


Figura 6 – Proteinúria de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{b}p < 0,01$ vs. C.

A ingestão de água (mL/24h) dos animais dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (24,1±1,8, 26,8±2,5 e 25,92±1,5, respectivamente) apresentou aumento significativo em relação ao grupo C (10,5±1,3), demonstrado na tabela 2, figura 7B. Essa alteração também foi acompanhada pelo aumento significativo do volume urinário (mL/24h) dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (23,25±1,6, 29,92±2,6 e 27,31±2,2) em relação ao grupo C (12,79±1,2), demonstrado na tabela 2, figura 7A. Os resultados referentes ao volume urinário foram acompanhados de uma diminuição da osmolalidade urinária (mOsm/Kg H_2O) nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (895,6±74,0, 516,6±39,1 e 608,9±37,5) quando comparados ao grupo C (1231±98,33). E ainda, os grupos Isq e dVD+Isq apresentaram uma osmolalidade ainda mais reduzida em relação ao grupo dVD, demonstrado na tabela 2, figura 8.

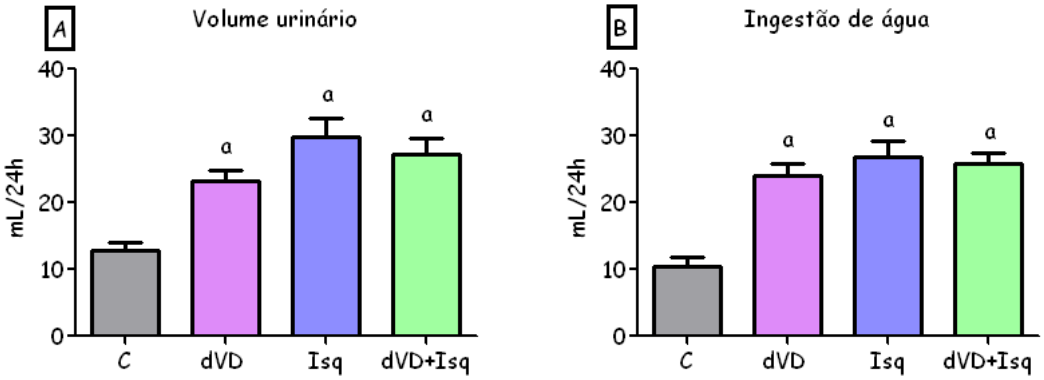


Figura 7 – Volume urinário (A) e ingestão de água (B) de 24h de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C.

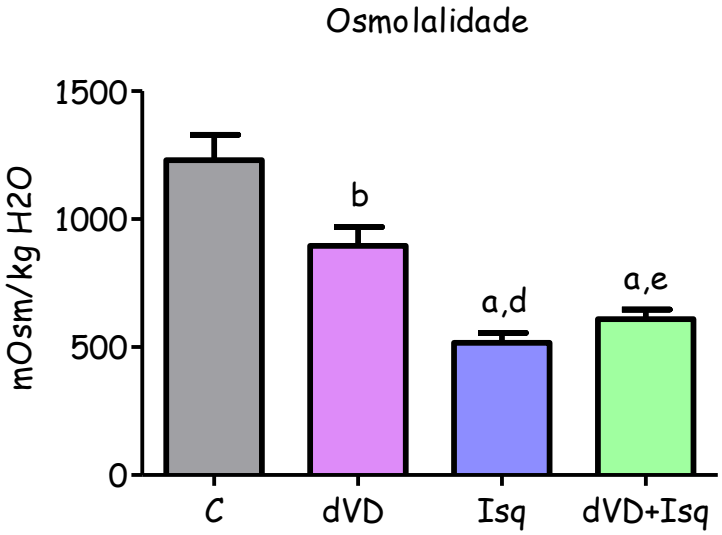


Figura 8 – Osmolalidade urinária de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{b}p < 0,01$ vs. C; $^{d}p < 0,001$ vs. dVD; e $^{e}p < 0,01$ vs. dVD.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos

Parâmetros	**Controle**	**dVD**	**Isq**	**dVD+Isq**
25(OH)D plasmática (ng/mL)	14,79 ± 0,88	4,10 ± 0,79[a]	12,98 ± 1,04[d]	3,84 ± 0,23[a,g]
PTH plasmático (pg/mL)	187,3±34,72	585,3±95,91	399,2±133,6	680,6±152,7
P_{Ca} (mmol/L)	1,12 ± 0,01	0,92 ± 0,02[b]	1,35 ± 0,01[a,d]	0,92 ± 0,05[a,g]
P_P (mg/dL)	9,37 ± 0,39	6,49 ± 0,26[a]	6,95 ± 0,36[a]	6,96 ± 0,43[a]
Ingestão de água (mL/24h)	10,5±1,3	24,1±1,8[a]	26,8±2,5[a]	25,92±1,5[a]
Volume urinário (mL/24h)	12,79±1,2	23,25±1,6[a]	29,92±2,6[a]	27,31±2,2[a]
U_{osm} (mOsm/kg)	1231 ± 98,33	895,6 ± 74,0[b]	516,6 ± 39,1[a,d]	608,9 ± 37,5[a,e]
Proteinúria (mg/24h)	20,93 ± 1,15	33,20 ± 2,15	33,33 ± 6,09	48,00 ± 6,53[b]
FECa (%)	0,72±0,03	0,27±0,03[a]	1,61±0,13[a,d]	0,74±0,07[d,g]
FEP (%)	7,68 ± 0,76	12,22± 1,41	27,17 ± 5,98[b,f]	26,69 ± 4,31[b,f]

Os dados são expressos com média±EPM. [a]$p < 0,001$ vs. C, [b]$p < 0,01$ vs. C, [d]$p < 0,001$ vs. dVD, [e]$p < 0,01$ vs. dVD, [f]$p < 0,05$ vs. dVD, [g]$p < 0,001$ vs. Isq e [i]$p < 0,05$ vs. Isq. PTH, paratormônio plasmático; P_{Ca}, cálcio iônico plasmático; P_P, fósforo plasmático; U_{osm}, osmolalidade urinária; FECa, fração de excreção de cálcio; FEP, fração de excreção de fósforo.

Corroborando os resultados da diminuição da osmolalidade urinária, a expressão da AQP2 (%) dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (26,2±0,6, 49,0±1,0 e 25,2±0,8, respectivamente) estava diminuída em relação ao grupo C. Além disso, a expressão da AQP2 estava mais reduzida nos grupos dVD e dVD+Isq quando comparados ao grupo Isq, demonstrado na tabela 3, figura 9.

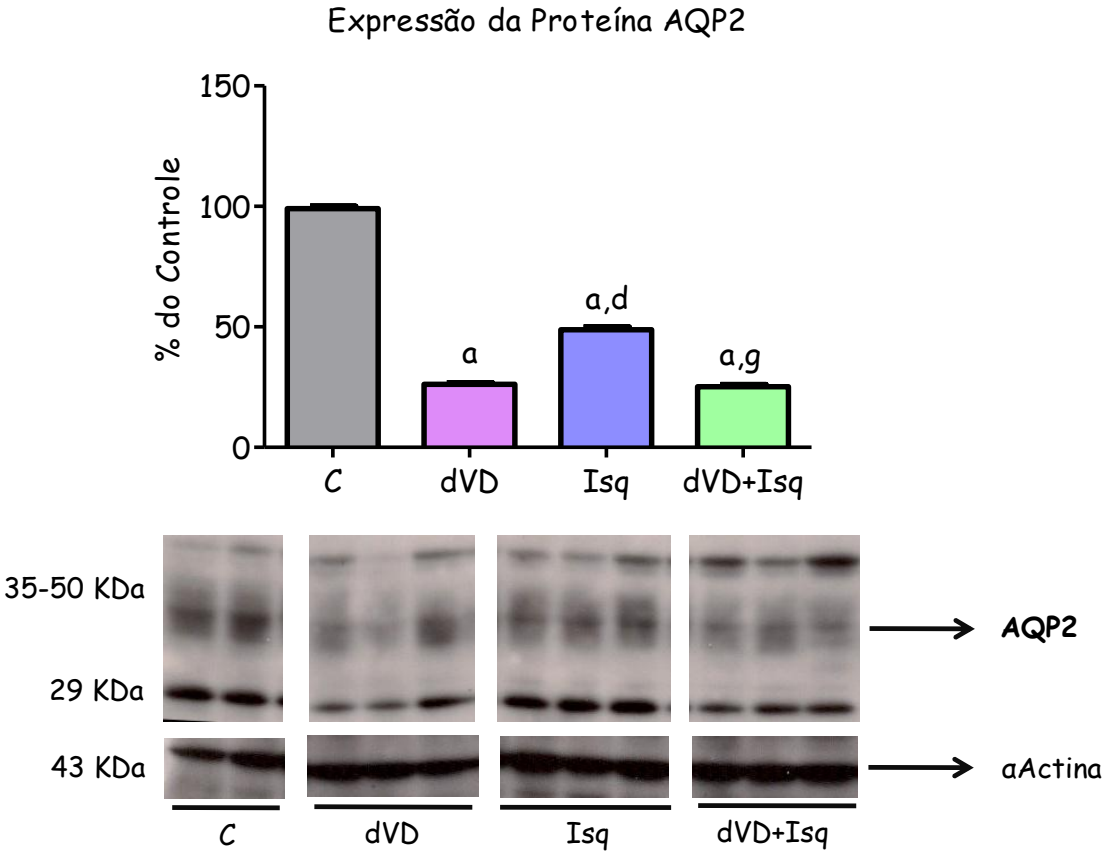


Figura 9 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína AQP2 de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{d}p < 0,001$ vs. dVD; $^{g}p < 0,001$ vs. Isq.

Os níveis plasmáticos de PTH (pg/mL) não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudos, demonstrado na tabela 2, figura 10.

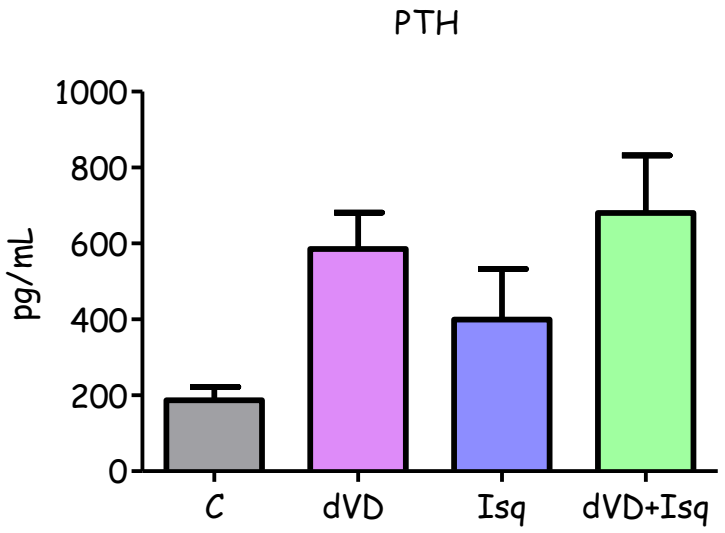


Figura 10 – Concentração plasmática do PTH de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM.

Os níveis plasmáticos de cálcio iônico (mmol/L) dos grupos dVD e dVD+Isq (0,92±0,02 e 0,92±0,05) apresentaram queda significativa em relação aos grupos C e Isq (1,12±0,01 e 1,35±0,01). Além disso, o grupo Isq apresentou um aumento significativo do cálcio iônico em relação ao grupo C, demonstrado na tabela 2, figura 11A. A FECa (%) foi maior nos grupos Isq e dVD+Isq (1,61±0,13 e 0,74±0,07) quando comparados aos grupos C e dVD (0,72±0,03 e 0,27±0,03), demonstrado na tabela 2, figura 12A.

Outros resultados interessantes encontrados na execução desse trabalho foram as concentrações plasmáticas de fósforo e sua respectiva fração de excreção. O fósforo plasmático (mg/dL) dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (6,49±0,26; 6,95±0,36 e 6,96±0,43 respectivamente) estava reduzido significativamente quando comparado ao grupo C (9,37±0,39), demonstrado na tabela 2, figura 11B. Acompanhando tais resultados, houve aumento significativo da FEP (%) nos grupos de animais submetidos ao experimento de isquemia/reperfusão (27,17±5,98 e 26,69±4,31), demonstrado na tabela 2, figura 12B.

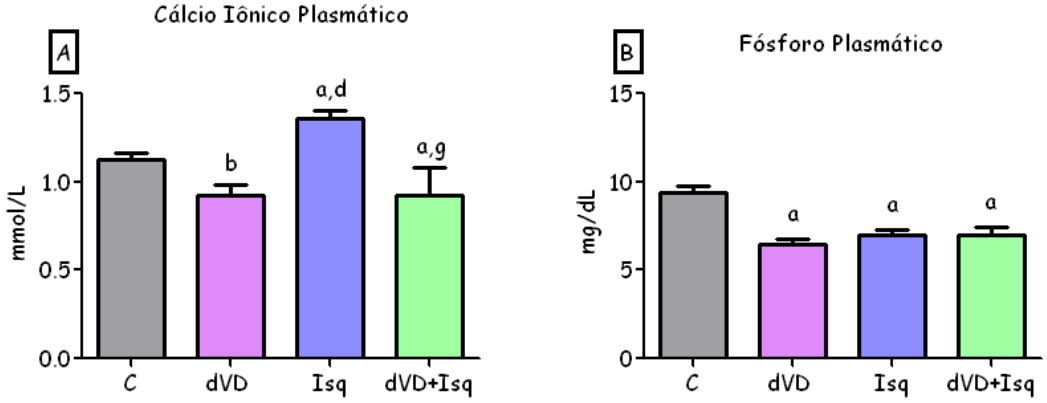


Figura 11 – Concentração plasmática de cálcio iônico (A) e fósforo (B) de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{b}p < 0,01$ vs. C; $^{d}p < 0,001$ vs. dVD; $^{g}p < 0,001$ vs. Isq.

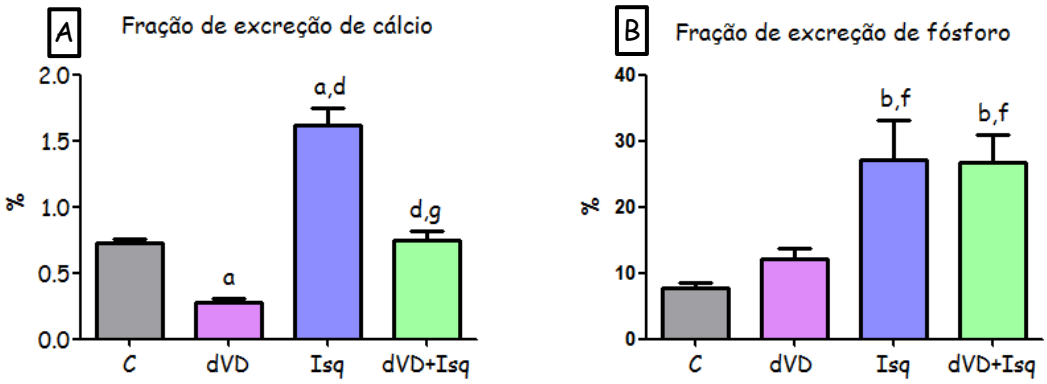


Figura 12 – Fração de excreção de cálcio (A) e fósforo (B) de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{b}p < 0,01$ vs. C; $^{d}p < 0,001$ vs. dVD; $^{f}p < 0,05$ vs. dVD. $^{g}p < 0,001$ vs. Isq;

Em nosso estudo, a expressão da proteína p21 apresentou aumento significativo no grupo Isq (290±4,8 %) quando comparado aos grupos C, dVD e dVD+Isq (99,0±6,0, 100,0±27,0 e 182,0±2,9 %, respectivamente). Além disso, a expressão da p21 do grupo dVD+Isq foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos C e dVD, demonstrado na tabela 3, figura 13.

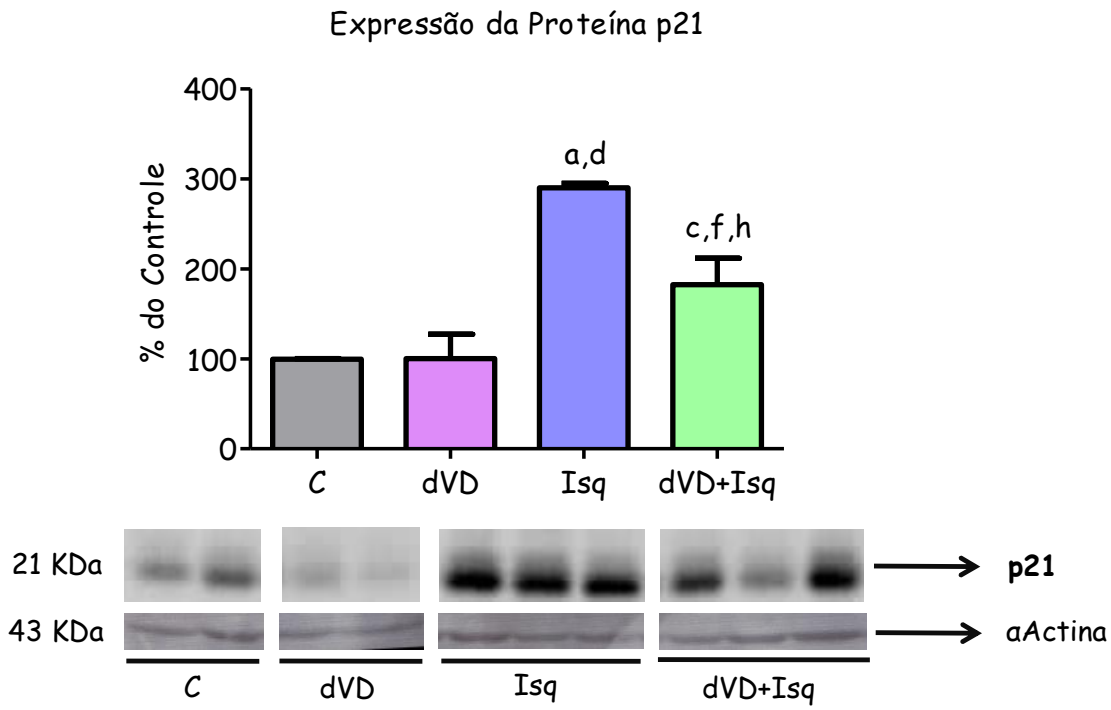


Figura 13 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína p21 de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{c}p < 0,05$ vs. C; $^{d}p<0,001$ vs. dVD; $^{f}p < 0,01$ vs. dVD; $^{h}p < 0,01$ vs. Isq.

As alterações da expressão da proteína p21 foram acompanhadas pelo ensaio de imuno-histoquímica no tecido renal onde também constatamos aumento significativo da marcação para p21 no grupo Isq (3,9±0,11 %) quando comparado aos grupos C, dVD e dVD+Isq (0,5±0,09, 0,48±0,09 e 3,1±0,57 %, respectivamente). Além disso, a marcação da p21 do grupo dVD+Isq foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos C e dVD, demonstrado na tabela 4, figura 14.

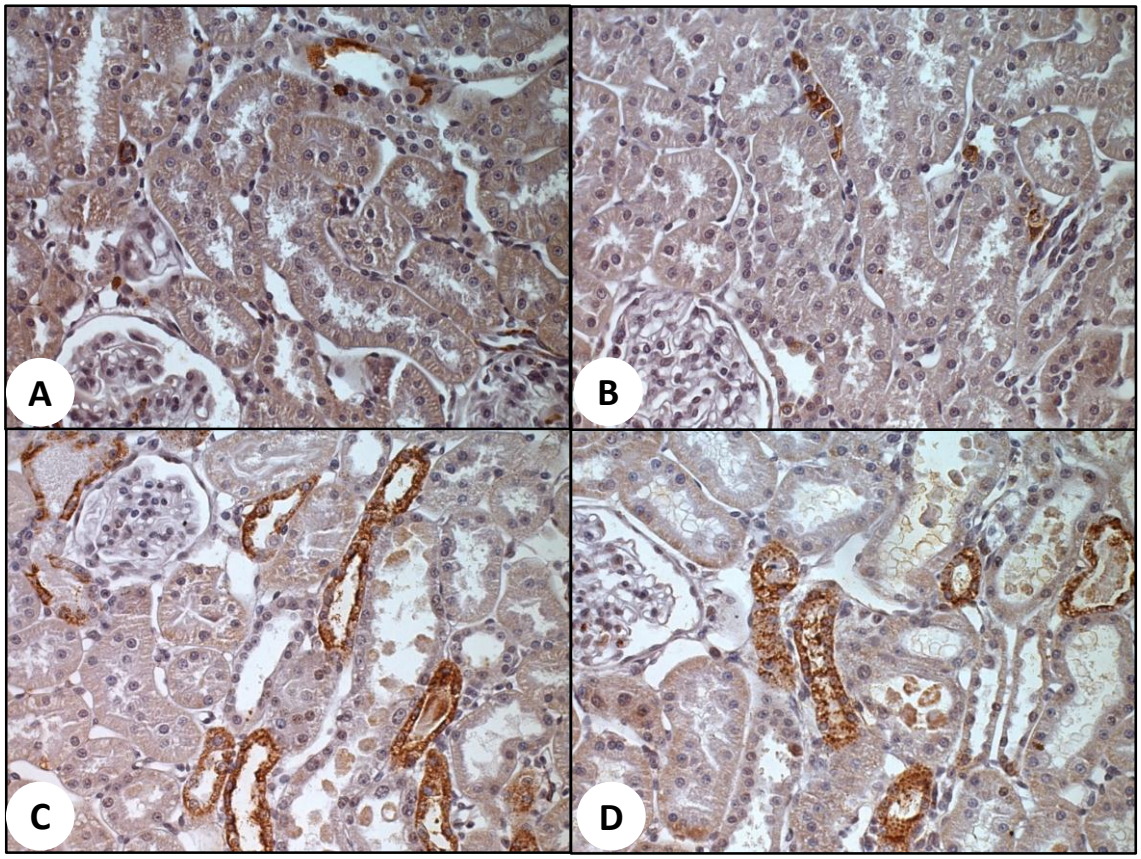


Figura 14 - Imunolocalização de células p21 positivas do córtex renal de ratos - Controle (A), deficiente em vitamina D (B), isquemia/reperfusão renal (C) e deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal (D). Notar que a imunorreação é mais intensa em C do que em D.

A expressão da proteína VDR (receptor para vitamina D) apresentou aumento significativo no grupo Isq (198±0,7 %) quando comparado aos grupos C, dVD e dVD+Isq (99,5±0,5, 57,5±8,5 e 172±10,9 %, respectivamente). Além disso, a expressão do VDR do grupo dVD+Isq foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos C e dVD, demonstrado na tabela 3, figura 15.

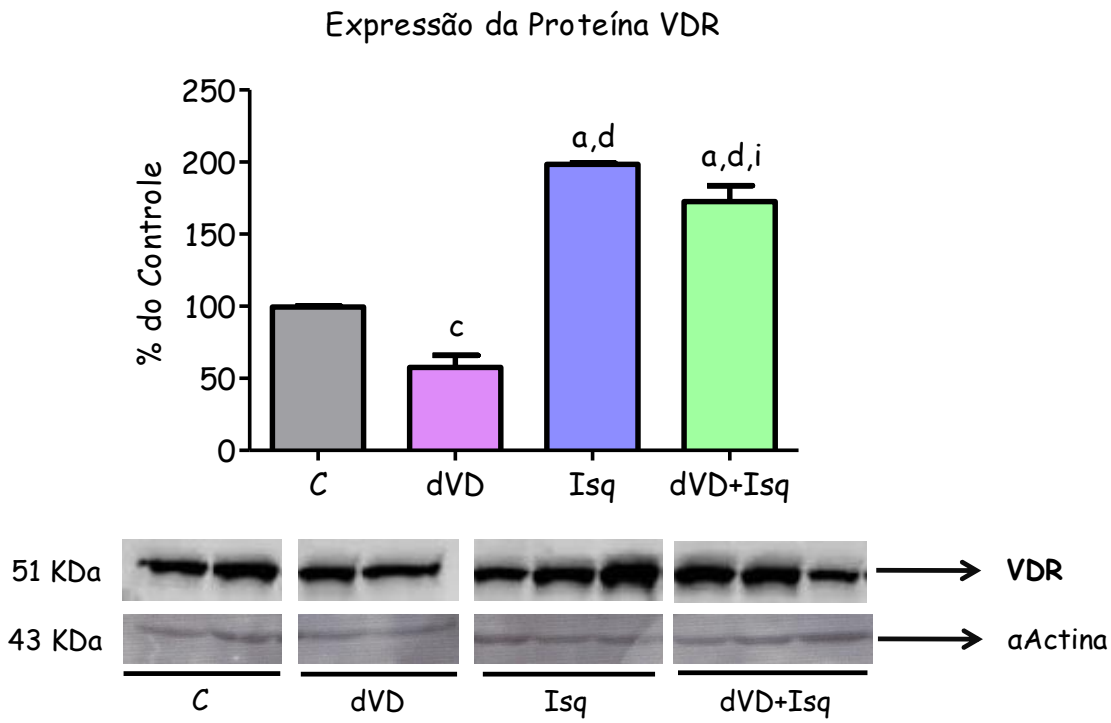


Figura 15 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína VDR de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{c}p < 0,05$ vs. C; $^{d}p<0,001$ vs. dVD; $^{i}p < 0,05$ vs. Isq.

A expressão gênica do VDR não apresentou diferença estatística, entretanto apresentou uma tendência ao aumento nos grupos Isq e dVD+Isq quando comparados aos grupos C e dVD, demonstrado na tabela 5.

O número de células ED1 positivas estava aumentado nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq (5,80±0,73, 9,98±0,68 e 10,38±0,75) quando comparados ao grupo C (2,35±0,12). Essa alteração foi mais evidente nos grupos Isq e dVD+Isq, os quais apresentaram aumento significativo em relação ao grupo dVD, demonstrado na tabela 4, figura 16 .

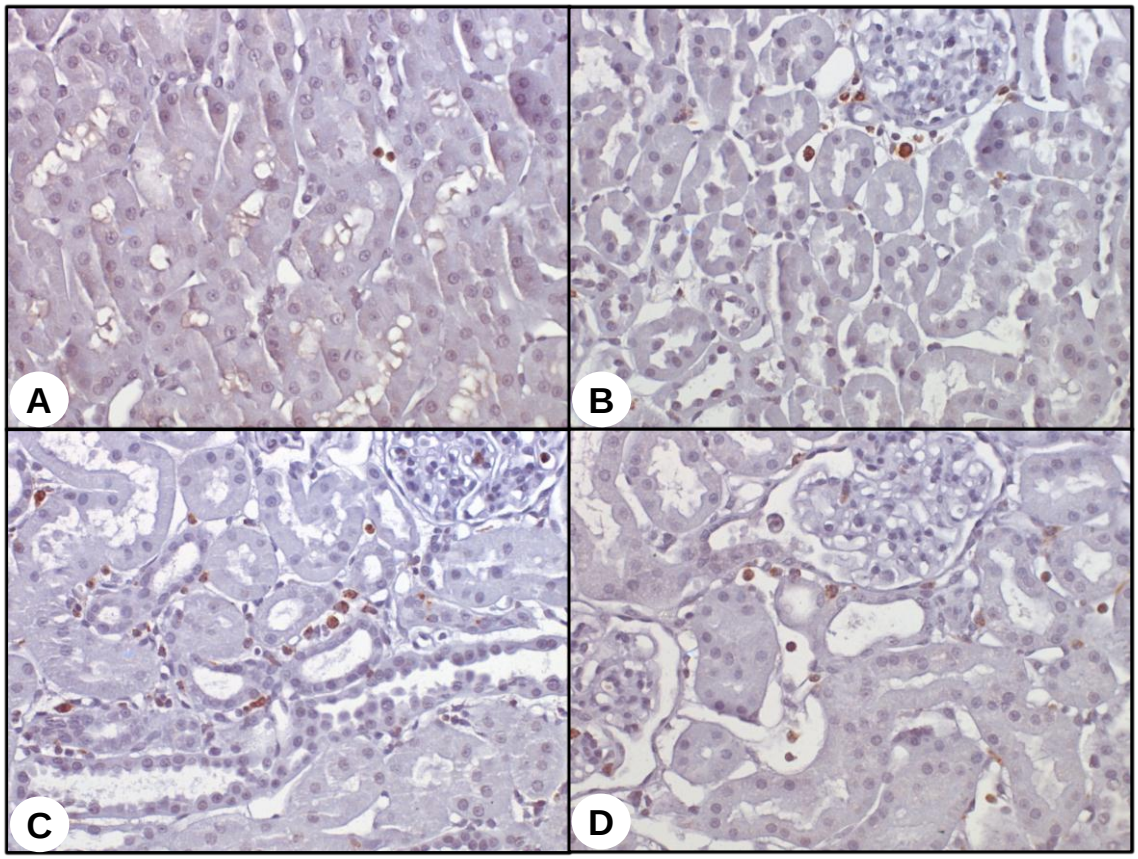


Figura 16 - Imunolocalização de células ED1 positivas do córtex renal de ratos - Controle (A), deficiente em vitamina D (B), isquemia/reperfusão renal (C) e deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal (D). Notar que o número de células ED1 positivas é maior em C e D.

Também avaliamos a presença de linfócitos T no tecido renal. O número de células positivas para linfócito T (CD3) estava aumentado nos grupos Isq e dVD+Isq (21,5±3,5 e 30,9±1,9) quando comparada aos grupos C e dVD (8,91±1,4 e 14,51±1,4). Além disso, o grupo dVD+Isq apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo Isq, demonstrado na tabela 4, figura 17 .

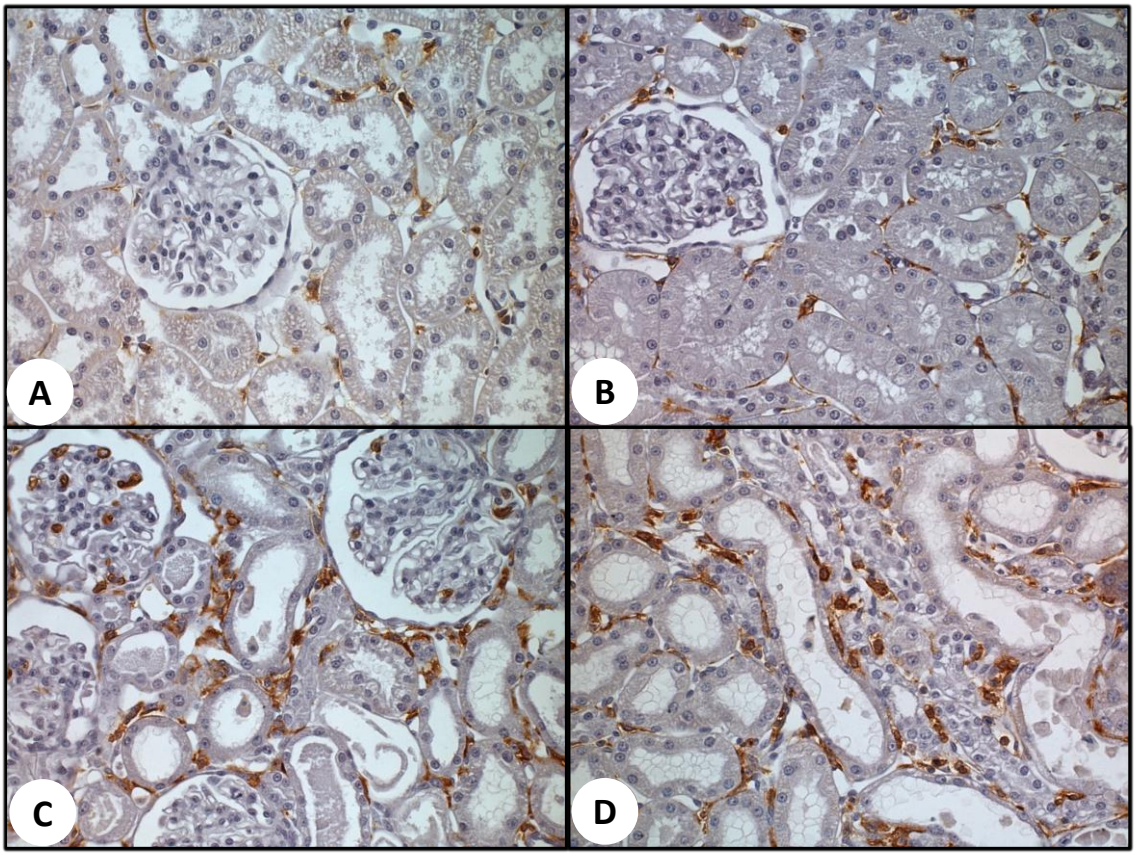


Figura 17 - Imunolocalização de células CD3 positivas do córtex renal de ratos - Controle (A), deficiente em vitamina D (B), isquemia/reperfusão renal (C) e deficiente em vitamina D submetido ao insulto de isquemia/reperfusão renal (D). Notar que o número de células CD3 positivas é maior em C e mais ainda em D.

A área intersticial relativa (%) estava aumentada no grupo dVD (14,04±1,02) quando comparada ao grupo C (7,5±0,42). Os grupos isquêmicos apresentaram uma AIR maior que os grupos C e dVD. Além disso, o grupo dVD+Isq (19,00±0,49) apresentou uma AIR maior ainda do que o grupo Isq (16,70±0,70), demonstrado na tabela 4, figura 18.

O escore de lesão tubular estava aumentado no grupo Isq (1,44±0,12) quando comparado aos grupos C e dVD (0,06±0,01 e 0,10±0,01). Tal alteração foi mais evidente no grupo dVD+Isq (1,72±0,09), que apresentou um escore de lesão tubular ainda maior quando comparado aos grupos C, dVD e Isq, demonstrado na tabela 4, figura 18.

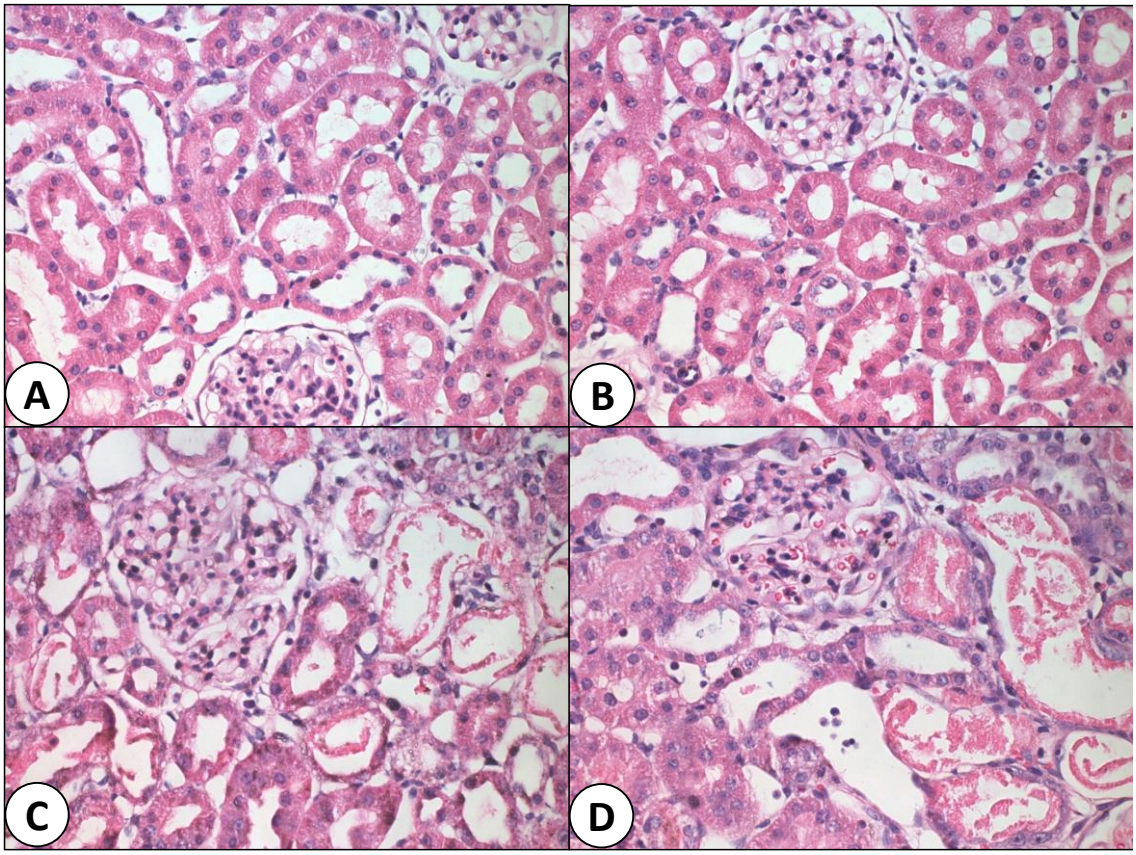


Figura 18 - Fotomicrografias do córtex renal de ratos - Controle (A), deficiente em vitamina D (B), isquemia/reperfusão renal (C) e deficiente em vitamina D submetido ao o insulto de isquemia/reperfusão renal (D) coradas com Hematoxilina/Eosina. Notar que as áreas de lesão tubular são mais extensas nos animais dos grupos isquêmicos (C e D).

Para avaliar o indicativo de apoptose no modelo estudado, verificou-se a expressão da proteína caspase-3. A expressão da proteína caspase-3 foi maior nos grupos Isq e dVD+Isq (218,2±5,83 e 243,5±10,24 %) quando comparada aos grupos C e dVD (99,5±0,64 e 105,8±1,53). Este aumento foi ainda mais evidente no grupo dVD+Isq quando comparado ao grupo Isq, demonstrado na tabela 3, figura 19.

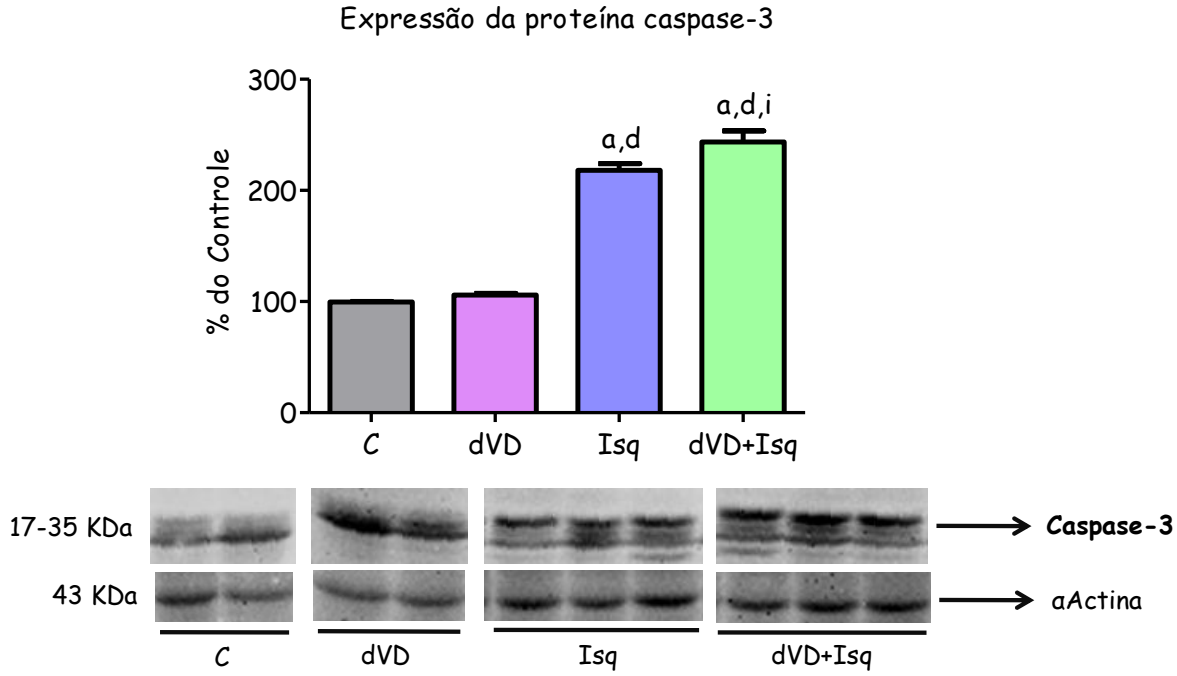


Figura 19 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína caspase-3 de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{d}p<0,001$ vs. dVD; $^{i}p < 0,05$ vs. Isq.

A expressão da proteína Klotho apresentou diminuição significativa nos grupos Isq e dVD+Isq (22±6,0 e 16,7±2,4 %) quando comparados aos grupos C e dVD (98±1,2 e 76±2,4 %). Além disso, o grupo dVD apresentou redução significativa em relação ao grupo C, demonstrado na tabela 3, figura 20.

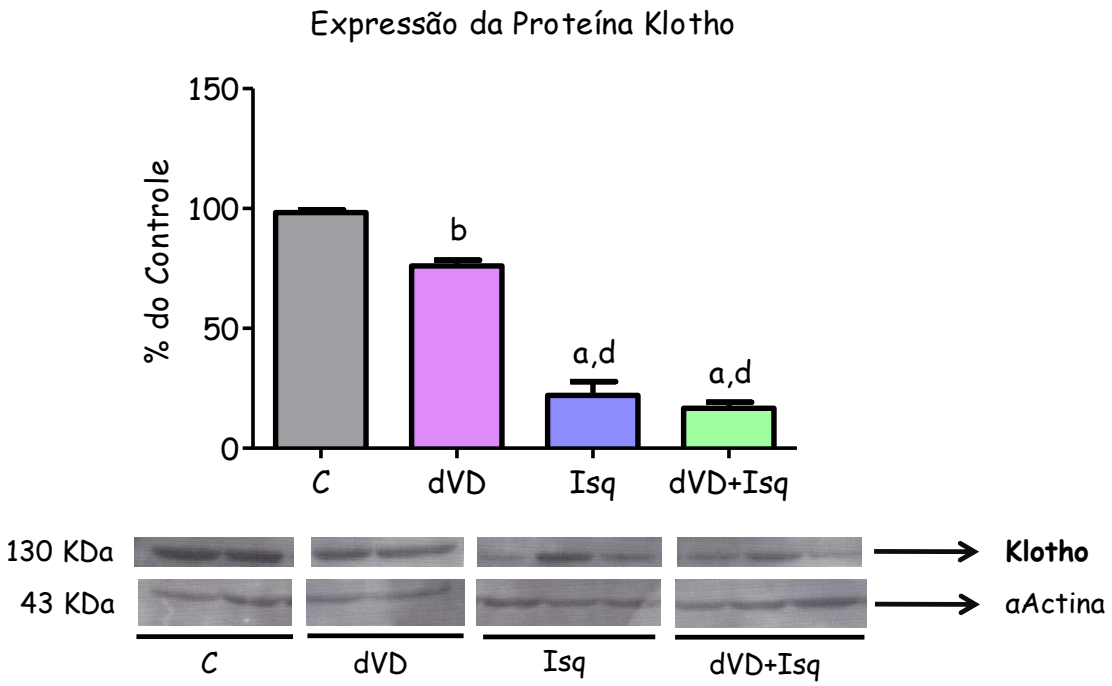


Figura 20 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína Klotho de ratos controles (C), deficientes em vitamina D (dVD), isquemia/reperfusão renal (Isq) e deficientes em vitamina D submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal (dVD+Isq). Valores expressos em média± EPM. $^{a}p < 0,001$ vs. C; $^{b}p < 0,01$ vs. C; $^{d}p<0,001$ vs. dVD.

A expressão gênica do klotho não apresentou diferença significativa, entretanto apresentou uma tendência a diminuição nos grupos dVD, Isq e dVD+Isq quando comparado ao grupo C, demonstrado na tabela 5.

Tabela 3. Expressão de proteínas do tecido renal

Parâmetros	**Controle**	**dVD**	**Isq**	**dVD+Isq**
AQP2 (%)	99±1,0	26,2±0,6[a]	49,0±1,0[a,d]	25,2±0,8[a,g]
p21 (%)	99±6,0	100±27	290±4,8[a,d]	182±2,9[c,f,h]
VDR (%)	99,5±0,5	57,5±8,5[c]	198±0,7[a,d]	172±10,9[a,d,i]
Caspase-3 (%)	99,5±0,6	105,8±1,5	218,2±5,8[a,d]	243,5±10,2[a,d,i]
Klotho (%)	98±1,2	76±2,4[b]	22±6,0[a,d]	16,7±2,4[a,d]

Os dados são expressos com média±EPM. [a]$p < 0,001$ vs. C, [b]$p < 0,01$ vs. C, [c]$p < 0,05$ vs. C, [d]$p < 0,001$ vs. dVD, [f]$p < 0,05$ vs. dVD, [g]$p < 0,001$ vs. Isq; [h]$p < 0,01$ vs. Isq, e [i]$p < 0,05$ vs. Isq.

Tabela 4. Imuno-histoquímica e histomorfometria do tecido renal

Parâmetros	**Controle**	**dVD**	**Isq**	**dVD+Isq**
PCNA (cels+)	0,21±0,06	1,20±0,14	29,41±5,12[a,d]	33,17±5,88[a,d]
p21 (%)	0,5±0,09	0,48±0,09	3,9±0,11[a,d]	3,1±0,57[a,d,i]
ED1 (cels+)	2,35±0,12	5,80±0,73[b]	9,98±0,68[a,d]	10,38±0,75[a,d]
CD3 (cels+)	8,9±1,4	14,5±1,4	21,5±3,5[b,f]	30,9±1,9[a,d,h]
AIR (%)	7,5±0,42	14,04±1,02[a]	16,70±0,70[a,f]	19,00±0,49[a,d,i]
Escore de lesão tubular	0,06±0,01	0,10±0,01	1,44±0,12[a,d]	1,72±0,09[a,d,i]

Os dados são expressos com média±EPM. [a]$p < 0,001$ vs. C, [b]$p < 0,01$ vs. C, [d]$p < 0,001$ vs. dVD, [f]$p < 0,05$ vs. dVD; [h]$p < 0,01$ vs. Isq, e [i]$p < 0,05$ vs. Isq. AIR, área intersticial relativa.

Tabela 5. Expressão gênica do tecido renal

Parâmetros	**Controle**	**dVD**	**Isq**	**dVD+Isq**
renina (ΔΔCt)	1,04±0,55	1,49±0,60	0,78±0,18	0,61±0,25
AGT (ΔΔCt)	0,97±0,49	2,23±0,76	0,12±0,02	0,33±0,13
ECA (ΔΔCt)	0,90±0,36	2,42±1,11	1,74±0,42	2,14±0,76
AT1a (ΔΔCt)	1,05±0,17	1,18±0,07	0,91±0,11	1,00±0,09
VDR (ΔΔCt)	0,70±0,15	0,59±0,10	1,15±0,27	0,83±0,17
klotho (ΔΔCt)	1,85±0,78	0,90±0,29	0,40±0,05	0,47±0,13

Os dados são expressos com média±EPM. AGT, angiotensinogênio; ECA, enzima de conversão da angiotensina I; AT1a, receptor AT1 da Angiotensina II isoforma a.

5. DISCUSSÃO

Os resultados dos níveis plasmáticos da 25 (OH) D, a forma circulante da vitamina D, mostram que a dieta livre de vitamina D oferecida aos animais foi efetiva na obtenção do modelo experimental de deficiência em vitamina D. O nível sérico da 25 (OH) D reflete a vitamina D ingerida através dos alimentos e suplementos assim como a síntese cutânea [40]. Vale a pena ressaltar que nossos animais foram mantidos sem a presença de luz solar.

O clearance de inulina reflete a função renal dos animais estudados e esse resultado evidenciou um efeito deletério da deficiência de vitamina D, contribuindo para a potencialização da IRA induzida pela isquemia/reperfusão. As mudanças fisiopatológicas que são responsáveis pela lesão pós-isquêmica renal e que afetam as funções renais na IRA permanecem pouco conhecidas. É sabido que a IRA é causada por um processo multifatorial e que a prevenção e o tratamento precoce continuam sendo a melhor escolha terapêutica [5]. A fisiopatologia da lesão renal aguda envolve uma interação complexa entre fatores vasculares, tubulares e inflamatórios seguidos por um processo de reparação que pode restaurar a função e a diferenciação epitelial ou resultar em doença renal crônica com aparecimento progressivo de fibrose [41,42]. Entretanto, a disponibilidade de informações na literatura envolvendo a deficiência de vitamina D e queda da taxa de filtração glomerular em modelo experimental agudo de injúria renal é muito escassa, porém, vários são os trabalhos clínicos que associam os baixos níveis de vitamina D como sendo um fator de risco para o desenvolvimento da IRA em pacientes críticos [30,31,43]. Recentemente, de Boer *e cols.* relataram em um estudo clínico que a insuficiência de vitamina D no organismo pode ser um fator de risco para a perda de função renal e terminam por dizer que a suplementação deste hormônio previne o desenvolvimento e a progressão da doença renal crônica [44]. Por outro lado, temos que levar em consideração o SRAA, onde estudos clínicos e estudos experimentais plausíveis mostram que a deficiência de vitamina D contribui para uma inapropriada ativação do SRAA como um mecanismo de progressão da doença renal crônica [45,46,47].

O peso dos animais dos grupos Isq e dVD+Isq foi estatisticamente menor quando comparados aos grupos C e dVD. Esses dados foram obtidos dois dias após o

insulto isquêmico, ou seja, o processo pós-operatório associado à IRA já estabelecida nos levam a entender a perda de peso encontrada.

A relação peso renal/peso corpóreo é uma medida indireta da hipertrofia e proliferação celular e mostrou aumento significativo, evidenciando hipertrofia renal nos grupos Isq e dVD+Isq em relação aos grupos C e dVD. A hipertrofia renal é uma alteração clássica observada nos modelos de isquemia/reperfusão renal [48]. Com relação à vitamina D, sabe-se que uma vez formada, a 1,25 (OH) D pode inibir a proliferação celular, induzir maturação celular, inibir a angiogênese e levar a apoptose na tentativa de prevenir dano celular [49]. Desta forma, nossos dados mostram que a deficiência de vitamina D associada ao insulto isquêmico levou ao aumento ainda mais acentuado da relação peso renal/peso corpóreo contribuindo para o dano celular. Corroborando com estes dados, a expressão de células positivas para PCNA foi analisada, uma vez que a expressão de PCNA pode ser considerada um marcador de proliferação celular [36]. Desta forma, a análise da expressão da PCNA apresentou-se maior nos animais que sofreram o insulto isquêmico e uma tendência a elevar-se nos animais dVD+Isq.

A pressão arterial média e a resistência vascular renal dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq foram estatisticamente maior quando comparados ao grupo C. A resposta natural de autorregulação para alterar a pressão arterial renal tem importantes implicações na oxigenação renal. A autorregulação do fluxo sanguíneo renal é principalmente mediada pela resistência vascular glomerular, impulsionado pela resposta miogênica, feedback túbulo-glomerular, e talvez por mecanismos adicionais. As mudanças na resistência da arteríola eferente, principalmente dependente dos níveis de liberação de renina vinda do aparelho justaglomerular da arteríola aferente são responsáveis pela regulação do ritmo de filtração glomerular [50,51]. De acordo com nossos resultados, a isquemia promoveu um aumento da resistência vascular renal, ou seja, uma constrição para tentar aumentar a pressão arterial renal e reestabelecer o ritmo de filtração glomerular. A deficiência de vitamina D, de acordo com a literatura, pode levar ao aparecimento de hipertensão arterial sistêmica com o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona, do endotélio e de alterações na musculatura lisa vascular. Camundongos deficientes para a 1-α-hidroxilase, a enzima que converte a vitamina D na sua forma ativa, a 1,25 (OH) D, desenvolve hipertensão arterial e hipertrofia do ventrículo direito. Além disso, diretamente, a vitamina D suprime a

expressão de renina [46,47,52]. Estudos mais recentes usando artérias renais de pacientes hipertensos relataram que o calcitriol reduziu a expressão do receptor para angiotensina (AT1) em células endoteliais [53]. Assim, nossos dados mostraram que a deficiência de vitamina D levou ao aumento da pressão arterial média e ao aumento da resistência vascular renal. Entretanto, o insulto isquêmico associado à deficiência de vitamina D não potencializou este fenômeno (aumento da pressão arterial média e resistência vascular renal). Estes dados foram acompanhados pela análise da expressão gênica dos componentes do SRAA (renina, AGT, ECA e AT1a). Embora os dados não tenham sido significativos, foi observada uma tendência à ativação do SRAA dos grupos que receberam a dieta deficiente em vitamina D.

Nos resultados da proteinúria nota-se que tanto o insulto da isquemia/reperfusão como a própria deficiência de vitamina D isolada já interferem com a excreção urinária de proteínas. A associação das duas intervenções culminou em um aumento expressivo da proteinúria. Estudos têm demonstrado que a insuficiência e/ou deficiência de vitamina D está associada ao aumento da prevalência da proteinúria na população adulta em geral [54,55]. Entretanto, os mecanismos pelos quais a proteinúria leva à redução dos níveis de vitamina D no organismo ou vice-versa não estão totalmente esclarecidos [55]. É sabido que níveis baixos de vitamina D podem desencadear proteinúria por fatores diretos e indiretos. Diretamente, baixos níveis de vitamina D induzem a perda de podócitos e desenvolvimento de glomeruloesclerose através de efeitos celulares diretos, prejudicando a integridade da membrana de filtração glomerular [56]. Indiretamente, a vitamina D suprime a transcrição de renina contribuindo para a redução da proteinúria através de efeitos hemodinâmicos [57].

Os resultados referentes à ingestão de água e a diurese dos grupos de animais dVD, Isq e dVD+Isq foram acompanhados de uma diminuição da osmolalidade urinária quando comparados ao grupo C. Corroborando os resultados da diminuição da osmolalidade urinária, a expressão da AQP2 dos grupos dVD, Isq e dVD+Isq estava diminuída em relação ao grupo C. Tal alteração foi observada principalmente naqueles grupos de animais que são deficientes em vitamina D, mostrando que o déficit desse hormônio contribui para a perda da habilidade renal em concentrar a urina. O insulto de isquemia/reperfusão abriga complexas condições que incluem o início de um processo inflamatório, que está associado ao prejuízo da habilidade renal de concentração urinária e transporte de solutos [58]. A isquemia/reperfusão renal está associada a uma

marcante redução na expressão protéica de aquaporinas renais, principalmente AQP1, AQP2 e AQP3 [59]. Contudo, a influência da deficiência da vitamina D na queda da expressão protéica da aquaporina 2, como observado em nossos resultados, permanece desconhecida e praticamente sem informações na literatura científica.

Os níveis plasmáticos de PTH, embora não tenham apresentado diferença estatística entre os grupos de animais estudados, é um parâmetro que devemos levar em consideração. A diminuição do cálcio iônico estimula a liberação do PTH, o qual mantém a homeostase do cálcio, liberando cálcio e fósforo através do aumento da dissolução mineral óssea, aumentando a reabsorção renal de cálcio e excreção renal de fósforo, e ainda aumentando a absorção gastrointestinal de cálcio e fósforo indiretamente através dos seus efeitos via síntese da 1,25 (OH) D (calcitriol). O calcitriol, além de regular a absorção intestinal de cálcio e fósforo, também atua inibindo a síntese do PTH da glândula paratireóide [17]. Assim, de acordo com nossos dados, a deficiência de vitamina D culminou por alterar sim, mesmo sem diferenças estatísticas, a liberação do PTH, e consequentemente também a homeostase do cálcio e do fósforo.

Os níveis plasmáticos de cálcio iônico, assim como a FECa dos grupos de animais que receberam dieta deficiente de vitamina D apresentaram queda significativa em relação aos animais que receberam dieta padrão. Essa alteração já era esperada uma vez que a dieta livre de vitamina D consumida pelos animais também apresentava teores reduzidos de cálcio. Além disso, a própria deficiência de vitamina D e o PTH elevado terminam por interferir com o balanço de cálcio do organismo [17].

Outros resultados interessantes encontrados na execução desse trabalho foram as concentrações plasmáticas de fósforo e sua respectiva fração de excreção. Observamos redução dos níveis de fósforo plasmático em todos os grupos em relação ao controle, o que é esperado nos animais deficientes de vitamina D (com ou sem isquemia). Observamos também hipofosfatemia no grupo isquêmico. Os animais submetidos à cirurgia foram colocados em gaiola metabólica e, portanto, devem diminuir a ingesta de comida o que pode justificar esta queda nos níveis plasmáticos de fósforo. A hipofosfatemia pode ocorrer quando há diminuição da ingestão de fósforo (diminuição da absorção intestinal ou aumento da perda gastrointestinal), ou excesso da perda renal por distúrbios tubulares renais ou hiperparatiroidismo [17]. Observamos que houve um aumento da FEP (embora não significativo) no grupo deficiente de vitamina D em

relação ao controle. Sabemos que a vitamina D é responsável pela absorção intestinal de fósforo [17]. Além disso, como há diminuição dos níveis séricos de vitamina D, espera-se que haja elevação dos níveis séricos de PTH [17]. Observamos este evento no nosso trabalho; o grupo com deficiência de vitamina D apresentou elevação dos níveis séricos de PTH, embora, não significante. A elevação dos níveis séricos de PTH pode justificar também o aumento da FEP encontrada. Para aumentar a excreção urinária de fósforo, o PTH inibe a reabsorção deste íon no túbulo proximal e liga-se a um receptor na membrana basolateral das células desse segmento, desencadeando uma série de eventos que acabam por degradar o co-transportador Na-Pi situado na membrana luminal, fazendo com que a entrada de fósforo seja diminuída [20]. Além disso, substâncias denominadas fosfatoninas, onde a mais conhecida delas é o FGF-23, estão envolvidas na inibição do transporte de fósforo, podendo levar a uma fosfatúria. Entretanto os mecanismos pelo qual as fosfatoninas diminuem a reabsorção de fósforo não estão elucidados [20]. Foi constatado que os animais isquêmicos apresentaram aumento da FEP e isto pode ser explicado pela lesão tubular da injúria renal aguda. Lembrando que a FEP é corrigida pela filtração glomerular. Os animais isquêmicos com deficiência de vitamina D, mesmo com insuficiência renal apresentaram a excreção urinária de fósforo aumentada em relação aos animais controle. Isto também pode ser explicado pelo aumento dos níveis séricos de PTH, aumentando a excreção de fósforo assim como a FEP.

O insulto de isquemia/reperfusão renal pode ativar vias celulares de proliferação e apoptose. A IRA induz células renais quiescentes a entrar no ciclo celular e dispara a indução de inibidores do ciclo celular, incluindo a proteína kinase inibitória p21 [9,10,11]. Fisiologicamente, esta molécula está presente no citoplasma das células e o aumento da sua expressão implica no bloqueio da progressão do ciclo celular, uma vez que a p21 é uma potente inibidora da atividade de ciclinas [9,10,11]. Em nosso estudo, a expressão da p21 apresentou aumento significativo no grupo Isq quando comparada aos grupos C, dVD e dVD+Isq, respectivamente. É interessante notar que ao mesmo tempo em que o insulto de isquemia/reperfusão renal eleva os níveis de p21 citoplasmáticos, a deficiência de vitamina D reduz os níveis desta molécula. As potentes propriedades imunomodulatórias e antiproliferativas da vitamina D sugerem que este hormônio possa participar da fisiopatologia renal [60], controlando a inflamação renal.

A expressão do VDR (receptor para vitamina D) apresentou aumento significativo no grupo Isq quando comparado aos grupos C, dVD e dVD+Isq, respectivamente. A 1,25 (OH) D para atuar e desenvolver seus efeitos antiproliferativos precisa se ligar ao seu receptor, o VDR, no interior do núcleo celular e assim participar do ciclo celular levando as células para a fase G0/G1. A progressão do ciclo celular é regulada por ciclinas e por kinases que inibem ciclinas. Dentre as kinases que inibem as ciclinas temos a p21, que pode atuar via VDRs, inibindo o ciclo celular [61]. Desta forma, no nosso modelo experimental, a deficiência de vitamina D promoveu uma queda da expressão do VDR e uma diminuição da ativação da p21. Portanto, como existe um embotamento ao aumento da p21 na IRA dos animais deficientes de vitamina D em relação aos animais isquêmicos, isto pode acarretar em proliferação. Já é sabido que animais *knockouts* para o gene p21 apresentam uma IRA mais severa que os animais que expressam o p21 [11]. Inicialmente, poderíamos pensar que estes animais *knockouts* apresentariam proteção para a IRA isquêmica, pois haveria maior proliferação celular e, portanto regeneração. Entretanto, como já demonstrado, no momento da lesão de isquemia/reperfusão, a célula necessita estar sem se dividir, para assim poupar energia [10]. Estudos mostram que estes animais *knockouts* para o gene p21, submetidos ao insulto isquêmico renal, apresentam células que tentam se dividir durante o processo ainda de lesão de isquemia/reperfusão e nesta tentativa de se dividir, como há falta de energia e substrato, não completam o ciclo celular. Muitas delas apresentam poliploidia [10]. No entanto, com relação à vitamina D e p21, somente alguns trabalhos envolvendo os mecanismos desencadeados pelo câncer são encontrados na literatura. Assim, frente a estes estudos sabe-se que a vitamina D e seus análogos podem inibir *in vitro* o crescimento de células envolvidas no câncer pancreático via ativação do p21 e p27, os quais influenciam a progressão e parada das células na fase G0/G1 [62,63]. Entretanto, a literatura é escassa quanto ao estudo da deficiência de vitamina D e p21.

Outro dado interessante foi a expressão de células ED1 positivas, que se apresentou elevada nos animais deficientes em vitamina D e mais ainda nos animais submetidos ao insulto isquêmico. A inflamação é uma das principais complicações da IRA. Já a vitamina D pode atenuar o quadro inflamatório [21,64]. Nossos dados mostram que no grupo de animais deficientes de vitamina D já existe um processo de

dano tecidual com infiltração de macrófagos, e isso ficou ainda mais evidente nos animais submetidos ao insulto isquêmico.

Também avaliamos a presença de linfócitos T no tecido renal, uma vez que tanto a fase inicial como a tardia é caracterizada pela presença de linfócitos na IRA [41], e isso foi observado nos nossos animais do grupo Isq. Entretanto, foi no grupo dVD+Isq que esses dados foram ainda mais evidentes, mostrando que a deficiência de vitamina D potencializou esse aumento.

Um quadro bastante encontrado no modelo de isquemia e reperfusão é a presença de necrose tubular, acompanhada de aumento de infiltrado de células, dilatação tubular, expansão da área intersticial e ainda a presença de apoptose celular [5,41]. Estes achados foram encontrados no nosso modelo e estavam mais evidentes nos animais deficientes em vitamina D submetidos ao insulto isquêmico, mostrando que a deficiência de vitamina D pode ser um fator agravante diante de um evento de injúria renal aguda.

Como a p21 está envolvida no processo do envelhecimento verificamos a expressão proteica do Klotho. A expressão de Klotho apresentou-se diminuída nos animais submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão quando comparados aos grupos C e dVD. Sabe-se que a IRA leva a uma rápida e pronunciada redução do mRNA e da proteína Klotho no rim dos animais, entretanto, o mecanismo pelo qual o Klotho é menos expresso não é conhecido [25]. A deficiência de Klotho leva a uma alta produção de 1,25 (OH) D e aumenta a produção de estresse oxidativo. Uma alta produção de 1,25 (OH) D pode ser o principal responsável pelo fenótipo do envelhecimento em camundongos deficientes de Klotho. Entretanto, estudos mostram que o fosfato e não o cálcio ou a vitamina D, é o responsável pelos fenótipos do envelhecimento. Embora seja provável que a diminuição de vitamina D na dieta ou a ablação da atividade da vitamina D acelerem o envelhecimento através da redução dos níveis de fosfato sérico, também é possível que altos níveis séricos de vitamina D e/ou de cálcio possam ser pré-requisito para o fosfato induzir características precoces do envelhecimento. Ou seja, existe um feedback negativo envolvendo a vitamina D e o eixo Klotho-FGF-23 [25,26,65]. Sabe-se que o klotho participa da via p53/p21. Após dano ao DNA, estudos mostram que o klotho pode induzir o fenótipo de senescência celular através da via de sinalização p53/p21 [26,27]. De acordo com nossos dados, a expressão proteica do Klotho está

reduzida nos animais submetidos ao insulto isquêmico, e a expressão proteica da p21 está elevada nesses mesmos animais, nos levando a associar esses dois parâmetros.

De acordo com nossos resultados, a deficiência de vitamina D promoveu uma queda da filtração glomerular e aumento da proteinúria agravando a IRA isquêmica. Além disso, observamos aumento da relação peso renal/peso corporal, sugerindo maior proliferação e hipertrofia. A deficiência de vitamina D também induziu uma diminuição na ativação do VDR e da expressão da proteína p21, e aumento da expressão de caspase-3. Na carência deste hormônio também observamos déficit de concentração urinário com diminuição da expressão da AQP2; e um maior dano morfológico caracterizado pelo aumento da área intersticial e presença de necrose tubular.

6. CONCLUSÃO

A deficiência de vitamina D agrava a IRA isquêmica. Os mecanismos de potencialização da lesão de isquemia/reperfusão renal podem ser através de uma menor ativação da proteína p21, via receptor de vitamina D.

7. ANEXO

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16.06.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa **nº 133/10** intitulado: "**Estudo da deficiência de vitamina D em modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos**" e seus anexos, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Lucia da Conceição Andrade
Pesquisador (a) Executante: Ana Carolina de Bragança

CEP-FMUSP, 16 de junho de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andreoli SP (2009) Acute kidney injury in children. Pediatr Nephrol 24: 253-263.
2. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA (2012) Pathophysiology of acute kidney injury. Compr Physiol 2: 1303-1353.
3. Yang L, Humphreys BD, Bonventre JV (2011) Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: maladaptive repair. Contrib Nephrol 174: 149-155.
4. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, et al. (2013) World incidence of AKI: a meta-analysis. Clin J Am Soc Nephrol 8: 1482-1493.
5. de Araujo M, Andrade L, Coimbra TM, Rodrigues AC, Jr., Seguro AC (2005) Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol 16: 3339-3349.
6. Schor N, Boim MA, Santos OFP (1997) Insuficiencia renal aguda. São Paulo: Sarvier. 17 p.
7. Sutton TA, Molitoris BA (1998) Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. Semin Nephrol 18: 490-497.
8. Hussein AA, El-Dken ZH, Barakat N, Abol-Enein H (2012) Renal ischaemia/reperfusion injury: possible role of aquaporins. Acta Physiol (Oxf) 204: 308-316.
9. Price PM, Megyesi J, Safirstein RL (2003) Cell cycle regulation: repair and regeneration in acute renal failure. Semin Nephrol 23: 449-459.
10. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J (2009) The cell cycle and acute kidney injury. Kidney Int 76: 604-613.
11. Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr., Safirstein RL, Price PM (2001) Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. Kidney Int 60: 2164-2172.
12. Megyesi J, Udvarhelyi N, Safirstein RL, Price PM (1996) The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. Am J Physiol 271: F1211-1216.
13. Lanske B, Razzaque MS (2007) Vitamin D and aging: old concepts and new insights. J Nutr Biochem 18: 771-777.
14. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. N Engl J Med 357: 266-281.

15. Aires MM (1999) Fisiologia Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 855-861 p.
16. Kim HS, Chung W, Kim S (2011) Vitamin d, and kidney disease. Electrolyte Blood Press 9: 1-6.
17. Moe SM (2008) Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. Prim Care 35: 215-237, v-vi.
18. Schiavi SC (2006) Fibroblast growth factor 23: the making of a hormone. Kidney Int 69: 425-427.
19. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. Am J Physiol Renal Physiol 289: F8-28.
20. Zatz R (2011) Bases Fisiológicas da Nefrologia. São Paulo: Atheneu. 251-271 p.
21. Dusso AS, Tokumoto M (2011) Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. Kidney Int 79: 715-729.
22. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, et al. (2013) Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. Calcif Tissue Int 92: 77-98.
23. Wang Y, Borchert ML, Deluca HF (2012) Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. Kidney Int 81: 993-1001.
24. Dusso AS (2012) Renal vitamin D receptor expression and vitamin D renoprotection. Kidney Int 81: 937-939.
25. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Kuro-o M, et al. (2010) Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. Kidney Int 78: 1240-1251.
26. Wang Y, Sun Z (2009) Current understanding of klotho. Ageing Res Rev 8: 43-51.
27. de Oliveira RM (2006) Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. FEBS Lett 580: 5753-5758.
28. Tsiaras WG, Weinstock MA (2011) Factors influencing vitamin D status. Acta Derm Venereol 91: 115-124.
29. Wacker M, Holick MF (2013) Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. Dermatoendocrinol 5: 51-108.
30. Braun AB, Christopher KB (2013) Vitamin D in acute kidney injury. Inflamm Allergy Drug Targets 12: 262-272.

31. Braun AB, Litonjua AA, Moromizato T, Gibbons FK, Giovannucci E, et al. (2012) Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and acute kidney injury in the critically ill. Crit Care Med 40: 3170-3179.
32. Lee P, Eisman JA, Center JR (2009) Vitamin D deficiency in critically ill patients. N Engl J Med 360: 1912-1914.
33. Lee P, Nair P, Eisman JA, Center JR (2009) Vitamin D deficiency in the intensive care unit: an invisible accomplice to morbidity and mortality? Intensive Care Med 35: 2028-2032.
34. Belostotsky V, Mughal MZ, Berry JL, Webb NJ (2008) Vitamin D deficiency in children with renal disease. Arch Dis Child 93: 959-962.
35. Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 112: 195-203.
36. Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A (2001) Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. J Am Soc Nephrol 12: 900-908.
37. Volpini RA, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM (2004) Inhibition of nuclear factor-kappaB activation attenuates tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. Nephron Physiol 98: p97-106.
38. Lancas T, Kasahara DI, Gross JL, Pires-Neto RC, Deheinzelin D, et al. (2011) Cholinergic hyperresponsiveness of peripheral lung parenchyma in chronic obstructive pulmonary disease. Respiration 82: 177-184.
39. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408.
40. Powers JG, Gilchrest BA (2012) What you and your patients need to know about vitamin D. Semin Cutan Med Surg 31: 2-10.
41. Bonventre JV (2010) Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. Contrib Nephrol 165: 9-17.
42. Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC (2010) Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. J Am Soc Nephrol 21: 966-973.

43. Schenk LK (2012) Low 25-hydroxyvitamin D: a significant risk factor for acute kidney injury in critically ill patients. Crit Care Med 40: 3314-3315.

44. de Boer IH, Katz R, Chonchol M, Ix JH, Sarnak MJ, et al. (2011) Serum 25-hydroxyvitamin D and change in estimated glomerular filtration rate. Clin J Am Soc Nephrol 6: 2141-2149.

45. Ferder M, Inserra F, Manucha W, Ferder L (2013) The world pandemic of vitamin D deficiency could possibly be explained by cellular inflammatory response activity induced by the renin-angiotensin system. Am J Physiol Cell Physiol 304: C1027-1039.

46. Lucisano S, Buemi M, Passantino A, Aloisi C, Cernaro V, et al. (2013) New insights on the role of vitamin d in the progression of renal damage. Kidney Blood Press Res 37: 667-678.

47. Vaidya A, Williams JS (2012) The relationship between vitamin D and the renin-angiotensin system in the pathophysiology of hypertension, kidney disease, and diabetes. Metabolism 61: 450-458.

48. Leonard EC, Friedrich JL, Basile DP (2008) VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. Am J Physiol Renal Physiol 295: F1648-1657.

49. Holick MF (2013) Vitamin D, Sunlight and Cancer Connection. Anticancer Agents Med Chem 13: 70-82.

50. Evans RG, Ince C, Joles JA, Smith DW, May CN, et al. (2013) Haemodynamic influences on kidney oxygenation: The clinical implications of integrative physiology. Clin Exp Pharmacol Physiol 40: 106-122.

51. Metra M, Cotter G, Gheorghiade M, Dei Cas L, Voors AA (2012) The role of the kidney in heart failure. Eur Heart J 33: 2135-2142.

52. Tamez H, Kalim S, Thadhani RI (2013) Does vitamin D modulate blood pressure? Curr Opin Nephrol Hypertens 22: 204-209.

53. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, et al. (2012) Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. Eur Heart J 33: 2980-2990.

54. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzell JD, Weiss NS (2007) 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). Am J Kidney Dis 50: 69-77.

55. Lee DR, Kong JM, Cho KI, Chan L (2011) Impact of vitamin D on proteinuria, insulin resistance, and cardiovascular parameters in kidney transplant recipients. Transplant Proc 43: 3723-3729.

56. Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, Reulbach U, Holzinger M, et al. (2004) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotally nephrectomized rat. Am J Physiol Renal Physiol 286: F526-533.

57. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, et al. (2008) Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. Kidney Int 74: 1394-1402.

58. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL (2001) Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. Am J Physiol Renal Physiol 281: F887-899.

59. Hussein AA, El-Dken ZH, Barakat N, Abol-Enein H (2012) Renal ischaemia/reperfusion injury: possible role of aquaporins. Acta Physiol (Oxf) 204: 308-316.

60. Osborne JE, Hutchinson PE (2002) Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? Br J Dermatol 147: 197-213.

61. Chiang KC, Chen TC (2009) Vitamin D for the prevention and treatment of pancreatic cancer. World J Gastroenterol 15: 3349-3354.

62. Kawa S, Nikaido T, Aoki Y, Zhai Y, Kumagai T, et al. (1997) Vitamin D analogues up-regulate p21 and p27 during growth inhibition of pancreatic cancer cell lines. Br J Cancer 76: 884-889.

63. Schwartz GG, Eads D, Naczki C, Northrup S, Chen T, et al. (2008) 19-nor-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D2 (paricalcitol) inhibits the proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Biol Ther 7: 430-436.

64. Panichi V, Migliori M, Taccola D, Filippi C, De Nisco L, et al. (2001) Effects of 1,25(OH)2D3 in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. Kidney Int 60: 87-95.

65. Kuro-o M (2010) Klotho. Pflugers Arch 459: 333-343.