VANESSA GEROLDE CARDOSO

O PAPEL DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES RENAIS E DA BARREIRA DE ULTRAFILTRAÇÃO GLOMERULAR: CONTRIBUIÇÕES DE LEPTINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2021

VANESSA GEROLDE CARDOSO

O PAPEL DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES RENAIS E DA BARREIRA DE ULTRAFILTRAÇÃO GLOMERULAR: CONTRIBUIÇÕES DE LEPTINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gerolde Cardoso, Vanessa
O papel da obesidade no desenvolvimento de lesões renais e da barreira de ultrafiltração glomerular: contribuições de leptina / Vanessa Gerolde Cardoso; orientador Maria Oliveira de Souza. -- São Paulo, 2021.
93 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Obesidade. 2. Leptina. 3. Injúria Renal. 4. Glomerulopatia. I. Oliveira de Souza, Maria, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Gerolde Cardoso.

Título da Tese: O papel da obesidade no desenvolvimento de lesões renais e da barreira de ultrafiltração glomerular: contribuições de leptina

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMITÊ DE ÉTICA

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 00
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Influência da obesidade e do diabetes mellitus do tipo II no desenvolvimento da doença renal crônica: contribuição da leptina e angiotensina II nos processos inflamatórios***", registrado sob o protocolo nº ***13/2017***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***29/03/2017*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Maria Oliveira de Souza***
- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*
- Membros da Equipe: *Vanessa Gerolde Cardoso (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Influence of obesity and diabetes mellitus type II in the development of chronic kidney disease: contribution of leptin and angiotensin II in inflammatory processes***", protocol nº ***13/2017***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***3/29/2017*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Maria Oliveira de Souza***
- Team members: *Vanessa Gerolde Cardoso (Graduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57bl/6j*	*Macho/male*	*30 g*	*10*
	Ob/Ob	*Macho/male*	*50 g*	*60*

São Paulo, 03 de abril de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

DECLARAÇÃO

Este estudo parcial foi realizado antes do isolamento social em decorrência da pandemia de Covid-19, condição que resultou em suspensão de todas as atividades laboratoriais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a toda minha família por ser porto seguro e refúgio sempre, sem a força de cada um de vocês nada seria possível. Agradeço especialmente minha mãe, Rose, por todo amor, dedicação e incentivo que sempre me deu em todos os caminhos que escolhi trilhar na vida. Eu não estaria aqui hoje se não fosse por você. Ao meu pai, Nilson, por sempre me mostrar o valor da dedicação, do trabalho e do estudo mesmo sem ter concluído a educação básica. Se eu cheguei até aqui, foi porque me apoiei nos ombros de um Paraense gigante. À minha irmã, Priscilla, que me inspira a perseguir meus objetivos. Você é meu orgulho e apesar de mais nova, meu exemplo de determinação. Ao meu padrasto Nelson, por sempre incentivar minha curiosidade e me impulsionar a ir mais longe.

Ao meu namorado Carlos, agradeço por todo apoio, por sempre me incentivar a ir em frente e, mais importante, por ter me ensinado a parar e respirar. Você é minha calmaria em meio ao caos.

Aos amigos, agradeço a cada um de vocês pelo apoio, pelas risadas e pelo ombro nos momentos difíceis. Sem as mesas de bar que tive com cada um, talvez não estivesse escrevendo estes agradecimentos.

Aos colegas de laboratório, agradeço por todo auxílio ao longo do doutorado. Tenho sorte de ter tido colegas sempre prestativos e generosos. Especialmente, agradeço à Mariana, amiga que ganhei na pós-graduação, foi uma honra ter trilhado os caminhos árduos da vida acadêmica ao seu lado. Nos seis anos que trabalhamos juntas dividimos angustias, preocupações e evoluímos juntas. Pude ver de perto a cientista generosa, humilde e perspicaz que você se tornou e tenho certeza que você tem um caminho brilhante dentro da ciência.

À minha orientadora, Profa. Maria Oliveira de Souza, sou grata pela oportunidade de iniciar minha vida acadêmica e por todo o aprendizado ao longo dos mais de 6 anos que estive sob sua orientação.

Ao professor José Donato Junior, por ceder os animais obesos sem os quais este estudo não seria possível.

À Juliana Martins, técnica em laboratório, agradeço por todo apoio e aprendizado ao longo da minha pós-graduação.

Por fim, agradeço as agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq (Processo: 166192/2018-0) pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

RESUMO

CARDOSO, V. G. **O papel da obesidade no desenvolvimento de lesões renais e da barreira de ultrafiltração glomerular: contribuições de leptina.** 2021. 85f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Introdução: A obesidade está associada a múltiplos fatores de risco para o desenvolvimento de comorbidades como inflamação sistêmica e lesões renais. Lesões na barreira de ultrafiltração glomerular podem causar comprometimento do processo de filtração glomerular. A nefrina é um dos principais componentes da barreira de ultrafiltração glomerular, portanto, alterações na expressão desta proteína indicam comprometimento da função renal. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da obesidade, assim como da inflamação e da angiotensina II, no desenvolvimento de lesões renais e da barreira de ultrafiltração glomerular. A contribuição da leptina para a função renal neste contexto também foi avaliada. **Métodos:** Foram utilizados 44 camundongos, sendo 16 C57BL/6J e 28 ob/ob. Os animais foram distribuídos em dois protocolos experimentais. No primeiro, os camundongos tinham cerca de 8 semanas e foram tratados com leptina por 28 dias, no segundo os animais tinham 18 semanas e foram tratados com leptina por 42 dias. Os camundongos dos dois protocolos foram distribuídos em três grupos: controle magro (CTL), obesos (ob/ob) e obesos tratados com leptina (ob/ob - lep). O tratamento com leptina foi realizado por meio de inserção de minibomba osmótica. As minibombas foram preenchidas com solução contendo leptina na dose de 3,5µg/dia por 28 ou 42 dias. Durante o período de tratamento, a ingestão de alimentos foi monitorada diariamente. O ganho de peso e a glicemia foram monitorados semanalmente. Ao final do período de tratamento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas para avaliação da ingestão de água e coleta de urina. Por fim, os animais foram submetidos à eutanásia e foi feita coleta de sangue e tecido renal. A função renal foi avaliada pela concentração plasmática de creatinina e uréia e pela excreção urinária de albumina. O tecido renal foi utilizado para avaliar a expressão gênica por qPCR, análises histológicas e imunofluorescência. **Resultados:** No protocolo experimental de 28 dias, o tratamento com leptina parece não ter sido eficaz já que não houve redução no peso dos animais obesos tratados com leptina em relação aos animais obesos sem tratamento. Porém, os camundongos obesos apresentaram alterações discretas como, aumento da ureia plasmática, na expressão de agiotensinogênio e de MCP1 (do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*) no tecido renal e da área glomerular. O tratamento com leptina não foi capaz de reverter a maior parte dos parâmetros observados. Estes resultados indicam que em camundongos *ob/ob*, há alteração renal mesmo em animais jovens. Já no protocolo de 42 dias, a redução de peso e medidas plasmáticas de leptina confirmaram a eficiência do tratamento com este hormônio. Nos animais obesos houve aumento da creatinina e ureia plasmática, na excreção urinária de albumina e na expressão de fatores inflamatórios e de componentes do sistema renina angiotensina intrarrenal. A leptina se mostrou parcialmente renoprotetora. Neste grupo, não houve hipertrofia glomerular nos animais obesos, porém, houve redução da expressão de nefrina e proliferação celular que pode indicar expansão mesangial, o tratamento com leptina não reverteu esses parâmetros. **Conclusão:** A obesidade prejudica a função renal, aumenta a expressão de moléculas inflamatórias e do SRA (Sistema renina-angiotensina) intrarenal e diminui a expressão de nefrina. A terapia com leptina foi parcialmente renoprotetora, uma vez que reverteu alguns dos parâmetros observados. As características renais dos animais obesos têm muitas semelhanças com a glomerulopatia relacionada a obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Leptina. Injúria renal. Glomerulopatia.

ABSTRACT

CARDOSO, V. G. **The role of obesity in the development of kidney and glomerular ultrafiltration barrier injuries: leptin contributions.** 2021. 85 p. Doctorate thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

Introduction: Obesity is associated with multiple risk factors to the development of comorbidities such as systemic inflammation and kidney injuries. Lesions in the glomerular ultrafiltration barrier may cause impairment of the kidney filtration process. Nephrine is one of the main components of the glomerular ultrafiltration barrier, therefore changes in the expression of this protein indicate impaired renal function. Thus, this study aimed to investigate the role of obesity as well as inflammation and angiotensin II, in the development of kidney and glomerular ultrafiltration barrier injuries. The contribution of leptin to kidney function in this context was also evaluated. **Methods:** Forty-four mice were used in this study, sixteen C57BL / 6J and twenty-eight obese ob/ob mice. The animals were distributed in two experimental protocols. In the first protocol, the mice were about eight weeks old and treated with leptin for 28 days; in the second protocol, the animals were eighteen weeks old and were treated with leptin for 42 days. Mice from the two protocols were randomly distributed into three groups: lean control (CTL), obese (ob/ob) and obese treated with leptin (ob/ob - lep). Leptin treatment was carried out by inserting an osmotic mini-pump. The mini-pumps were filled with a solution containing leptin at a dose of 3.5 µg/day for 28 or 42 days. During the treatment period, food intake was monitored daily. Weight gain and blood glucose were monitored weekly. At the end of the treatment period, the animals were kept in metabolic cages for 24 hours to assess water intake and urine collection. Finally, the animals were euthanized and blood and renal tissue were collected. Renal function was assessed by plasma creatinine and urea concentration and urinary albumin excretion. Renal tissue was used to evaluate gene expression by qPCR, histological analysis and immunofluorescence. **Results:** In the 28-days experimental protocol, leptin treatment did not seem to have been effective since there was no reduction in the leptin treated obese animals weight compared to obese animals without treatment. However, obese mice of this group showed mild changes such as increased plasma urea, increased expression of agiotensinogen and MCP1 in renal tissue and increased glomerular area. Leptin treatment was not able to reverse most of the observed parameters. These results indicate that in ob/ob mice, there is renal alteration in young animals. In the 42-days protocol, weight reduction and plasma leptin measurements confirmed the efficiency of leptin treatment. In obese animals, there was an increase in plasma urea, urinary albumin excretion, expression of inflammatory factors and components of the intrarenal renin-angiotensin system. In these parameters, leptin was partially renoprotective. In this group, there was no glomerular hypertrophy in obese animals, however, there was a reduction in nephrine expression and cell proliferation that may indicate mesangial expansion, and leptin treatment did not reverse these parameters. **Conclusion:** Obesity impairs renal function, increases the expression of inflammatory molecules and intrarenal RAS and decreases the expression of nephrine. Leptin therapy was partially renoprotective, since it reversed some of the observed parameters. The renal characteristics of obese animals have many similarities to obesity-related glomerulopathy.

Keywords: Obesity. Leptin. Kidney injury. Glomerulopathy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do tecido adiposo..... 19
Figura 2: Esquema representativo da sinalização celular da leptina..... 21
Figura 3: Esquema representativo da ativação do SRA nos adipócitos..... 24
Figura 4: Componentes da barreira de ultrafiltração glomerular..... 26
Figura 5: Esquema representativo camundongos *ob/ob* 28 dias..... 31
Figura 6: Esquema representativo camundongos *ob/ob* 42 dias..... 31
Figura 7: Ingestão de ração diária nos grupos..... 41
Figura 8: Peso corporal semanal e ganho de peso..... 42
Figura 9: Glicemia semanal..... 45
Figura 10: Creatinina plasmática..... 46
Figura 11 – Clearance de creatinina..... 46
Figura 12 – Ureia plasmática..... 47
Figura 13 – Albumina urinária em animais..... 48
Figura 14 – Área glomerular do grupo de 28 dias..... 50
Figura 15 – Área glomerular do grupo de 42 dias..... 50
Figura 16 – Imunofluorescência de nefrina em glomérulos..... 52
Figura 17 – Expressão renal de RNAm para angitensinogênio (AGT)..... 53
Figura 18 – Expressão renal de RNAm para Renina..... 54
Figura 19 – Expressão de RNAm para TNFα, IL6 e MCP1..... 55
Figura 20 – Expressão renal de RNAm para TNFα..... 56
Figura 21 – Expressão renal de RNAm para IL-6..... 56
Figura 22 – Expressão renal de RNAm para MCP1..... 57
Figura 23 – Expressão renal de RNAm para α-SMA..... 58
Figura 24 – Expressão proteica renal para α-SMA..... 59
Figura 25 – Expressão renal de RNAm para colágenos I e II..... 60
Figura 26 – Expressão renal de RNAm para KI67 no grupo de 42 dias..... 61
Figura 27 – Imunofluorescência de DAPI e WT1 no grupo de 42 dias..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingestão diária de ração em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 39
Tabela 2 – Leptina plasmática (pg/mL) nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias..... 39
Tabela 3 – Ganho de peso em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 41
Tabela 4 – Peso do rim em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 41
Tabela 5 – Ingestão de água em animais CTL, *ob/ob* e *ob/o*b -lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 41
Tabela 6 – Fluxo urinário em animais CTL, *ob/ob e ob/ob* -lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 42
Tabela 7 – Frutosamina plasmática em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* – lep tratados por 28 e 42 dias..... 43
Tabela 8 – Creatinina plasmática em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 44
Tabela 9 – Clearance de creatinina em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 45
Tabela 10 – Ureia plasmática em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 46
Tabela 11 – Albumina urinária em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 47
Tabela 12 – Na^+ plasmático em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 47
Tabela 13 – K^+ plasmático em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 47
Tabela 14 – Área glomerular dos animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias..... 49
Tabela 15 – K^+ plasmático em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 50
Tabela 16 – Expressão renal de RNAm para angitensinogênio (AGT) em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 51
Tabela 17 – Expressão renal de RNAm para Renina em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 52
Tabela 18– Expressão de RNAm no tecido adiposo renal de fatores inflamatórios em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias)..... 53
Tabela 19 – Expressão renal de RNAm para TNFα em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 54
Tabela 20 – Expressão renal de RNAm para IL-6 em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 55
Tabela 21 – Expressão renal de RNAm para MCP1 em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 55
Tabela 22 – Expressão renal de RNAm para α-SMA em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 56

Tabela 23 – Expressão proteica renal α-SMA em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 57
Tabela 24 – Expressão renal de RNAm para α-SMA em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias)..... 58
Tabela 25 – Expressão renal de RNAm para KI67 em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/ 42 dias..... 59
Tabela 26 – Imunofluorescência de DAPI e WT1 em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias..... 61

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

αSMA	Do inglês: *alpha smooth muscle actin*
AGT	Angiotensinogênio
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AT_1	Receptor de Angiotensina II tipo 1
AT_2	Receptor de Angiotensina II tipo 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença Renal Crônica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
GESF	Glomeruloesclerose Segmentar Focal
GRO	Glomerulopatia associada ao diabetes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS	Do inglês: *insulin receptor substrate*
JAK2	Do inglês: janus kinase 2
K^+	Potássio
MBG	Membrana basal glomerular
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
Na^+	Sódio
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização mundial da saúde
PI3K	Do inglês: phosphatydylinositol-3 kinase
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SHP2	Do inglês: SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2
SM	Síndrome Metabólica
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SOCS3	Do inglês: *suppressor of cytokine signaling 3*
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAT3	Do inglês: signal transducers and activators of transcription 3
STAT5	Do inglês: signal transducers and activators of transcription 5
STAT6	Do inglês: signal transducers and activators of transcription 6
STATs	Do inglês: signal transducers and activators of transcription

TGF-β	Do inglês: *Transforming growth factor beta 1*
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WT1	Tumor de Wilms 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Obesidade 17
1.2 Leptina e seus receptores 19
1.3 Efeitos da leptina no rim 21
1.4 Sistema renina-angiotensina-aldosterona 22
1.5 SRA Intra-renal 22
1.6 Nefrina 24
1.7 Glomerulopatia associada a obesidade 26
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE 27
3 OBJETIVOS 28
3.1 Objetivos Específicos 28
4 MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1 Descrição dos modelos animais 29
4.2 Animais experimentais 29
4.3 Grupos Experimentais - Protocolo 1 – 28 dias 30
4.4 Grupos Experimentais – Protocolo 2 – 42 dias 30
4.5 Protocolos experimentais 31
4.5.1 Tratamento com leptina 31
4.5.2 Avaliação da ingestão de ração e do ganho de peso 31
4.5.3 Leptina plasmática 31
4.5.4 Avaliação da glicemia 32
4.5.5 Gaiola metabólica 32
4.5.6 Retirada de órgãos e perfusão renal 32
4.5.7 Parâmetros renais e plasmáticos 32
4.5.8 Análise do clearance de creatinina 33
4.5.9 Albumina urinária 33
4.5.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real 33
4.6 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real 34
4.6.1 Análise da expressão proteica por Western blotting. 34
4.6.2 Estudo morfológicos 36
4.6.3 Imunofluorescência 36
4.7 Análise estatística 38
5. RESULTADOS 39

5.1 Parâmetros metabólicos 39
5.1.1 Ingestão de ração e ganho de peso 39
5.1.2 Peso do rim 42
5.1.3 Ingestão de água e fluxo urinário 42
5.1.4 Glicemia e Frutosamina plasmática 43
5.2 Parâmetros Renais 44
5.2.1 Creatinina plasmática e clearance de creatinina 44
5.2.2 Ureia plasmática 46
5.2.3 Albumina urinária 46
5.2.4 Sódio e potássio 48
5.2.5 Área glomerular 48
5.2.6 Expressão de nefrina 50
5.3 Expressão de RNAm 51
5.3.1 Sistema renina angiotensina (SRA) no tecido renal 51
5.3.2 Fatores inflamatórios no tecido adiposo renal 53
5.3.3 Fatores inflamatórios no tecido renal 54
5.3.4 Fatores relacionados à fibrose no tecido renal 57
5.3.5 Proliferação celular em glomérulos 59
6 DISCUSSÃO 63
7 CONCLUSÕES 72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS 73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o sobrepeso e a obesidade são definidos como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura que representa um risco à saúde. Em humanos, a classificação por acúmulo de gordura é realizada através do parâmetro conhecido como índice de massa corporal (IMC), que relaciona o peso à altura (kg/m^2). Quando o IMC é igual ou superior a 25 o indivíduo é classificado com sobrepeso e valores maiores do que 30 indicam obesidade.

Nas últimas décadas as taxas de sobrepeso e obesidade em todo o mundo aumentaram de forma significativa. Entre 1975 e 2016, houve um aumento de dez vezes no sobrepeso e obesidade entre crianças e adolescentes e, entre indivíduos adultos, os casos quase triplicaram [1]. No Brasil, segundo dados do ministério da saúde, a obesidade aumentou 67,8% entre 2006 e 2018, saindo de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018 [2; 3]. Sendo a maior taxa de crescimento entre adultos de 25 a 34 anos (84,2%) e de 35 a 44 anos (81,1%) [3]. Em relação à obesidade infantil, o Ministério da Saúde e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que 12,9% das crianças brasileiras entre 5 e 9 anos de idade têm obesidade, assim como 7% dos adolescentes entre 12 e 17 anos [4].

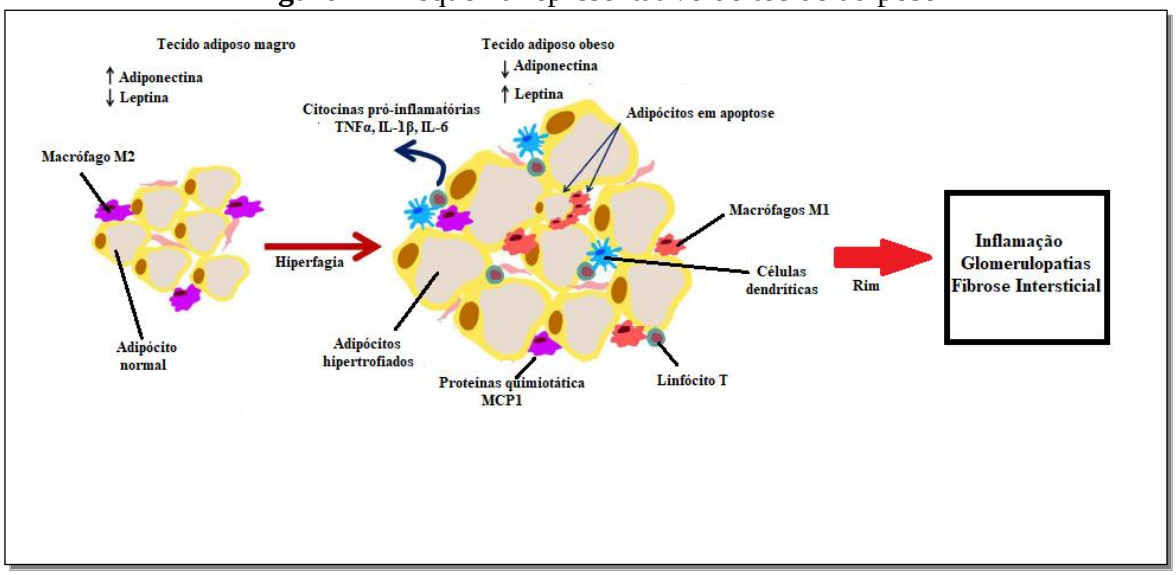
A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de comorbidades, pois pode estar associada a síndrome metabólica (SM), que representa um conjunto de fatores de risco associados a genética, dislipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes do tipo II, inflamação sistêmica e doenças renais [5; 6]. Portanto, o aumento mundial dos casos de obesidade contribuiu para 4 milhões de mortes anuais em decorrência desta condição [7]. Desta forma, a obesidade e comorbidades associadas são problemas importantes de saúde publica e o estudo destas condições é extremamente relevante.

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo e, em mamíferos, este tecido é classificado em branco e marrom, ambos envolvidos com o balanço energético. Neste contexto, o tecido adiposo branco é o principal reservatório energético uma vez que armazena triglicerídeos [8]. Além disso, este tecido é constituído de células precursoras dos adipócitos (denominados pré-adipócitos), macrófagos e leucócitos entre outras células[8]. Em condições fisiológicas, a adipogênese (diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos) é regulada por fatores como a adiponectina (peptídeo que regula a glicemia e o catabolismo de ácidos graxos) e o PPAR-γ (do inglês; *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) [9].

Na obesidade ocorre progressiva expansão do tecido adiposo seguida pela queda na expressão dos fatores reguladores da adipogênese (Adiponectina e PPAR-γ), o que resulta em diminuição do número de adipócitos novos e hipertrofia dos adipócitos maduros [9]. Nessa condição, os adipócitos hipertrofiados tornam-se fontes importantes de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNFα), interleucinas 1 e 6 (IL-1β, IL-6), resistina e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP1), conforme ilustrado no esquema da **figura 1** [10; 11].

Em humanos e modelos animais de obesidade, já foi descrito que a IL-6, produzida nos adipócitos viscerais, estimula a STAT3 (do inglês: *signal transducer and activator of transcription 3).* Esta, por sua vez, induz queda na síntese de IL-10, citocina anti-inflamatória responsável pela regulação da resposta inflamatória [12]. A STAT3 também está envolvida com o aumento da proliferação celular e progressão do estado inflamatório [12] via macrófagos do tipo M1 **(figura 1)** [13]. Desta forma, é bem conhecido que indivíduos obesos apresentam um quadro de inflamação generalizada [12].

Figura 1 – Esquema representativo do tecido adiposo



Esquema representativo do tecido adiposo mostrando a infiltração de células do sistema imune e o aumento da produção de citocinas inflamatórias como TNFα, IL-1β e IL-6 no tecido adiposo obeso comparado ao magro.
Fonte: Modificado de McArdle, M.A., *et al.* Front Endocrinol (Lausanne). 2013; 4: 52.

O tecido adiposo também é responsável pela produção de adipocinas, mediadores endócrinos, como a leptina e a adiponectina, que regulam a ingestão calórica, inflamação, entre outras funções. As adipocinas são secretadas principalmente pelos adipócitos e têm sua produção comprometida na obesidade, o que pode contribuir para o desenvolvimento de

comorbidades associadas a esta condição [11]. O desbalanço na produção de adipocinas pode também estar associado ao estabelecimento de patologias renais [11; 14].

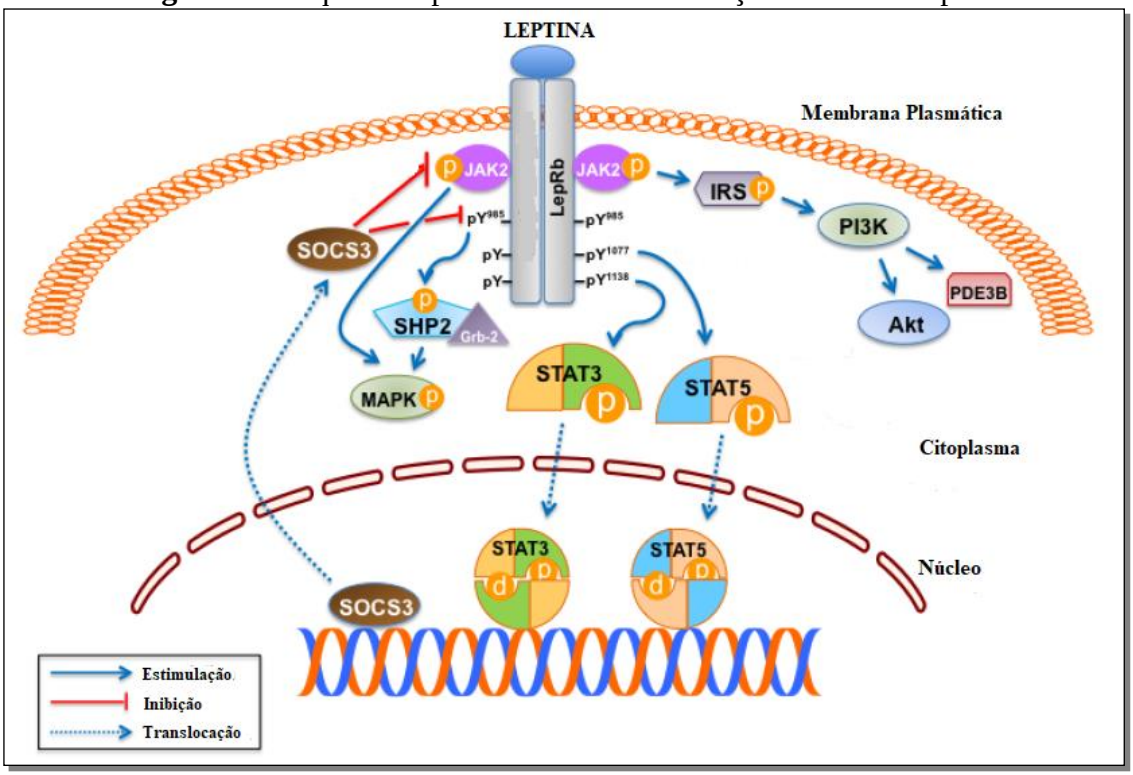
1.2 Leptina e seus receptores

A leptina (do grego *leptos*) é um peptídeo, produto do gene *ob*, com peso molecular de 16 kDa [15]. A leptina é produzida principalmente pelos adipócitos do tecido adiposo branco e atua diretamente no hipotálamo para regular negativamente a ingestão energética [10]. Por outro lado, há evidencias da síntese de leptina em outros tecidos incluindo placenta, músculo esquelético e coração [16].

Em humanos e em condições fisiológicas, a concentração de leptina no plasma é de aproximadamente 5,0 ng/mL e sua síntese é proporcional ao tamanho da massa do tecido adiposo presente no organismo [17]. A síntese e liberação de leptina podem ser controladas por fatores como a insulina, glicocorticoides e citocinas pró-inflamatórias [10].

A ação tecidual da leptina depende de sua interação com receptores de membrana específicos e classificados em seis isoformas (Ob-Ra até Ob-Rf) [18], os quais pertencem à classe I dos receptores de citocinas [19]. Os principais efeitos biológicos da leptina são mediados pela isoforma longa (Ob-Rb) encontrada principalmente no hipotálamo, na parede dos vasos e nos rins [20; 21]. A interação leptina/Ob-Rb resulta na ativação da proteína JAK2 (do inglês: *janus kinase 2*), que fosforila resíduos de tirosina do receptor Ob-Rb. Os resíduos de tirosina servem como sítios de ancoragem para diversos substratos, dentre eles as STATs (do inglês: *signal transducers and activators of transcription*), incluindo STAT3, STAT5 e STAT6 [22]. A STAT3 sofre dimerização e migra para o núcleo, onde funciona como fator de transcrição. Neste processo, o SOCS3 (do inglês: *suppressor of cytokine signaling 3*) desempenha um papel importante de feedback negativo da via JAK-STAT [23]. Além disso, a estimulação da via Ob-Rb/JAK2 ativa as vias IRS (do inglês: *insulin receptor substrate*)-PI3K (do inglês: *phosphatydylinositol-3 kinase)* e SHP-2 (do inglês: *SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2*) , que também participam da regulação da ingestão calórica e do metabolismo energético **(figura 2)** [24].

Figura 2 – Esquema representativo da sinalização celular da leptina



A ligação da leptina ao receptor de leptina LepRb resulta na fosforilação da Janus quinase 2 (JAK2). A JAK2 ativada fosforila os resíduos de tirosina Tyr985, Tyr1077 e Tyr1138, que, então, formam sítios de ancoragem para as STATs (STAT3 e STAT5). As STATs ativas formam dímeros que translocam ao núcleo e promovem a transcrição de seus genes-alvo, que medeiam o efeito anorexigênico da leptina. O supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), é um gene alvo da STAT3 e, quando ativo, inibe a via JAK2 / STAT3 (feedback negativo). Neste processo também são ativadas as vias da proteína contendo SH2 a tirosina fosfatase 2 (SHP2) e do substrato do receptor de insulina (IRS), também envolvidos no metabolismo energético.
Fonte: Modificado de Park, H.K., *et al.* F1000Prime Rep. 2014; 6: 73.

A resistência a leptina é bem descrita em pacientes obesos e é caracterizada pela perda da capacidade de controlar o apetite. Nessa condição, os receptores para leptina não respondem adequadamente principalmente devido a ativação da proteína SOCS3, que tem papel supressor da via de sinalização intracelular da leptina. Nesta condição, há um aumento na leptina circulante e, portanto, as concentrações do peptídeo no plasma tornam-se elevadas [23; 25].

Em vários modelos experimentais, a hiperleptinemia está associada ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS), hipertensão arterial [26; 27; 28; 29; 30], diminuição da síntese de óxido nítrico (NO) e da natriurese [31]. De forma interessante, estudos com camundongos C57BL/6J induzidos à obesidade por dieta, associaram a resistência seletiva à leptina ao aumento da resposta simpática renal, hipertensão arterial e atividade do sistema renina-angiotensina [32; 33; 34].

Porém, sabe-se que concentrações adequadas de leptina são importantes para manutenção do funcionamento normal do sistema imune, e a deficiência de leptina pode aumentar a susceptibilidade a inflamações e o risco de morte [35]. Sabendo que a obesidade e a

inflamação são fatores de risco para o desenvolvimento de patologias renais, é interessante avaliar um possível efeito renoprotetor da leptina em animais obesos que não produzem este hormônio.

1.3 Efeitos da leptina no rim

Os rins expressam a isoforma longa dos receptores de leptina Ob-Rb [20; 21] e também a isoforma curta Ob-Ra [36]. Porém, o local exato de ação do peptídeo nesse órgão ainda não foi totalmente esclarecido. A identificação de receptores Ob-Ra em glomérulos [37] e de receptores Ob-Rb na medula renal [38], sugere que tanto os glomérulos como os túbulos renais são sítios alvo para a ação da leptina.

Sabe-se que em indivíduos obesos (humanos ou camundongos *db/db),* a hiperleptinemia está envolvida na síntese e secreção do fator pró-fibrótico TGF-β1 (do inglês: *transforming growth fator beta 1*) e, consequentemente, com a injúria glomerular [39]. Em geral, a hiperleptinemia também induz aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6 [40], o que pode potencializar a injúria renal e proteinúria [19].

Em camundongos com obesidade genética *ob/ob*, o ganho de peso está associado à ausência de leptina [41]. Apesar de não produzirem leptina, os animais *ob/ob* expressam os receptores Ob-Rb em vários tecidos incluindo pâncreas, cérebro, coração e rim [42]. Nestes animais, a injúria renal não é bem definida, visto que alguns estudos descrevem alterações glomerulares discretas e outros descrevem lesões glomerulares severas e proteinúria [43; 44]. Assim, os camundongos *ob/ob* são bons modelos para investigar a contribuição da obesidade, independente da leptina, na injúria renal. Além disso, pode-se introduzir um tratamento com leptina para investigar a ação desse peptídeo na relação entre a obesidade e a injúria renal.

Sabe-se que a maior ativação do SRA no tecido adiposo de animais obesos impacta funções sistêmicas, contribuindo para o estabelecimento da hipertensão arterial observada na síndrome metabólica associada a obesidade [45]. Além disso, sabe-se que o bloqueio da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e dos receptores de angiotensina II também estão associados com a redução de proteinúria em pacientes obesos com glomerulopatia associada a obesidade [14; 46]. Interessantemente, um estudo de Mallamaci e colaboradores de 2011 demonstrou que pacientes obesos parecem ser mais sensíveis aos efeitos renoprotetores do ramipril, um inibidor da ECA, e tem uma redução da proteinúria significativamente maior do

que indivíduos magros [47]. Por isso é pertinente estudar em indivíduos obesos, a relação da ativação do SRA intra-renal e o desenvolvimento de lesões e injúrias no tecido renal.

1.4 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Desde a sua descoberta em 1898 por Tigerstedt e Bergman, o sistema renina-angiotensina- aldosterona (SRAA) é largamente estudado. Na cascata de sinalização sistêmica clássica, as células justaglomerulares secretam renina para a circulação, que cataliza a reação de clivagem do angiotensinogênio proveniente principalmente do fígado, em angiotensina I (Ang I). Esta, por sua vez, é clivada devido a ação da enzima conversora da Ang I (ECA), formando a angiotensina II (Ang II). A Ang II atua via dois receptores, AT1 e AT2, expressos em vários tecidos. O receptor AT1 desencadeia as respostas mais clássicas da Ang II como: vasoconstrição, liberação de aldosterona pela zona glomerulosa da glândula adrenal, reabsorção de sódio por diversos segmentos do néfron e estimulação do sistema nervoso simpático (via receptores cerebrais) e indução de estresse oxidativo [48].

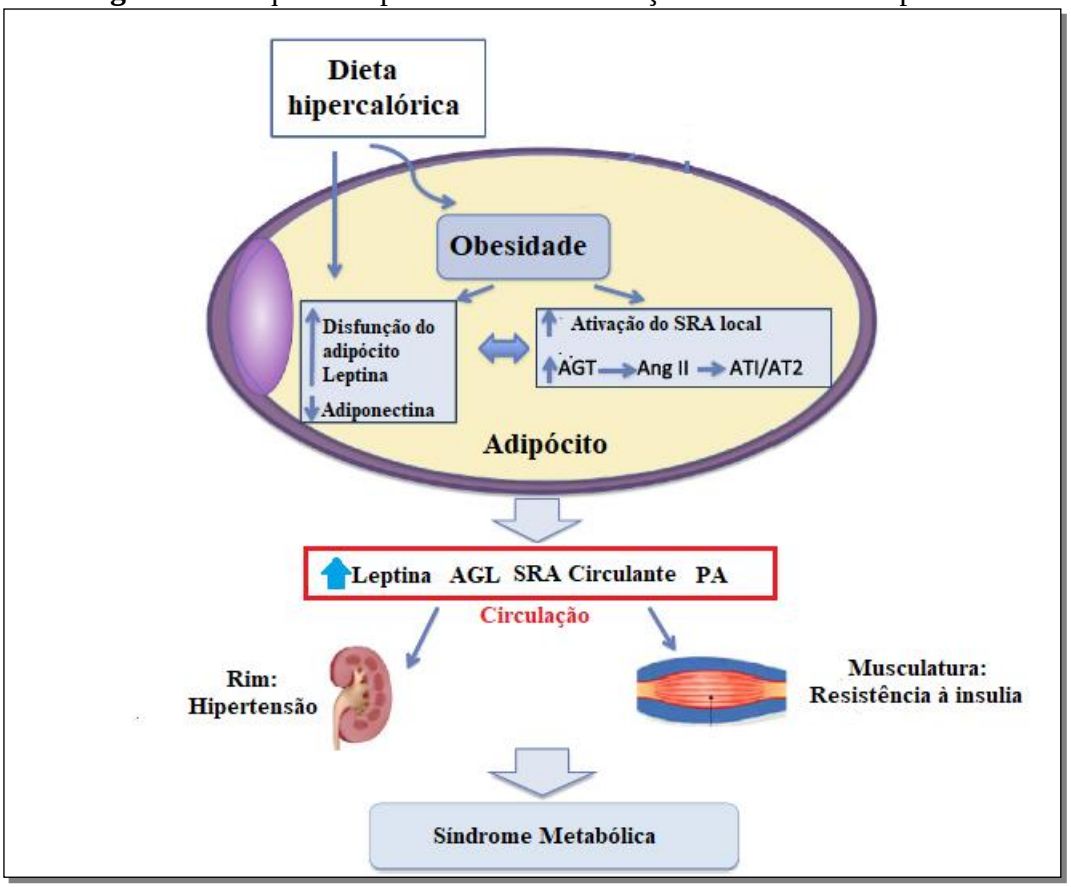
Muitos estudos demonstram a presença e a importância de SRA locais, em diversos tecidos como coração, tecido adiposo, glândulas adrenais, vasculatura, sistema nervoso central e rins. A ativação do SRA intra-renal sustenta a hipertensão arterial e a progressão de doenças renais crônicas [49].

1.5 SRA Intra-renal

Diversos estudos demonstraram que assim como as células mesangiais e tubulares [50], os podócitos também expressam os receptores AT1 e AT2 e os componentes do SRA. Liebau e colaboradores, em 2006, demonstraram que os podócitos humanos em cultura expressam RNAm para angiotensinogênio, renina e ECA [51].

Na síndrome metabólica (SM), a obesidade e a hiperinsulinemia estão associadas à hipertensão arterial. Nessa condição, a ativação do SRA intra-renal e a maior produção de Ang II desempenha papel importante na progressão da injúria de vários órgãos. A maior ativação do SRA no tecido adiposo de animais obesos, contribui para o estabelecimento da hipertensão observada na SM e contribui para a ativação do SRA intra-renal [45]. Outros estudos demonstram que o bloqueio da enzima de conversão da angiotensina 1 (ECA) ou do receptor AT1 previne a progressão da hipertensão arterial, doenças renais e cardiovasculares associadas ao diabetes **(figura 3)** [52].

Figura 3 – Esquema representativo da ativação do SRA nos adipócitos



A obesidade leva a disfunção dos adipócitos, ativação do SRA local, aumento de ácidos graxos (AGL) livres e da produção de leptina. Os componentes do SRA dos adipócitos atuam localmente e são liberadas na corrente sanguínea junto com a leptina. Como conseqüência, há aumento do SRA, AGL e leptina circulante. O aumento destes fatores, por sua vez, pode levar a síndrome metabólica.
Fonte: Modificado de Frigolet, M.E., *et al.* J Physiol Anthropol. 2017 Jun 14;36(1):25.

Além disso, o bloqueio dos receptores do tipo I para angiotensina, da ECA e o tratamento com antagonistas da aldosterona, preservam a integridade da barreira de ultrafiltração glomerular, assim como a expressão de nefrina e podocina em diversas doenças como: nefropatia por lesão mínima [53; 54], diabetes [53; 54; 55] e glomerulopatia associada a obesidade[56]. Desta forma, sabendo que a integridade da barreira de ultrafiltração glomerular é de extrema importância para a manutenção da função renal e que a nefrina é um dos principais componentes desta estrutura, é pertinente investigar a expressão de nefrina em modelos de obesidade e glomerulopatia associada a obesidade.

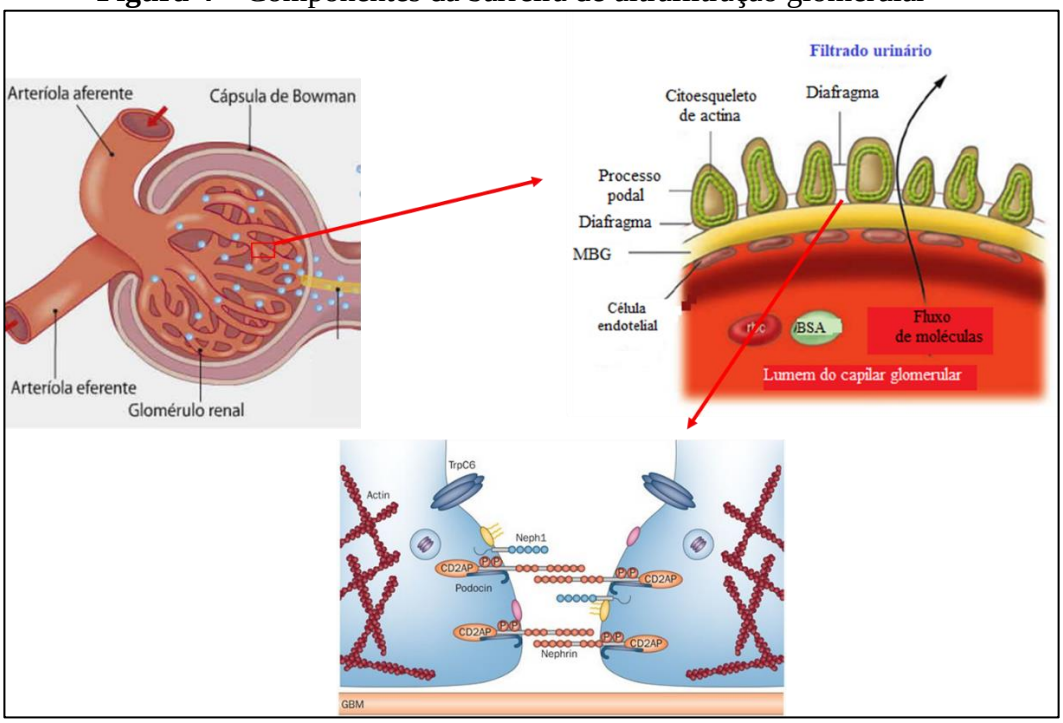
1.6 Nefrina

A nefrina pertence a superfamília das imunoglobulinas de adesão celular e consiste em uma porção extracelular, composta de 8 domínios semelhantes a imunoglobulinas, um domínio semelhante à fibronectina tipo III e uma porção citosólica composta de uma cauda C-terminal [57]. Além de um importante papel estrutural, a nefrina também participa de processos de sinalização celular [58]. Para entender a importância da nefrina na manutenção da função renal, é necessário compreender a estrutura da barreira de filtração glomerular.

Nos glomérulos está presente uma estrutura denominada barreira de filtração glomerular, que possui papel central na seletividade da filtração do plasma. É esta estrutura que permite a filtração de solutos e água e a retenção de compostos importantes como macromoléculas e proteínas. A perda de seletividade da barreira de filtração glomerular, pode levar a perda de proteína na urina, o que caracteriza um quadro de proteinúria [59].

A barreira de filtração glomerular é composta de três camadas: pelo endotélio fenestrado dos capilares glomerulares, processos podais de podócitos e pela membrana basal glomerular (MBG). Localizada entre os podócitos e o endotélio, a MBG é composta de diversas proteínas produzidas por estes dois tipos celulares[59]. Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que possuem prolongamentos denominados processos podais, que envolvem o endotélio fenestrado dos capilares glomerulares. Processos podais de podócitos vizinhos se interdigitam e formam uma estrutura denominada diafragma, que é a mais complexa da barreira de ultrafiltração glomerular [60]. O diafragma desempenha um papel fundamental na seletividade da barreira de filtração glomerular [61]. Além disso, proteínas específicas do diafragma interagem com a actina do citoesqueleto e com proteínas dos processos podais vizinhos, mantendo a estrutura da barreira de filtração glomerular e participando de vias de sinalização. As proteínas expressas no diafragma incluem: nefrina, podocina, Neph 1 e 2, entre outras [62] **(figura4).**

Figura 4 – Componentes da barreira de ultrafiltração glomerular



Esquema representativo do glomérulo, aonde se encontra o tufo de capilares glomerulares. As células endoteliais destes capilares compõem a membrana de ultrafiltração glomerular, estrutura responsável pela filtração do plasma nos rins. A membrana de ultrafiltração glomerular é composta também pela membrana basal glomerular, processos podais de podócitos e o diafragma. O diafragma é uma estrutura de extrema importância para o processo de filtração e se forma entre processo podais vizinhos. A nefrina desempenha um papel central na manutenção da integridade desta estrutura. A nefrina é uma proteína da família das imunoglobulinas de adesão celular, é composta por uma porção intracelular e uma extracelular que se comunica com o processo podal vizinho. Ao sofrer uma injúria renal, a nefrina pode internalizar-se, desta forma, perde-se a conexão entre os processos podais vizinhos, o que prejudica a barreira de ultrafiltração e pode levar a um processo de proteinúria. **Fonte**: Modificado de Ming-Fo Hsu, et al. Scietific Reports. 2016.

Dentre as proteínas presentes no diafragma, uma das mais importantes para a manutenção da barreira de filtração glomerular é a nefrina. A nefrina pode sofrer fosforilação, e juntamente com as proteínas associadas CD2AP e podocina, induzir vias de sinalização envolvidas na injúria de podócitos [63]. A nefrina fosforilada pode ser internalizada por interagir com a β-arrestina e contribuir para o comprometimento da estrutura do diafragma, consequentemente, levando a proteinúria [64]. Em um modelo animal de obesidade e de glomerulopatia associada a obesidade, a expressão de moléculas associadas a podócitos como podocina, podoplanina e nefrina está reduzida em relação a animais magros, e o tratamento com um antagonista da aldosterona normalizou a expressão destas moléculas [56]. Desta forma, é relevante estudar a relação do sistema renina angiotensina aldosterona nas injúrias renais associadas a obesidade.

1.7 Glomerulopatia associada a obesidade

Já é bem estabelecido na literatura que a obesidade aumenta o risco de progressão de doenças renais preexistentes, assim como é um fator de risco para o desenvolvimento de comorbidades associadas, mas, a obesidade é também um fator de risco independente para lesão renal [65]. A glomerulopatia associada a obesidade (GRO) é a doença renal mais conhecida secundária a obesidade [66].

A GRO é caracterizada, principalmente, por aumento da massa renal, redução no número de néfrons, alterações hemodinâmicas, expansão mesangial, ativação do SRA intrarenal e hipertrofia glomerular [66]. O aumento do tamanho glomerular está presente em indivíduos obesos independente de alterações na função renal e não se sabe ao certo as causas desta hipertrofia. Embora, suponha-se que seja uma resposta mal adaptada a alta demanda metabólica da obesidade [14].

Os critérios de diagnóstico da GRO são: IMC maior ou igual a 30 kg/m2, exclusão de outros doenças, tanto clínica quanto histologicamente, glomerulomegalia associada ou não a GESF e proteinúria associada ou não ao comprometimento da função renal [66]. A glomerulopatia associada a obesidade tem progressão lenta, porém a longo prazo pode levar a doença renal em estágio terminal [67; 68]. De fato, a idade é um fator de risco para a evolução da GRO já que com o passar do tempo há uma perda natural de néfrons que pode contribuir para o agravamento desta condição [69; 70].

Outro fator de risco para o desenvolvimento de GRO é a hiperleptinemia comumente presente na obesidade. Neste contexto, a leptina promove a reabsorção de sal pelos túbulos renais, aumenta a expressão de TGF-β e a produção de colágeno tipo IV, levando ao acúmulo de matriz extracelular que resulta em fibrose renal e glomeruloesclerose, o que contribui para a glomerulomegalia observada [71; 72]. Porém, pouco se sabe sobre a ação fisiológica da leptina na GRO. Por este motivo torna-se relevante estudar a ação da leptina em um modelo animal obeso que não produz leptina.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A obesidade está associada a síndrome metabólica, que é caracterizada pelo desenvolvimento de uma série de fatores de risco metabólico como: hipertensão arterial, dislipidemia, *diabetes mellitus* do tipo 1 e hiperleptinemia. Nesta condição, não é possível identificar separadamente os efeitos da obesidade ou da leptina na progressão de doenças renais. Além disso, sabe-se que a glomerulopatia associada a obesidade é uma doença cujo principal fator de risco de desenvolvimento é a própria obesidade. Portanto, um modelo animal obeso não associado a comorbidades permite o estudo da obesidade no desenvolvimento de injúrias renais e comprometimento na função deste órgão.

Em um modelo animal obeso e desprovido de leptina (*ob/ob*), a inclusão da terapia com leptina em dose fisiológica pode atenuar os efeitos deletérios decorrentes da obesidade na função renal, visto que, esse peptídeo atenua o ganho de peso e melhora a resposta imune. Nesta situação, podemos avaliar nos animais *ob/ob* se há comprometimento da função renal e comprometimento glomerular semelhante a GRO e podemos investigar se o tratamento com leptina tem papel renoprotetor importante.

3 OBJETIVOS

O **objetivo geral** da atual proposta foi investigar as características da injúria renal associadas à obesidade, mais especificamente nos glomérulos e na barreira de ultrafiltração glomerular. Neste contexto, foram investigados os efeitos da leptina em doses fisiológicas em animais obesos que não produziam leptina.

3.1 Objetivos Específicos

1. Investigar a contribuição da obesidade na injúria renal;
2. Investigar o papel do tratamento com leptina no desenvolvimento de injúrias renais em um modelo de animais obesos que não produzem leptina;
3. Avaliar a expressão de componentes do sistema RAS no tecido renal de animais obesos e obesos tratados com leptina;
4. Avaliar se a obesidade contribui para a proliferação celular em glomérulos e se isso está relacionado a expansão mesangial. Avaliar o papel da leptina neste contexto

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição dos modelos animais

Utilizando modelos animais, Coleman DL [41] demonstrou que a obesidade em camundongos *ob*/*ob* estava associada à ausência de leptina. Apesar de não produzirem leptina, os animais *ob/ob* expressam os receptores Ob-Rb em vários tecidos incluindo pâncreas, cérebro, coração e rim [42]. Portanto, consideramos que esse modelo animal é importante para investigar a contribuição da obesidade na injúria renal, independente da ação da leptina. Por outro lado, a inclusão da leptina nesse modelo animal, nos permitirá investigar a resposta renoprotetora deste peptídeo.

4.2 Animais experimentais

Foram utilizados 44 camundongos, sendo 16 C57BL/6J - adquiridos no biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e 28 *ob/ob* – adquiridos por doação do Prof. José Donato Jr. do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Todos os animais foram mantidos sob condição de controle da temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação, no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP. Os protocolos apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA), número 13/2017.

4.3 Grupos Experimentais - Protocolo 1 – 28 dias

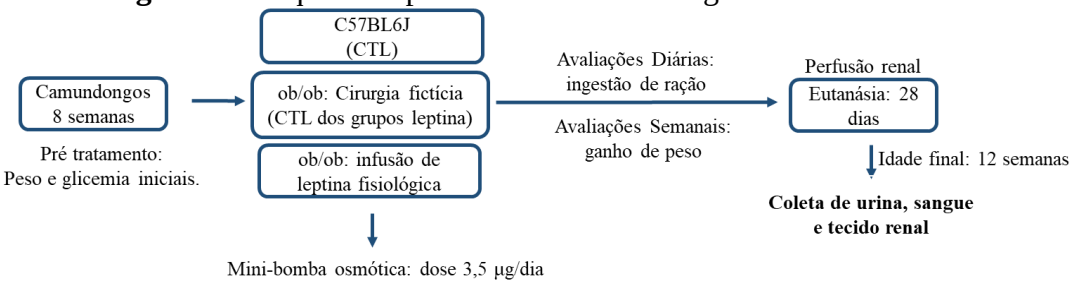
Neste protocolo os animais com idade de 8 semanas foram distribuídos randomicamente em três grupos: 10 animais controle, 5 animais *ob/ob* e 5 animais *ob/ob* tratados com leptina, conforme esquema abaixo:

1-Controle: Camundongos C57BL/6J;

2- Camundongos *ob/ob* (Sham);

3-Camundongos *ob/ob* tratados com leptina 3,5 µg/dia/28 dias [73; 74].

Figura 5 – Esquema representativo camundongos *ob/ob* 28 dias



Esquema representativo do modelo experimental com camundongos ob/ob controle ou tratados com leptina na dose fisiológica por 28 dias.
Fonte: Elaboração própria.

4.4 Grupos Experimentais – Protocolo 2 – 42 dias

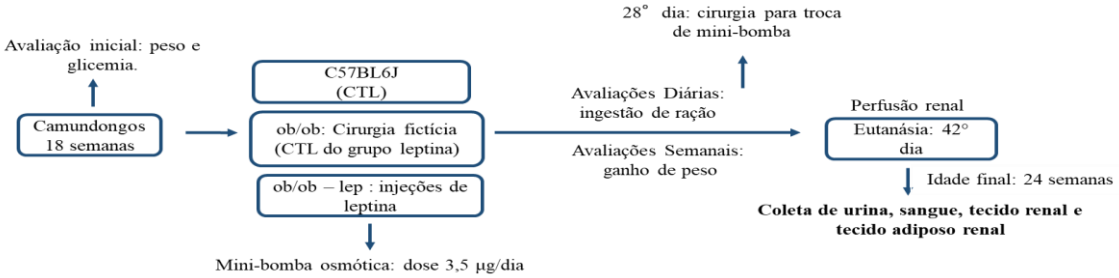
Neste protocolo os animais com idade de 18 semanas foram distribuídos randomicamente em 3 grupos: 6 animais controle, 9 animais *ob/ob* e 9 animais *ob/ob* tratados com leptina, conforme esquema abaixo:

1-Controle: Camundongos C57BL/6J;

2- Camundongos *ob/ob* (Sham);

3- Camundongos *ob/ob* tratados com leptina 3,5 µg/dia/42 dias [73; 74].

Figura 6 – Esquema representativo camundongos *ob/ob* 42 dias



Esquema representativo do modelo experimental com camundongos ob/ob controle ou tratados com leptina na dose fisiológica por 42 dias.
Fonte: Elaboração própria.

4.5 Protocolos experimentais

4.5.1 Tratamento com leptina

Os animais, com idade de 8 ou 18 semanas foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (Virbac, Carros, França) nas doses de 20 e 100 mg/kg de peso corporal, respectivamente, por via intraperitoneal. Após a perda completa dos reflexos de dor, uma pequena incisão subcutânea foi feita no dorso dos animais e uma mini-bomba osmótica de 4 semanas (modelo 1004, Alzet, Cupertino, EUA) foi implantada. Esta mini-bomba foi preenchida com 240 µl de solução contendo leptina, liberada na dose de 3,5µg/dia (dose fisiológica) por 28 dias. Para o tratamento de 42 dias, também foi utilizada a mini-bomba osmótica modelo 1004 da Alzet, porém, no 28° dia foi realizada uma nova cirurgia para a inserção de uma nova mini-bomba modelo 1002 da Alzet (2 semanas).

Todos os animais submetidos ao processo cirúrgico com o implante de bombas osmóticas foram comparados ao seu grupo controle correspondente submetido à cirurgia fictícia (animais do grupo Sham). Neste grupo, foi realizada a incisão no dorso dos animais, foi aberto o mesmo espaço subcutâneo para a inserção de bomba osmótica, no entanto a mesma não foi implantada. É importante ressaltar que a recuperação pós-cirúrgica foi monitorada para evitar manifestações de dor e assegurar o bem-estar dos animais.

4.5.2 Avaliação da ingestão de ração e do ganho de peso

Após a inserção das mini-bombas osmóticas ou cirurgias fictícias, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e a ingestão de ração (g/dia) foi monitorada.

O animal também teve o seu peso corporal monitorado semanalmente. O ganho de peso foi calculado pela fórmula:

Ganho de peso = peso final – peso inicial ***(1)***

O peso foi expresso em gramas.

4.5.3 Leptina plasmática

As medidas de leptina plasmática foram feitas com o kit Leptin (Mouse/Rat) ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, INC., EUA), segundo instruções do fabricante.

4.5.4 Avaliação da glicemia

Antes das medidas de glicemia os animais foram mantidos em jejum de 4 horas. Nos grupos controles ou tratados, a glicemia foi monitorada semanalmente por meio do aparelho *Accu-Chek* (Rocher Diagnostics).

4.5.5 Gaiola metabólica

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas 24 horas antes do final do período experimental. Na gaiola metabólica foi avaliada a ingestão de água, ração e também foi coletada a urina de 24 horas.

4.5.6 Retirada de órgãos e perfusão renal

Para a retirada de órgãos e perfusão renal os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (Virbac, Carros, França) nas doses de 20 e 100 mg/kg de peso corporal, respectivamente, por via intraperitoneal. Após a perda completa dos reflexos de dor, os rins foram removidos para os estudos morfológicos, de RT-PCR e Western Blot. Para isso, a artéria e veia renais do rim direito foram amarradas com fio de algodão e, em seguida, o rim foi removido, fatiado e as amostras congeladas a -80ºC para análises posteriores de RT-PCR e Western Blot.

O rim esquerdo foi submetido à perfusão com solução de PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M, pH 7.4), por 10 minutos (velocidade de perfusão: 10 mL/min). Em seguida, o rim foi removido, seccionado transversalmente e transferido para uma solução de formalina tamponada a 4% e mantido por 24 horas. Após esse período, foi incubado em álcool 70% e encaminhado para o Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da USP para impregnação com parafina e preparação de cortes histológicos com espessura de 3-4 µm por microtomia.

4.5.7 Parâmetros renais e plasmáticos

Os níveis de Na^+ e K^+ na urina e no plasma foram avaliados pelo fotômetro de chama (B462, Micronal, São Paulo, Brasil). A creatinina e ureia plasmática foram avaliadas utilizando-se kits Labtest conforme instruções do fabricante.

4.5.8 Análise do clearance de creatinina

As concentrações de creatinina no plasma e na urina foram avaliadas pelo Kit (Labtest) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada por método colorimétrico usando um espectofotômetro. Em seguida, o clearance de creatinina (Ccr) foi calculado pela fórmula:

$$Ccr = (Ucr \times V)/Pcr \quad \textbf{(2)}$$

Em que Ccr corresponde a concentração de creatinina na urina Ucr corresponde a creatinina na urina, V, fluxo urinário e Pcr, creatinina no plasma.

4.5.9 Albumina urinária

A albumina urinária foi avaliada pelo kit ProteoSilver stain kit (Sigma-Aldrich) segundo instruções do fabricante. Para normalizar as amostras de urina pela concentração urinária de creatinina, foram feitos cálculos para que fosse pipetado no gel de eletroforese 4µg de creatinina por amostra. Então, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, o qual foi submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e pH 7.3). A corrida das amostras no gel foi efetuada a 90 Volts e interrompida quando a linha do corante de azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel. A análise de intensidade das bandas foi realizada com o software imageJ (National Institutes of Health).

4.5.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Extração do RNA total

As amostras de tecido renal total foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 1 ml de TRIzol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Em seguida, o homogenato foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. O RNA total foi extraído em mini-colunas do kit RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Neste processo, as amostras foram purificadas por uma coluna que retém DNA genômico, assegurando maior pureza do RNA extraído.

Síntese do cDNA a partir do RNAm

Para a síntese de cDNA a partir do RNAm (RT-PCR) extraído foi utilizado o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 2000 ng de RNA.

4.6 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real

O cDNA (20 ng) obtido no RT-PCR foi utilizado na análise de expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Na seleção das sondas, foram adquiridas aquelas que amplificam junções exônicas, a fim de reduzir ainda mais o impacto de contaminação por DNA genômico. Sendo assim, foram sempre escolhidas as sondas "*Best Coverage*". As sondas utilizadas são:

- *Angiotensinogênio (Agt):* Mm00599662_m1;
- *Renina (Ren1):* Mm02342887_m1;
- *IL-6 (Il6):* Mm 00446190_m1;
- *TNFα (Tnf):* Mm 00443258_m1:
- *MCP-1 (Ccl2):* Mm00441242_m1;
- *α-SMA (Acta2)*: Mm00725412_s1;
- *Colágeno I (Col1a1):* Mm00801666_g1
- *Colágeno III (Col3a1):* Mm 01254476_m1;

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados pelo *software* StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems), seguidos pela análise estatística no *software* GraphPad Prism (San Diego, EUA).

A semelhança das eficiências de amplificação das sondas (próximo a 100%) permite a utilização do modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$ para o cálculo das diferenças de expressão entre os genes alvo e endógeno. Assim, os resultados foram apresentados na forma de *fold change*, ou seja, aumento ou diminuição da expressão em relação ao grupo controle ou Sham.

4.6.1 Análise da expressão proteica por Western blotting.

Preparação das amostras e eletroforese

O tecido renal foi macerado em 300 µl de PBS 1X [solução Fosfato de Sódio (5 mM, pH 8.0)] mais cocktail de inibidores de proteases (Sigma Aldrich) e o sobrenadante de cada amostra foi armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína das amostras foi avaliada pelo método de Bradford, então foi adicionado a cada amostra a quantidade necessária (conforme quantificação de proteínas) de tampão de amostra para eletroforese [Laemmli Sample Buffer mais DTT (Ditiotreitol) 5%] e incubado a 90°C por 7 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas, juntamente com um padrão de massa molecular específico (Cell Signal), no gel de poliacrilamida (10 % a 15%, com espessura de 1.5 mm), o qual foi submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e pH 7.3). A corrida das amostras no gel foi efetuada a 100 Volts e interrompida quando a linha do corante azul atingiu a extremidade inferior do gel.

Transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose

Após a eletroforese, os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). A membrana foi previamente tratada com tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), por cerca de 20 minutos. Para a transferência, foi utilizado um sistema tipo sanduíche, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 60 Volts, de 1 hora a 1 hora e 30 minutos. Após esse período, a membrana foi transferida para uma solução de bloqueio (NaCl 150 mM, Fosfato de Sódio Monobásico (2.8 mM), Fosfato de Sódio Dibásico (7.2 mM), leite em pó desnatado (5%), Tween 20 (0.1 %), da Sigma) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário específico, previamente diluído em solução de bloqueio (1:1000 v/v), por 12 horas a 4°C, com leve agitação. Para remover o excesso do anticorpo foram realizadas 5 lavagens com solução de bloqueio (cada uma por 5 minutos). Em seguida, a membrana foi incubada por mais 1 hora com anticorpo secundário conjugado, em solução de bloqueio (1:2000 v/v) e novamente lavada como acima descrito. Após essas etapas, a membrana foi exposta ao reagente para imunodetecção através de luminescência ECL (Amersham), por 1 minuto. Subsequentemente, as membranas foram fotografadas no fotodocumentador Amersham Imager 600 (G&E). As bandas foram quantificadas no software Image J (National Institutes of Health). Para os cálculos as amostras foram corrigidas pelo controle e pela proteína controle (α actina).

A proteína investigada foi αSMA.

4.6.2 Estudo morfológicos

Os cortes renais longitudinais de 3-4 µm foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina [75] para análise da morfologia renal. As áreas glomerulares foram avaliadas por morfometria, através de um microscópio de luz acoplado a uma câmera de vídeo e a um analisador de imagens (Eclipse 80*i*, Nikon, Toquio, Japão). Todos os glomérulos de cada animal foram circulados manualmente e o *software* NIS-Elements (Nikon) forneceu os respectivos valores das áreas glomerulares.

4.6.3 Imunofluorescência

Para as imunofluorescências foram utilizados cortes de tecido renal parafinizados em lâminas histológicas.

Desparafinização:

Para desparafinizar os tecidos as lâminas foram colocadas por 3 minutos em Xilol, em seguida 3 minutos em um novo recipiente com Xilol, em seguida 3 minutos em Xilol + Etanol 100%, 3 minutos em Etanol 100%, 3 minutos em Etanol 95%, 5 minutos em Etanol 70% e por fim 5 minutos em Etanol 50%.

Recuperação antigênica:

A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato de sódio 10 mM, 0,05% Tween , 20, pH 6.0. Um litro da solução de citrato foi aquecida a 95°C (verificado com termômetro) no microndas por 7 minutos. As lâminas foram colocadas no tampão aquecido por 20 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com água da torneira. Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS + triton 0,025% por imersão e leve agitação no shake orbital.

Bloqueio:

Os cortes foram incubados cm PBS1% + triton 1% antes do bloqueio, em seguida foi feito o bloqueio com TBS + BSA 5% por 2 horas.

Anticorpos:

A solução de bloqueio foi removida e o anticorpo primário diluído em BSA 1%+TBS foi adicionado. A incubação no anticorpo primário foi feita a 4°C overnight. No dia seguinte, as lâminas foram tiradas da geladeira e mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos com TBS-T (triton 0,025%) com agitação no shaker orbital. Em seguida foi adicionado o anticorpo secundário diluído em TBS+BSA 1% (1:100) e a incubação ocorreu por 1 hora. Foram feitas três lavagens por 5 minutos com TBS com agitação no shaker orbital. Foi adicionado DAPI diluído (0,5µl em 10 mL de TBS 1x) em cada cort, foi feita a incubação por cinco minutos em temperatura ambiente. Foram feitas duas lavagens de 3 minutos com TBS com agitação no shaker orbital. Por fim, foi retirado o excesso de PBS, as lâminas foram montadas com Fluoromount e colocadas para secar na incubadora seca, com dissecante overnight e armazenadas na geladeira no dia seguinte.

As proteínas analisadas foram nefrina (1:200), WT1 (1:200) e DAPI. A quantificação de WT1 e DAPI foi feita pela contagem de núcleos marcados. A quantificação de nefrina foi feita pelo software Image J (National Institutes of Health).

Quantificação de Nefrina:

Ao abrir as imagens no image J, inicialmente foi feito um aumento de contraste e a imagem foi transformada em preto e branco. Em seguida, com a ferramento ROI foram feitas

medidas da área glomerular total e área glomerular sem marcação com nefrina. Por fim foram feitos cálculos da área glomerular marcada com nefrina (área total – área sem marcação) e então foi feita a relação da área marcada com nefrina pela área glomerular total.

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via, completamente randomizada, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni, realizados a partir do programa GraphPad Prism Software. Valores de $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram apresentados como um valor médio ± erro padrão.

5. RESULTADOS

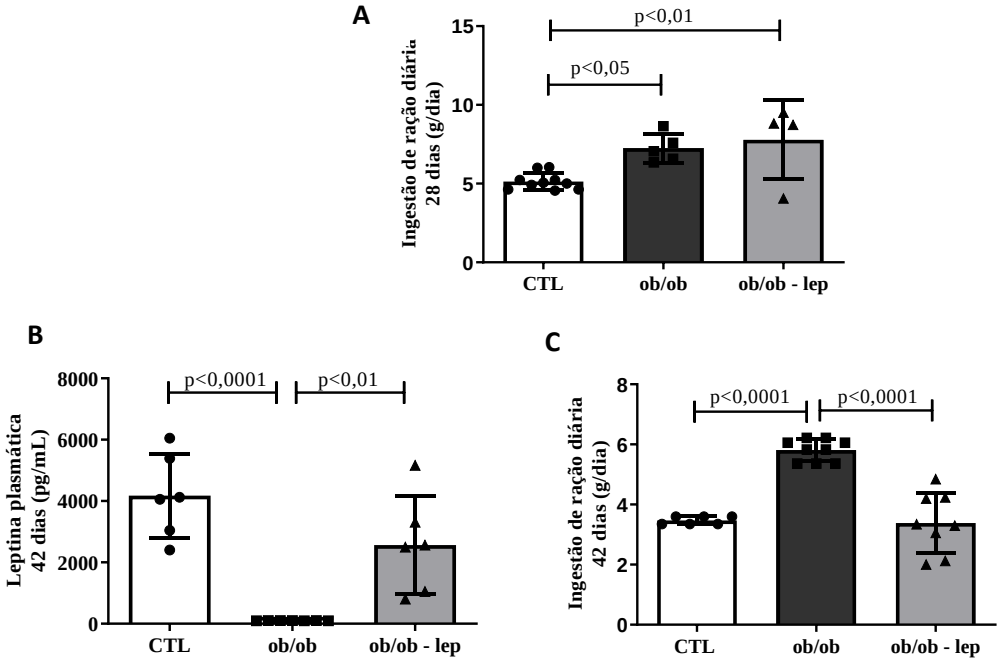
Com o objetivo de facilitar a comparação entre os grupos, os resultados dos animais tratados com leptina por 28 e 42 dias serão apresentados de forma simultânea.

5.1 Parâmetros metabólicos

5.1.1 Ingestão de ração e ganho de peso

Para monitorar a ingestão diária de ração os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período de tratamento com leptina e a ração foi pesada diariamente. No grupo de 28 dias, os animais *ob/ob* apresentaram aumento significativo da ingestão de ração em comparação aos animais controle e o tratamento com leptina não corrigiu este parâmetro **(figura 7 A e tabela 1)**. Não foram feitas medidas plasmáticas de leptina no grupo de 28 dias, pois não havia plasma suficiente deste grupo. No grupo de 42 dias, além das medidas de ingestão de ração, a leptina plasmática também foi quantificada. O tratamento com leptina aumentou os níveis deste hormônio no plasma de animais obesos para valores próximos ao controle magro. Nos animais obesos não observamos níveis significativos de leptina plasmática, como esperado **(figura 7 B e tabela 2)**. No protocolo de 42 dias, a ingestão de ração dos animais *ob/ob* também foi aumentada em comparação aos animais controle e a leptina corrigiu esse parâmetro **(figura 7 B e tabela 1)**.

Figura 7 – Ingestão de ração diária e níveis plasmáticos de leptina nos grupos



Ingestão de ração diária (g/dia) nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 dias (A) e 42 dias (C). Leptina plasmática (pg/mL) nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias (B). Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-10).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 1 – Ingestão diária de ração em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Ingestão de ração (g/dia)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	5,13 ± 0,17 (10)	7,24 ± 0,41 (5)*	7,77 ± 1,25 (4)$^{\#\#}$
42 dias	3,47 ± 0,05 (6)	5,81 ± 0,12 (9)****	3,38 ± 0,36 (9)$^{++++}$

ob/ob versus controle*p<0,05, *ob/ob*-lep *versus* controle$^{\#\#}$p<0,01, *ob/ob versus* controle ****p<0,0001, *ob/ob*-lep *versus ob/ob*$^{++++}$p<0,0001. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

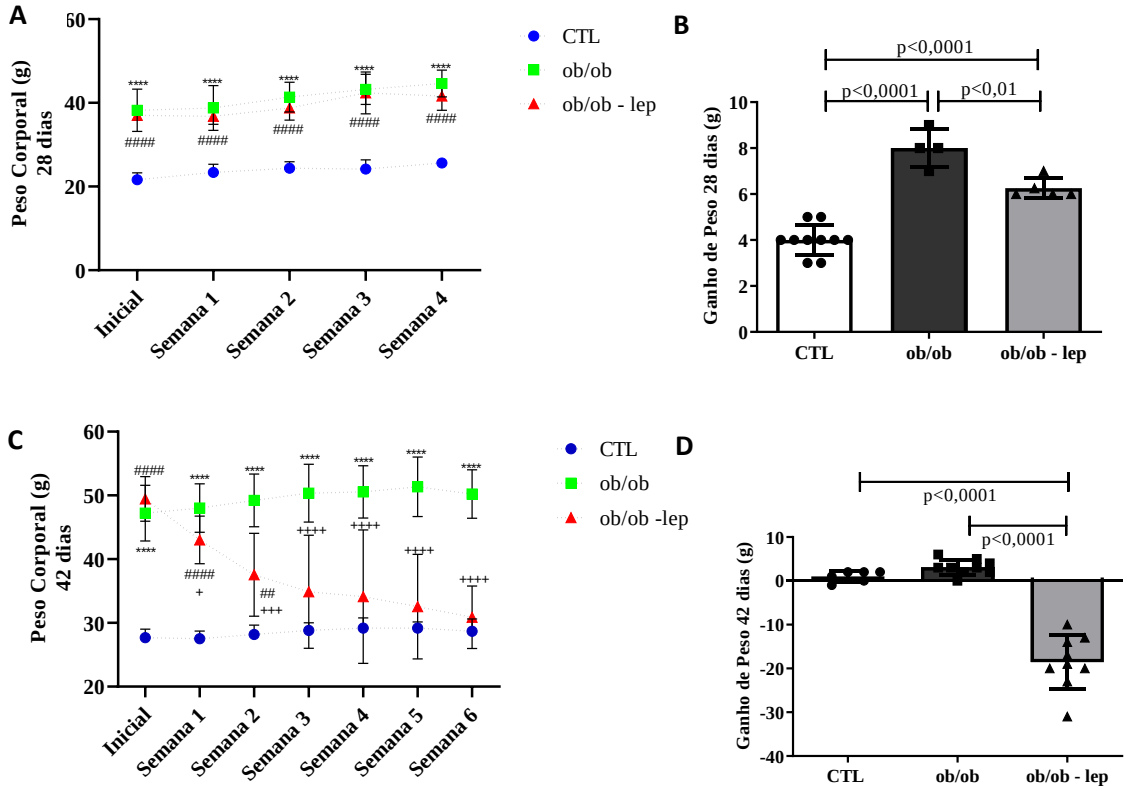
Tabela 2 – Leptina plasmática (pg/mL) nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias

Leptina plasmática (pg/mL)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
42 dias	4178 ± 560,5 (6)	100,4 ± 1021 (7)****	2564 ± 650,6 (6)$^{++}$

ob/ob versus controle****p<0,0001, *ob/ob*- lep *versus ob/ob* $^{++}$p<0,01. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

O ganho de peso dos animais foi monitorado semanalmente. No grupo de 28 dias os animais *ob/ob* ganharam peso ao longo das semanas e apresentaram peso maior do que o controle durante todo o protocolo experimental. Apesar dos animais obesos tratados com leptina apresentarem ganho de peso menor do que os animais *ob/ob*, ainda assim, ganharam peso significativo em relação ao grupo controle e apresentaram peso aumentado em relação ao controle ao longo das semanas **(figura 8 A e B e tabela 3)**. No grupo de 42 dias, os animais *ob/ob* apresentaram peso aumentado ao longo das semanas, porém não se observou aumento significativo no ganho de peso em comparação aos animais controle **(figura 8 C e D e tabela 3)**. No grupo experimental de 42 dias, os animais obesos tratados com leptina apresentaram perda progressiva de peso quando comparados aos animais *ob/ob*, sendo que ao final do período experimental apresentaram peso corporal próximo ao grupo controle **(figura 8 C e D e tabela 3)**.

Figura 8 – Peso corporal semanal e ganho de peso



Peso corporal semanal e ganho de peso nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 dias (A) e (B) ob/ob versus controle ****p<0,0001, *ob/ob*- lep *versus controle* $^{\#\#\#\#}$p<0,0001 e 42 dias (C) e (D) ob/ob versus controle ****p<0,0001, *ob/ob*- lep *versus controle* $^{\#\#\#\#}$p<0,0001, *ob/ob*- lep *versus controle* $^{\#\#}$p<0,01, *ob/ob*- lep *versus ob/ob* $^{+}$p<0,05, *ob/ob*- lep *versus ob/ob* $^{+++}$p<0,001, *ob/ob*- lep *versus ob/ob* $^{++++}$p<0,0001. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-10)
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 – Ganho de peso em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Ganho de peso (g)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	4 ± 0,21 (10)	8 ± 0,41 (4)****	6,25± 0,19 (5)$^{\#\#\#\#++}$
42 dias	1 ± 0,52 (6)	3,11 ± 0,59 (9)	-18,56 ± 2,06 (9)$^{\#\#\#\#++++}$

ob/ob versus controle****p<0,001, *ob/ob – lep versus ob/ob* $^{++}$p<0,01, *ob/ob – lep versus* controle $^{\#\#\#\#}$p<0,001, *ob/ob – lep versus ob/ob* $^{++++}$p<0,001. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.1.2 Peso do rim

Após a eutanásia, o rim esquerdo dos animais foi pesado. Não foram encontradas alterações significativas no peso do rim entre os grupos nos períodos de tratamentos de 28 e 42 dias **(tabela 4)**.

Tabela 4 – Peso do rim em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Peso do rim (g)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	0,16 ± 0,01 (11)	0,15 ± 0,01 (7)	0,18 ± 0,01 (5)
42 dias	0,19 ± 0,00 (10)	0,20 ± 0,01 (5)	0,19 ± 0,01 (6)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.1.3 Ingestão de água e fluxo urinário

Para avaliação da ingestão de água, ao final do período de tratamento com leptina, os animais controles e modelos experimentais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas. Não se observou alteração significativa neste parâmetro entre os grupos nos períodos de tratamentos de 28 e 42 dias **(tabela 5)**.

Tabela 5 – Ingestão de água em animais CTL, *ob/ob* e *ob/o*b -lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Ingestão de água (mL/dia)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	2,8 ± 0,4 (6)	3,2 ± 0,6 (6)	2,5 ± 0,9 (5)
42dias	2,2 ± 0,3 (7)	1,9 ± 0,3 (10)	2,7 ± 0,3 (10)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

Com os valores de volume urinário de 24 horas se obteve os valores de fluxo urinário. Não houve alteração significativa do fluxo urinário entre os grupos nos períodos de tratamentos de 28 e 42 dias **(tabela 6)**.

Tabela 6 – Fluxo urinário em animais CTL, *ob/ob e ob/ob* -lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

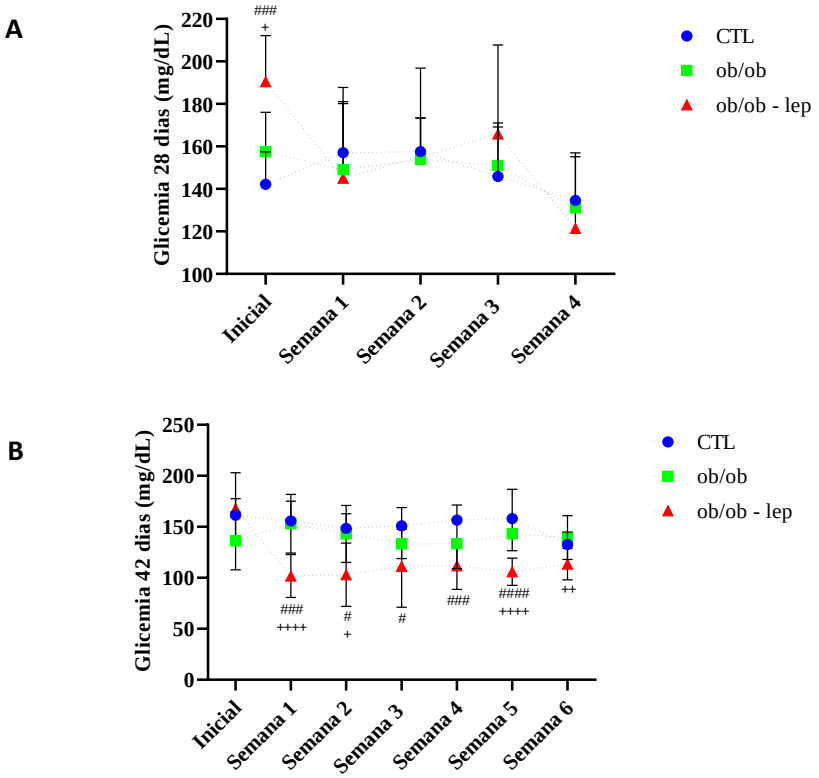
Fluxo urinário (mL/dia)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	0,0015 ± 0,0001 (9)	0,0012 ± 0,0002 (6)	0,0013± 0,00009 (5)
42dias	0,0015 ± 0,0010 (7)	0,0016 ± 0,0001(10)	0,0012 ± 0,0002 (10)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.1.4 Glicemia e Frutosamina plasmática

A glicemia dos animais foi monitorada semanalmente e a frutosamina plasmática foi avaliada ao final do período experimental. No grupo experimental de 28 dias não foram observadas alterações significativas da glicemia entre os grupos ao longo das semanas **(figura 9 A).** No grupo experimental de 42 dias, não houve diferença significativa entre os grupos controle e *ob/ob* ao longo das semanas. Por outro lado, os animais obesos tratados com leptina apresentaram glicemia menor do que os animais dos grupos controle e obesos em alguns tempos observados **(figura 9 B).** Em relação a frutosamina plasmática, não houve diferença estatística entre os grupos nos períodos de tratamentos de 28 e 42 dias **(tabela 7).**

Figura 9 – Glicemia semanal



Glicemia semanal nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 dias (A) e 42 dias (B). *ob/ob*- lep *versus controle* $^{\#}$p<0,05, *ob/ob*- lep *versus controle* $^{\#\#\#}$p<0,001, *ob/ob*- lep *versus controle* $^{\#\#\#\#}$p<0,0001, *ob/ob*- lep *versus ob/ob* $^{+}$p<0,05, *ob/ob*- lep *versus ob/ob* $^{++}$p<0,01, *ob/ob*- lep *versus ob/ob* $^{++++}$p<0,0001. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=5-9).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 – Frutosamina plasmática em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* – lep tratados por 28 e 42 dias

Frutosamina (mmol/L)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	137,6 ± 7,3 (7)	164,1 ± 8,1 (5)	159,0 ± 5,1 (5)
42 dias	165,6 ± 14,8 (7)	171,2 ± 18,3 (6)	148,2 ± 10,4 (5)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

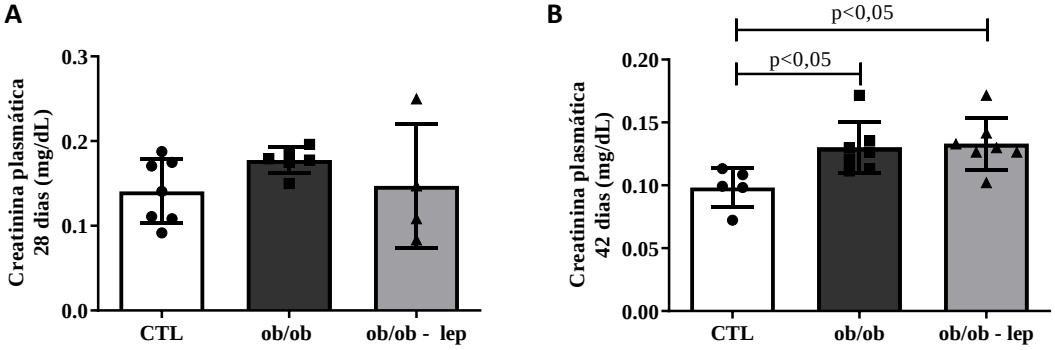
5.2 Parâmetros Renais

5.2.1 Creatinina plasmática e clearance de creatinina

A creatinina plasmática nos grupos de 28 dias não foi estatisticamente diferente entre os grupos. No protocolo de 42 dias, por outro lado, houve aumento da creatina plasmática dos animais obesos em relação aos controles. Nos animais obesos tratados com leptina esse aumento foi mantido **(Figura 10 A e B e tabela 8)**. Em relação ao clearance de creatinina, apesar de não

haver diferença estatística entre os grupos, foi possível observar uma tendência a redução deste parâmetro nos animais obesos em relação ao controle em ambos protocolos experimentais. No grupo tratado com leptina os valores de clearance de creatinina ficaram mais próximos ao controle em ambos grupos experimentais **(figura 11 A e B e tabela 9)**.

Figura 10 – Creatinina plasmática



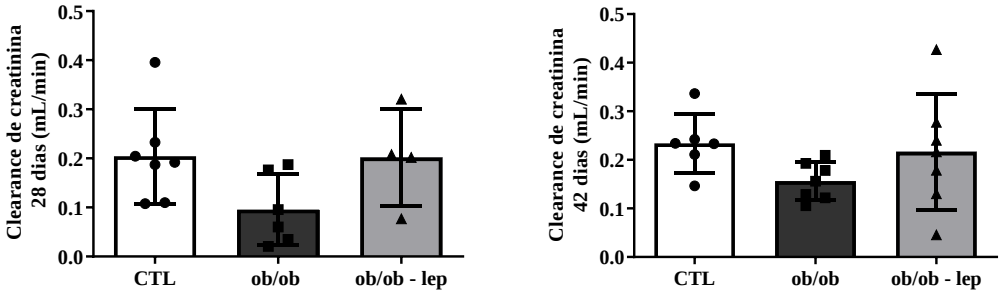
Creatinina plasmática nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 dias (A) e 42 dias (B). Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-7).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8 – Creatinina plasmática em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Creatinina plasmática (mg/dL)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	0,14 ± 0,01 (7)	0,18 ± 0,006 (6)	0,15 ± 0,04 (4)
42 dias	0,10 ± 0,01 (5)	0,13 ± 0,01 (7)*	0,13 ± 0,01 (7)#

ob/ob versus controle*p<0,05, *ob/ob – lep versus* controle ##p<0,05. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

Figura 11 – Clearance de creatinina



Clearance de creatinina nos grupos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 dias (A) e 42 dias (B). Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=5-7).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9 – Clearance de creatinina em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

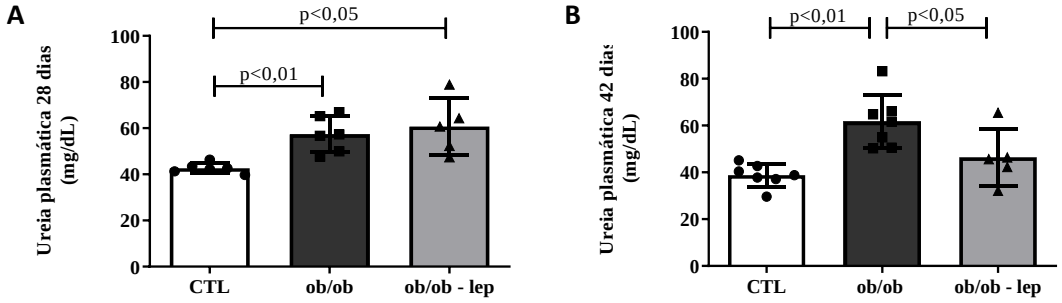
Clearance de creatinina (mL/min)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	0,20 ± 0,04 (7)	0,09 ± 0,03 (6)	0,20 ± 0,05 (4)
42 dias	0,23 ± 0,03 (6)	0,16 ± 0,01 (7)	0,22 ± 0,04 (7)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.2.2 Ureia plasmática

Os animais *ob/ob* apresentaram aumento da ureia plasmática em ambos períodos de observação quando comparados aos respectivos controles **(figura 12 A e B e tabela 10)**. O tratamento com leptina (ob ob – lep) por 28 dias não corrigiu este parâmetro e no grupo de 42 dias, o peptídeo corrigiu os níveis de ureia no plasma para valores próximos ao controle.

Figura 12 – Ureia plasmática



Ureia plasmática em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=5-7).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 10 – Ureia plasmática em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

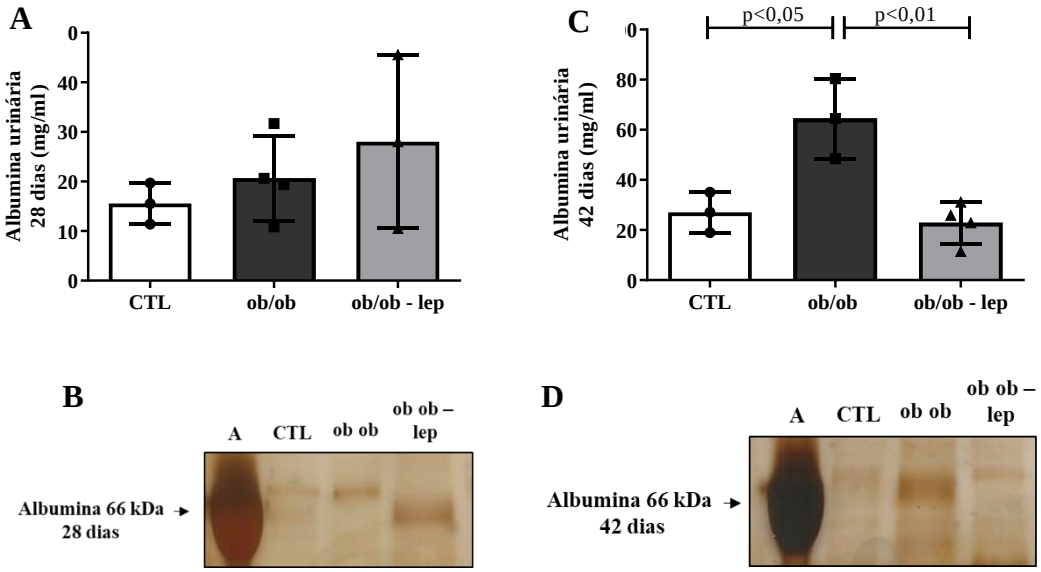
Ureia plasmática (mg/dL)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	42,65 ± 0,92 (6)	57,32 ± 3,17 (6)**	60,70 ± 5,44 (5)$^{\#}$
42 dias	38,79 ± 1,86 (7)	61,65 ± 4,34 (7)**	46,39 ± 5,40 (5)$^{+}$

ob/ob versus controle $^{**}p<0,01$, *ob/ob* – lep *versus* controle $^{\#}p<0,05$, *ob/ob* – lep *versus ob/ob* $^{+}p<0,05$. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.2.3 Albumina urinária

No grupo de 28 dias não se observou diferença estatística da concentração urinária de albumina entre os grupos **(figura 13 A e B e tabela 11)**. Em contrapartida, no grupo de 42 dias houve aumento na concentração urinária de albumina nos animais *ob/ob* e o tratamento com leptina reverteu este parâmetro para valores próximos aos dos controles magros **(figura 13 C e D e tabela 11)**.

Figura 13 – Albumina urinária em animais



Albumina urinária em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A e B) e 42 dias (C e D). Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=3-4).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 11 – Albumina urinária em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Albumina urinária (mg/mL)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	15,54 ± 2,39 (3)	20,63 ± 4,28 (4)	28,04 ± 10,11 (3)
42 dias	27,03 ± 4,64 (3)	64,43 ± 9,22 (3)*	22,85 ± 4,16 (4)$^{\#\#}$

ob/ob versus controle*p<0,05, *ob/ob* – lep versus *ob/ob* $^{\#\#}$p<0,01. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.2.4 Sódio e potássio

Para verificar o manejo renal de íons foram feitas medidas de sódio e potássio plasmáticos. As concentrações de sódio e potássio no plasma não foram alteradas entre os grupos **(tabela 12 e 13)**.

Tabela 12 – Na^+ plasmático em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Na^+ plasmático (mEq)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	139,7 ± 4,3 (9)	140,0 ± 4,2 (5)	147,3 ± 4,5 (4)
42 dias	137,6 ± 2,4 (6)	138,0 ± 3,42 (9)	139,3 ± 1,9 (9)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

Tabela 13 – K^+ plasmático em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

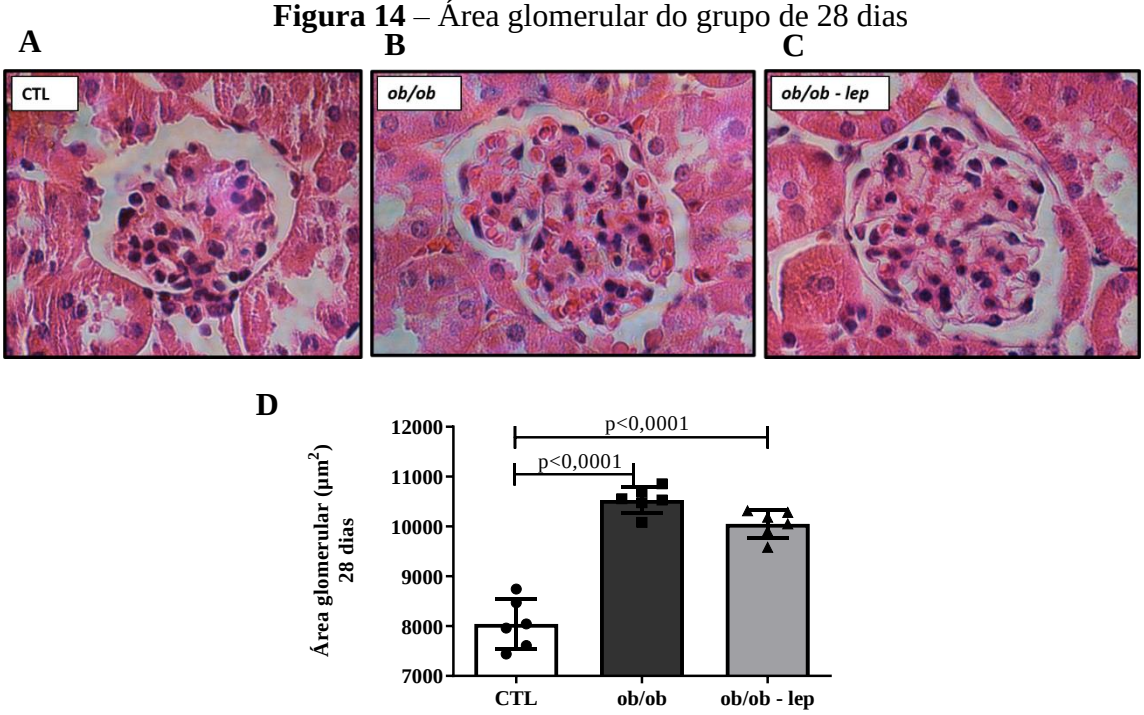
K^+ plasmático (mEq)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	2,11 ± 0,11 (9)	2,6 ± 0,40 (5)	2,2 ± 0,25 (4)
42 dias	2 ± 0 (6)	2,44 ± 0,24 (9)	2,22 ± 0,22 (9)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.2.5 Área glomerular

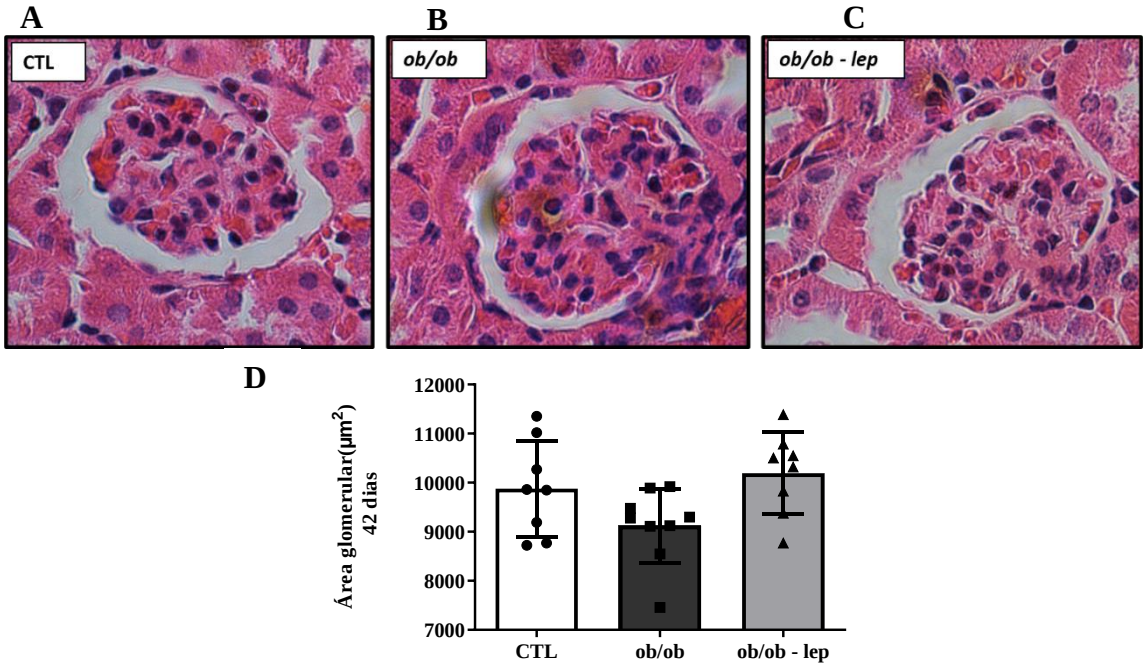
A área glomerular dos animais dos protocolos experimentais de 28 e 42 dias foi medida. Nos animais do grupo de 28 dias houve um aumento da área glomerular no grupo obeso quando comprado ao controle magro **(Figura 14 A e B e tabela 14)**. O tratamento com leptina não reverteu a área glomerular para valores próximos ao controle **(Figura 14 A e C e tabela 14)**. Por outro lado, no grupo de 42 dias não houve alteração significativa na área glomerular entre os grupos **(Figura 15 A, B, C e D e tabela 14)**.

Figura 14 – Área glomerular do grupo de 28 dias



Área glomerular dos animais CTL **(A),** *ob/ob* **(B)** e *ob/ob* – lep **(C)** tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 dias. As imagens foram capturadas por meio de um software morfométrico (NIS- Elements) com aumento de 40x. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=6).
Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 – Área glomerular do grupo de 42 dias



Área glomerular dos animais CTL **(A)**, *ob/ob* **(B)** e *ob/ob* – lep **(C)** tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias. As imagens foram capturadas por meio do software morfométrico (NIS- Elements) com aumento de 20x, em destaque glomérulos indicados pelas setas amarelas em aumento de 40x. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=8-9).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 14 – Área glomerular dos animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias.

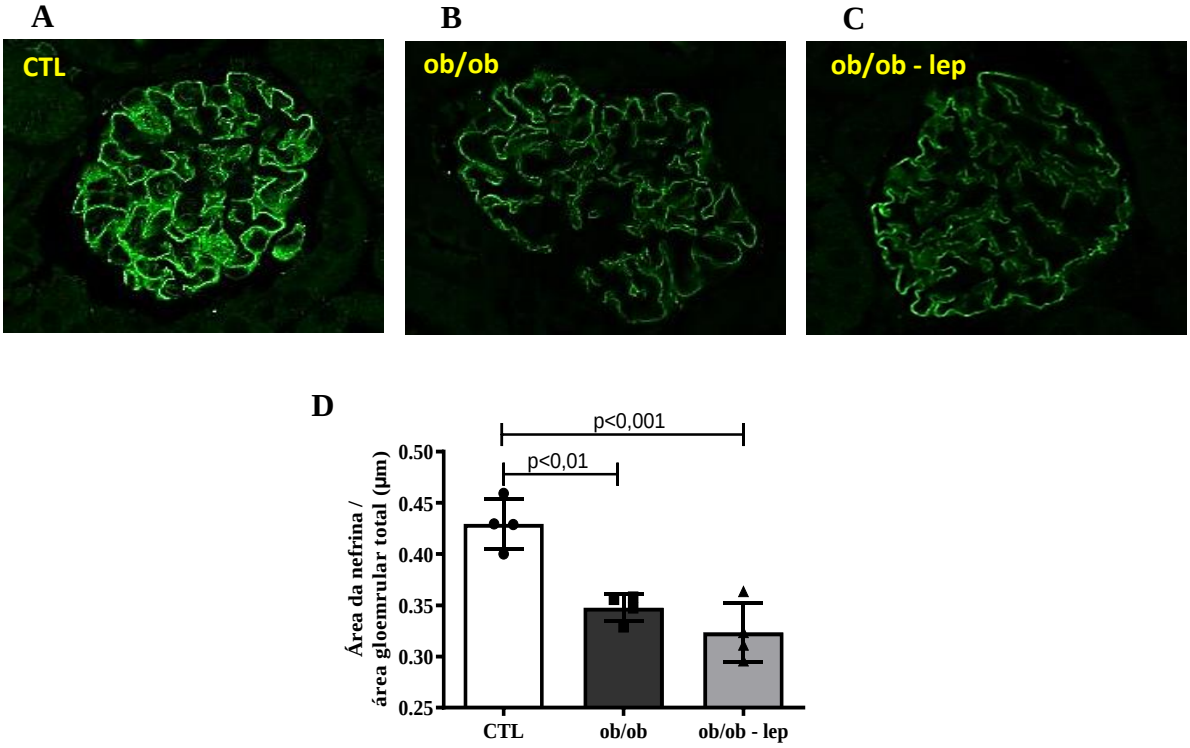
Área glomerular (µm²)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	8045 ± 202 (6)	10533 ± 105 (6)****	10054 ± 112 (6)$^{\#\#\#\#}$
42 dias	9878 ± 344 (8)	9122 ± 250 (9)	10189 ± 294 (8)

ob/ob versus controle p****<0,0001, *ob/ob*- lep *versus* controle p$^{\#\#\#\#}$<0, 0001. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.2.6 Expressão de nefrina

Considerando as alterações de função renal observadas no grupo de 42 dias, passamos a investigar a integridade da barreira de ultrafiltração glomerular desses animais. Para tal, foi avaliada a expressão de nefrina por imunofluorescência neste grupo experimental. A expressão de nefrina foi expressa pela razão da área marcada com nefrina e área glomerular total. Nos animais obesos a expressão de nefrina foi reduzida em relação ao grupo controle e o tratamento com leptina não reverteu este parâmetro para valores próximos ao controle **(Figura 15 A,B, C e D e tabela 15)**.

Figura 16- Imunofluorescência de nefrina em glomérulos



Imunofluorescência de nefrina em glomérulos de animais CTL (A), *ob/ob* (B) e *ob/ob* – lep (C) tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias. Analisado em microscópio confocal, aumento de 63 vezes. Razão da área glomerular marcada com nefrina e área glomerular total (D). Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 15 – Expressão de nefrina em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Razão área nefrina/ área glomerular (µM)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
42 dias	0,43 ± 0,012 (4)	0,35 ± 0,07 (4)**	0,32 ± 0,015 (4)###

ob/ob versus controle**p<0,01, *ob/ob - lep* versus controle ###p<0,001. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses

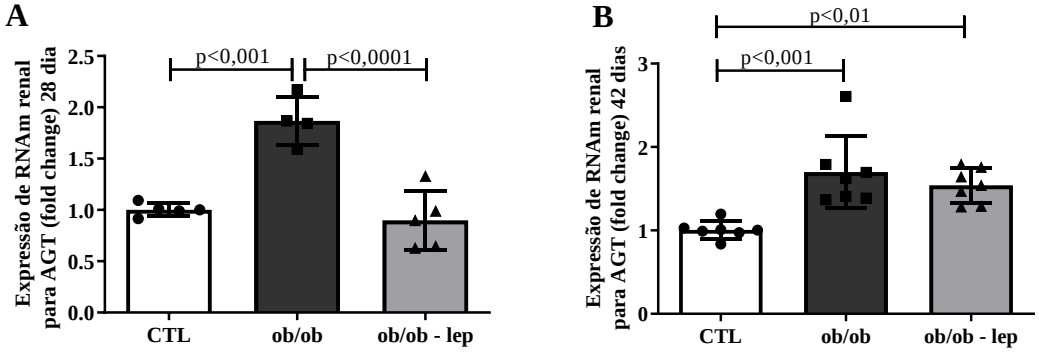
5.3 Expressão de RNAm

5.3.1 Sistema renina angiotensina (SRA) no tecido renal

Os animais *ob/ob* dos grupos de 28 e 42 dias apresentaram aumento na expressão de RNAm para angiotensinogênio em relação ao controle **(figura 17 A e B e tabela 16)**. O tratamento com leptina por 28 dias reverteu este resultado para valores próximos ao controle.

No entanto, no grupo de 42 dias, a leptina não interferiu e, portanto, este parâmetro se manteve aumentado **(figura 17 A e tabela 16)**.

Figura 17 – Expressão renal de RNAm para angitensinogênio (AGT)



Expressão renal de RNAm para angitensinogênio (AGT) em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-7).
Fonte: Elaboração própria.

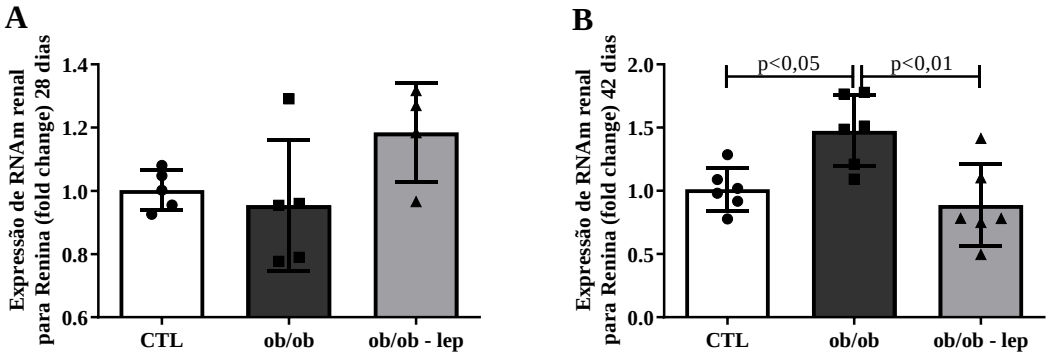
Tabela 16 – Expressão renal de RNAm para angitensinogênio (AGT) em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Expressão de RNAm para AGT (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	1,0 ± 0,03 (5)	1,87 ± 0,12 (4)***	0,90 ± 0,13 (5)$^{++++}$
42 dias	1,0 ± 0,04 (7)	1,70 ± 0,16 (7) ***	1,54 ± 0,07 (7)$^{\#\#}$

ob/ob versus controle***p<0,001, *ob/ob* – lep *versus ob/ob* $^{++++}$p<0,001, *ob/ob* – lep *versus* controle $^{\#\#}$p<0,01. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

No grupo de 28 dias, a expressão de RNAm para renina se manteve inalterada entre os grupos **(figura 18 A e tabela 17)**. Porém, no grupo de 42 dias, os animais *ob/ob* apresentaram aumento significativo da expressão de RNAm para renina e o tratamento com leptina (*ob/ob* – lep) reverteu esse resultado para valores próximos ao controle **(figura 18 B e tabela 17)**.

Figura 18 – Expressão renal de RNAm para Renina



Expressão renal de RNAm para Renina em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-6).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 17 – Expressão renal de RNAm para Renina em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

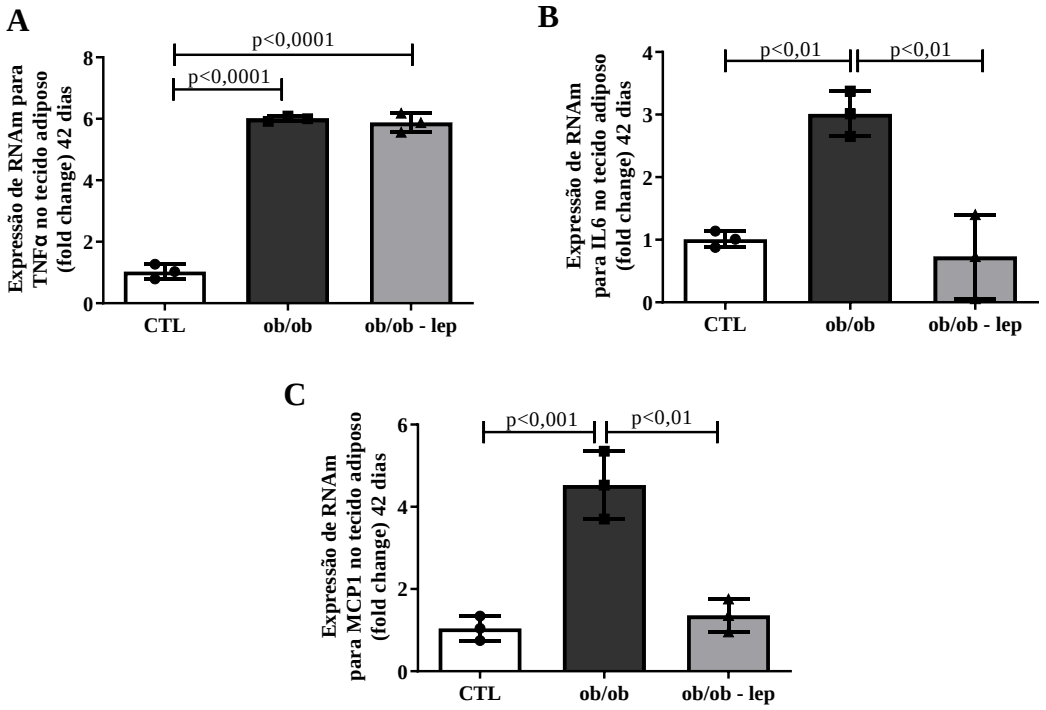
Expressão de RNAm para Renina (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	1,0 ± 0,0 (5)	0,95 ± 0,09 (5)	1,18 ± 0,08 (4)
42 dias	1,0 ± 0,1 (6)	1,47 ± 0,11 (6) *	0,89 ± 0,13 (6)$^{++}$

ob/ob versus controle*p<0,05, *ob/ob* – lep *versus ob/ob* $^{++}$p<0,01. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.3.2 Fatores inflamatórios no tecido adiposo renal

A expressão gênica de fatores inflamatórios foi avaliada apenas no tecido adiposo renal do grupo de 42 dias. Não fizemos esta análise no grupo de 28 dias, pois os animais eram muito jovens e os controles magros não possuíam gordura renal suficiente para coleta. Os animais *ob/ob* apresentaram aumento significativo na expressão de RNAm para TNFα, IL6 e MCP1 em relação aos respectivos controles. O tratamento do grupo *ob/ob* com leptina manteve o aumento da expressão de RNAm para TNFα, mas reverteu o aumento de IL6 e MCP1. **(figura 19 A, B e C e tabela 18)**.

Figura 19 – Expressão de RNAm para TNFα, IL6 e MCP1



Expressão de RNAm para TNFα (A), IL6 (B) e MCP1 (C) no tecido adiposo renal de animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias). Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=3).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 18– Expressão de RNAm no tecido adiposo renal de fatores inflamatórios em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias).

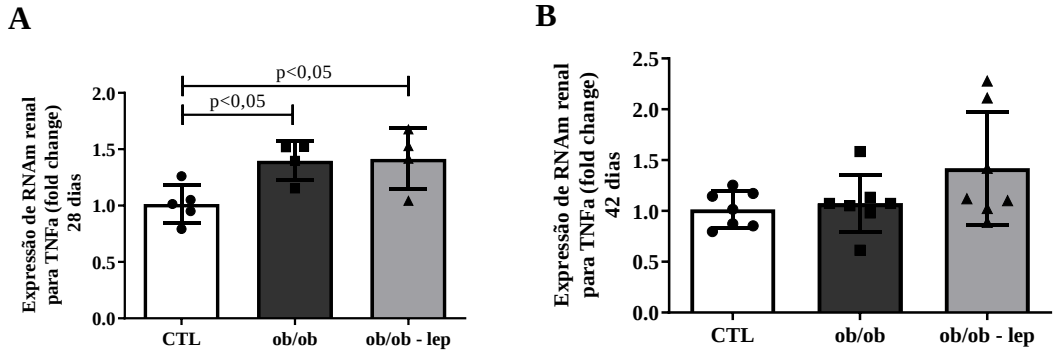
Expressão de RNAm 42 dias (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
TNFα	1,0 ± 0,1 (3)	6,0 ± 0,1 (3)****	5,87 ± 0,18 (3)$^{\#\#\#\#}$
IL6	1,0 ± 0,1 (3)	3,01 ± 0,21 (3)**	0,73 ± 0,39 (3)$^{++}$
MCP1	1,0 ± 0,2 (3)	4,53 ± 0,47(3)***	1,36 ± 0,23 (3)$^{++}$

ob/ob versus controle ****p<0,0001, *ob/ob* – lep *versus* controle $^{\#\#\#\#}$p<0,0001, *ob/ob versus* controle **p<0,01, *ob/ob* – lep *versus ob/ob* $^{++}$p<0,01, *ob/ob versus* controle ***p<0,001, *ob/ob* – lep versus *ob/ob* $^{++}$p<0,01. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.3.3 Fatores inflamatórios no tecido renal

Nos animais obesos do grupo de 28 dias houve aumento de expressão de RNAm para TNFα em relação ao grupo controle, apesar do tratamento com leptina esse aumento se manteve. Não foram observadas alterações na expressão de RNAm para TNFα entre os grupos no tempo de 42 dias **(figura 20 A e B e tabela 19)**.

Figura 20 – Expressão renal de RNAm para TNFα



Expressão renal de RNAm para TNFα em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* – lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-7).
Fonte: Elaboração própria.

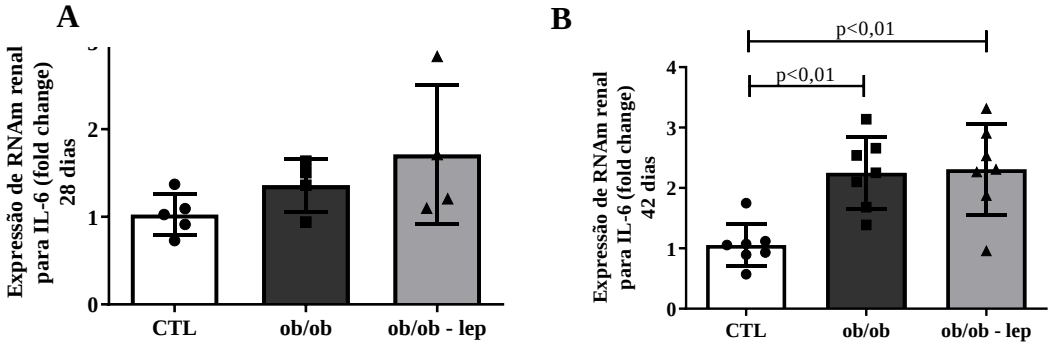
Tabela 19 – Expressão renal de RNAm para TNFα em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Expressão de RNAm para TNFα (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	1,0 ± 0,08 (5)	1,40 ± 0,09 (4)*	1,41 ± 0,13 (4)#
42 dias	1,0 ± 0,1 (7)	1,07 ± 0,11 (7)	0,42 ± 0,20 (7)

ob/ob versus controle *p<0,05, *ob/ob* – lep *versus* controle #p<0,05. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

Em relação à interleucina 6 (IL-6), no grupo de 28 dias não houve alteração deste parâmetro entre os grupos de animais avaliados **(figura 21 A e tabela 20)**. No entanto, no grupo de 42 dias, os animais *ob/ob* apresentaram aumento significativo da expressão de RNAm para IL-6 e este aumento se manteve apesar do tratamento com leptina **(figura 21 B e tabela 22)**.

Figura 21 – Expressão renal de RNAm para IL-6



Expressão renal de RNAm para IL-6 em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-7).
Fonte: Elaboração própria.

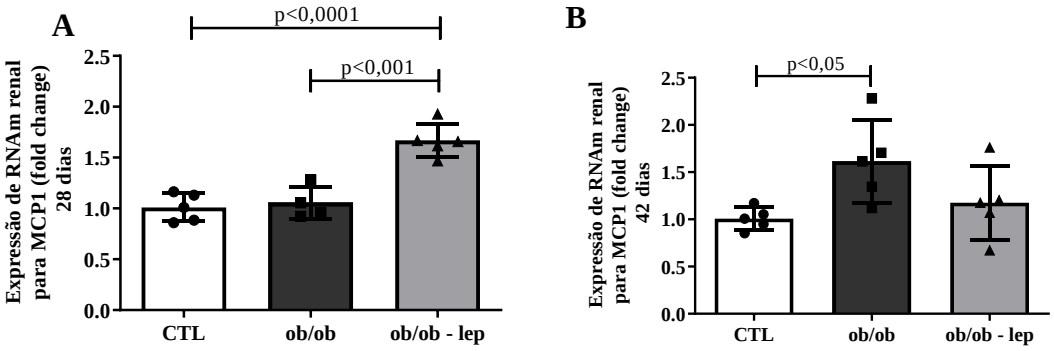
Tabela 20 – Expressão renal de RNAm para IL-6 em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Expressão de RNAm para IL-6 (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	1,0 ± 0,01 (5)	1,36 ± 0,15 (4)	1,71 ± 0,40 (4)
42 dias	1,0 ± 0,1 (7)	2,25 ± 0,22 (7) **	2,31 ± 0,28 (7)$^{\#\#}$

ob/ob versus controle $p^{**}<0,01$, *ob/ob* – lep *versus* controle $^{\#\#}p<0,01$. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

No grupo de 28 dias houve aumento da expressão de RNAm para MCP1 apenas no grupo tratado com leptina **(figura 22 A e tabela 21)**. Porém, no grupo de 42 dias houve aumento da expressão de RNAm para MCP1 nos animais *ob/ob* em relação ao controle e o tratamento com leptina reduziu parcialmente este parâmetro **(figura 22 B e tabela 21)**.

Figura 22 – Expressão renal de RNAm para MCP1



Expressão renal de RNAm para MCP1 em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-5).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 21 – Expressão renal de RNAm para MCP1 em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

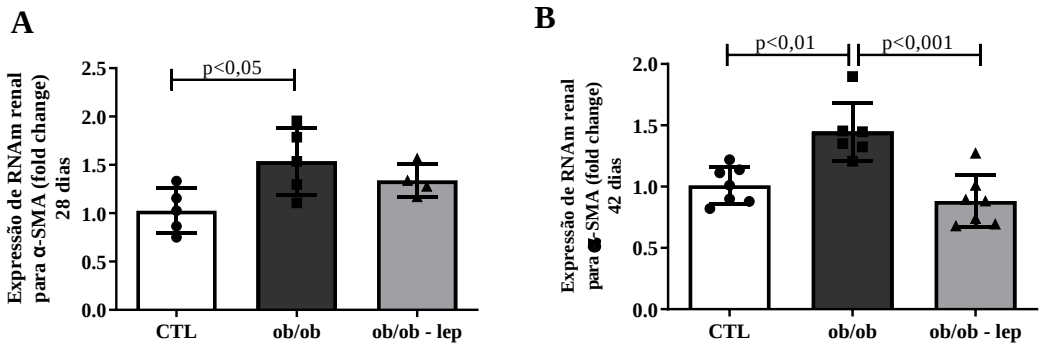
Expressão de RNAm para MCP1 (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	1,0 ± 0,06 (5)	1,05 ± 0,08 (4)	1,67 ± 0,07 (4)$^{\#\#\#\#+++}$
42 dias	1,0 ± 0,05 (5)	1,61 ± 0,20 (5) *	1,17 ± 0,17 (5)

ob/ob versus controle $p^{*}<0,05$, *ob/ob* – lep *versus ob/ob* $^{+++}p<0,001$,*ob/ob* – lep *versus* controle $^{\#\#\#\#}p<0,001$. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.3.4 Fatores relacionados à fibrose no tecido renal

Nos grupos de 28 e 42 dias a expressão de RNAm para α-SMA no tecido renal foi significativamente aumentada quando comparada ao controle **(figura 23 A e B e tabela 22)**. No entanto, o tratamento com leptina não interferiu neste aumento no grupo de 28 dias, mas para valores próximos ao controle no grupo de 42 dias **(figura 23 B e tabela 22)**.

Figura 23 – Expressão renal de RNAm para α-SMA



Expressão renal de RNAm para α-SMA em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=4-7).
Fonte: Elaboração própria.

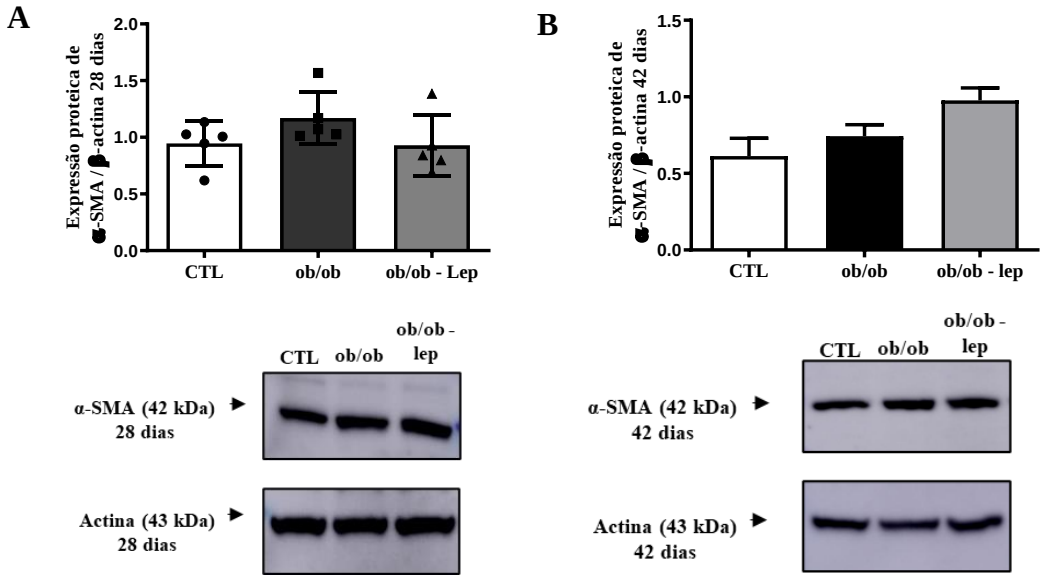
Tabela 22 – Expressão renal de RNAm para α-SMA em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Expressão de RNAm para α-SMA (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	1,0 ± 0,1 (5)	1,54 ± 0,15 (5)*	1,34 ± 0,08 (4)
42 dias	1,0 ± 0,1 (7)	1,45 ± 0,09 (6)**	0,88 ± 0,08 (7)$^{+++}$

ob/ob versus controle $p^{*}<0,05$, *ob/ob versus* controle $^{**}p<0,01$, *ob/ob* – lep versus *ob/ob* $^{+++}p<0,001$. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

Em relação a expressão proteica de α-SMA, não houve diferença estatística entre os grupos em ambos tempos de tratamento **(figura 24 A e B e tabela 23)**.

Figura 24 – Expressão proteica renal para α-SMA



Expressão proteica renal para α-SMA em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 (A) e 42 (B) dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n= 5-6).
Fonte: Elaboração própria.

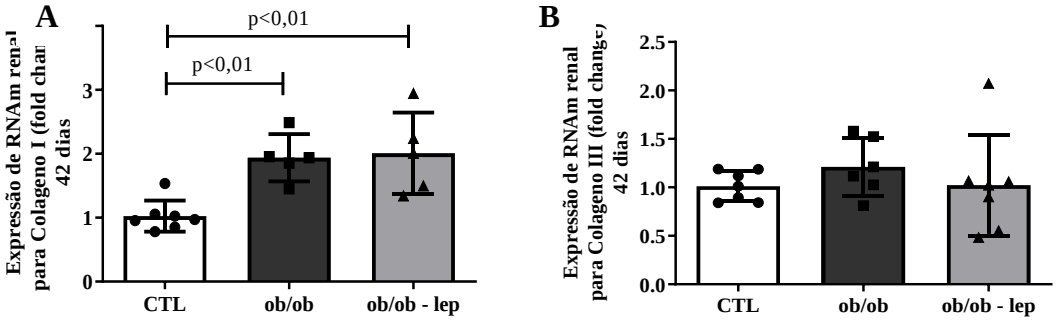
Tabela 23 – Expressão proteica renal α-SMA em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

Expressão proteica de α-SMA	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
28 dias	0,95 ± 0,09 (5)	1,17 ± 0,10 (5)	0,93 ± 0,12 (5)
42 dias	0,61 ± 0,1 (5)	0,74 ± 0,07 (5)	0,98 ± 0,08 (6)

Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

No presente estudo, a expressão de RNAm para colágeno I e III foi avaliada apenas no grupo tratado de 42 dias. Nos animais *ob/ob* houve aumento da expressão de RNAm para colágeno I em relação ao controle e o tratamento com leptina não foi capaz de reverter este aumento **(figura 25 A e tabela 24)**. Em relação à expressão de RNAm para colágeno II, não houve diferença estatística entre os grupos estudados **(figura 25 B e tabela 24)**.

Figura 25 – Expressão renal de RNAm para colágenos I e II



Expressão renal de RNAm para colágenos I (A) e II (B) em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias). Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=5-7).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 24 – Expressão renal de RNAm para α-SMA em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep (tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/28 e 42 dias).

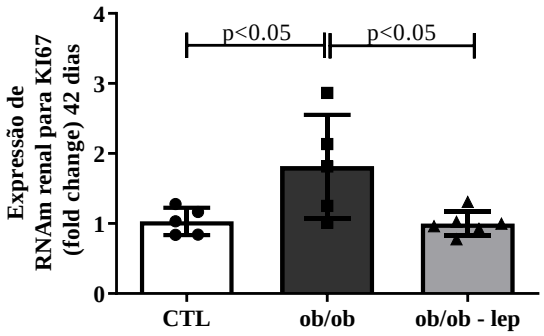
Expressão de RNAm 42 dias (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
Colágeno I	1,0 ± 0,1 (7)	1,94 ± 0,16 (5)**	2,01 ± 0,29 (5)##
Colágeno III	1,0 ± 0,1 (7)	1,21 ± 0,12 (6)	1,02 ± 0,20 (7)

ob/ob versus controle p**<0,01, *ob/ob* -lep *versus controle* ##p<0,00. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

5.3.5 Proliferação celular em glomérulos

Para avaliar a proliferação celular no grupo experimental de 42 dias, a expressão de RNAm para KI67 foi analisada. Nos animais obesos houve aumento de expressão de KI67 em relação aos animais controle e o tratamento com leptina reduziu a expressão deste parâmetro para valores próximos ao controle **(Figura 26 e tabela 25)**.

Figura 26 – Expressão renal de RNAm para KI67 no grupo de 42 dias



Expressão renal de RNAm para KI67 em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=5-6).
Fonte: Elaboração própria.

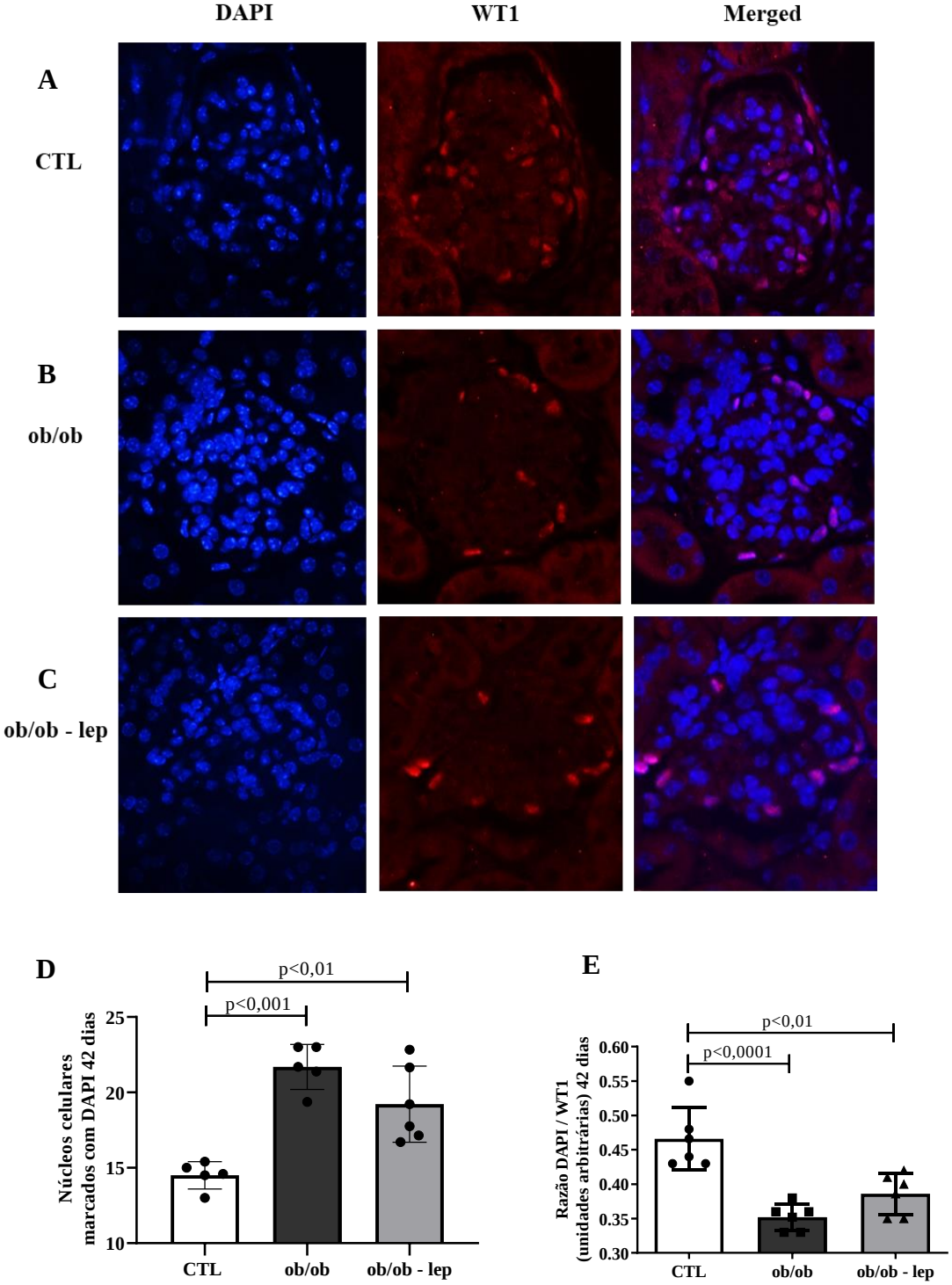
Tabela 25 – Expressão renal de RNAm para KI67 em camundongos CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/ 42 dias.

Expressão de RNAm 42 dias (fold change)	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
KI67	1,0 ± 0,09 (5)	1,8 ± 0,33 (5)*	0,99 ± 0,07 (6)$^{+}$

ob/ob versus controle $p^{*}<0,05$, *ob/ob* -lep *versus ob/ob* $^{+}p<0,05$. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

Foi realizada também a contagem de núcleos celulares marcados com DAPI, a colocalização de DAPI/WT1 e, então, foi feito o cálculo da razão destas duas moléculas. **(Figura 27 e tabela 26)**. Nos animais obesos houve aumento de núcleos celulares marcados com DAPI e diminuição da marcação com WT1 em relação ao controle **(Figura 27 A, B, D e E e tabela 26)**. O tratamento com leptina não alterou estes parâmetros em relação aos animais obesos sem tratamento **(Figura 27 B, C, D e E e tabela 26)**.

Figura 27 – Imunofluorescência de DAPI e WT1 no grupo de 42 dias



Imunofluorescência de DAPI e WT1 em animais CTL **(A)**, *ob/ob* **(B)** e *ob/ob* – lep **(C)** tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias. As imagens foram capturadas em aumento de 40x. Contagem de núcleos celulares marcados com DAPI **(D)**. Razão do número de núcleos marcados com DAPI e com WT1 **(E)**. Análise estatística é representada como média ± erro padrão (n=5-6).
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 26 – Imunofluorescência de DAPI e WT1 em animais CTL, *ob/ob* e *ob/ob* - lep tratados com leptina na dose de 3,5 µg/dia/42 dias.

Imunofluorescência 42 dias	*CTL*	*ob/ob*	*ob/ob - lep*
Contagem de núcleos	14,5 ± 0,4 (5)	21,7 ± 0,7 (5)***	19,2 ± 1,0 (6)$^{\#\#}$
Razão DAPI/ WT1	0,47 ± 0,02 (6)	0,35 ± 0,01 (6)****	0,39 ± 0,01 (6)$^{\#\#}$

ob/ob versus controle $p^{***}<0,001$, *ob/ob* -lep *versus controle* $^{\#\#}p<0,01$, *ob/ob versus* controle $p^{****}<0,0001$. Análise estatística é representada como média ± erro padrão. O n amostral está representado entre parênteses.

6 DISCUSSÃO

A leptina é um é um hormônio produzido principalmente pelos adipócitos do tecido adiposo branco e atua diretamente no hipotálamo para regular negativamente a ingestão energética [10]. No presente estudo foram utilizados camundongos *ob/ob* como modelos experimentais de obesidade, estes animais desenvolvem obesidade associada à ausência de leptina [41]. Desta forma, foi possível investigar a contribuição da obesidade na progressão da DRC e a introdução do tratamento com leptina (em dose baixa) permitiu avaliar o papel deste peptídeo.

Os animais ob/ob com 8 semanas de idade apresentaram maior ingestão de ração quando comparados aos controles magros como esperado[10], porém o tratamento com leptina por 28 dias não foi capaz de reduzir a ingestão energética destes animais, embora tenha sido suficiente para reduzir parcialmente o seu ganho de peso. O ganho de peso, apesar de parcialmente reduzido nos animais obesos tratados, não reduziu de forma significativa ao longo das semanas de protocolo experimental destes camundongos. Portanto, o tratamento com leptina não parece ter sido eficiente nestes camundongos, mas é importante ressaltar que nesse grupo os animais tem 8 semanas de idade e esta é uma fase em que há crescimento e imaturidade sexual, que cessa por volta da 12° semana de vida [76]. De fato, o ganho de peso observado nos animais ob/ob do grupo de 28 dias é maior quando comparado aos animais ob/ob do grupo de 42 dias (18 semanas de idade), provavelmente devido ao crescimento natural dos animais jovens. Assim, sugerimos que o tratamento de animais obesos (8 semanas) com leptina por 28 dias não se mostrou tão eficaz em reduzir a ingestão de ração e o peso devido ao ganho de peso natural que ocorre nesta idade.

Para que a idade não intervisse na eficácia do tratamento com leptina, passamos a usar animais com idade pós-maturidade sexual (18 semanas) para iniciar o tratamento com leptina e ampliamos o período de tratamento de 28 para 42 dias. Este protocolo está de acordo com outros achados da literatura [77; 78; 79].

No grupo de 42 dias foram realizadas medidas de leptina plasmática. Nosso resultado confirma que os animais ob/ob utilizados no presente estudo não apresentavam produção expressiva de leptina e que o tratamento com leptina exógena elevou os níveis plasmáticos deste hormônio para valores próximos ao controle. Este dado confirma a eficácia do tratamento com leptina e que a dose utilizada foi fisiológica. Escolhemos tratar os animais com doses fisiológicas de leptina, para verificar seus possíveis efeitos renoprotetores em animais obesos que não produziam este peptídeo.

Como esperado[10] os animais ob/ob apresentaram maior ingestão de ração quando comparados ao controle magro e o tratamento com leptina reduziu esse parâmetro para valores próximos ao controle. Como consequência da maior ingestão de ração, os animais ob/ob apresentaram maior peso corporal quando comparados ao grupo controle. Apesar disso, quando comparamos o ganho de peso entre os grupos não verificamos diferença estatística entre os animais controles e obesos. Isso se deve a idade dos animais, que já atingiram a maturidade sexual e, portanto, não tem uma taxa de crescimento e ganho de peso pronunciado. Porém, apesar de estável, os pesos corporais dos animais obesos foram maiores do que nos animais controles magros. Os animais tratados com leptina por 42 dias apresentaram perda de peso e consequente queda do peso corporal, sendo que nas últimas semanas de tratamento o peso destes animais estava próximo ao controle. Estes dados asseguram que o tratamento com leptina por 42 dias foi eficaz no ajuste do peso.

Além de monitorar a ingestão diária de ração, ao final do protocolo experimental os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para avaliação da ingestão de água e fluxo urinário. Porém, quanto a estes parâmetros não observamos diferenças significativas entre os grupos nos períodos de 28 e 42 dias.

De acordo com dados da literatura, os animais ob/ob são hiperfágicos, obesos, hiperinsulinêmicos e hiperglicêmicos [79; 80]. No entanto, a hiperglicemia depende do background genético [81; 82]. Camundongos provenientes de linhagens com background C57BL/6-J, apresentam hiperglicemia de moderada a leve, variável e que não se mantem ao longo do tempo. De fato, os animais ob/ob utilizados no presente estudo são de background C57BL/6-J e apresentaram valores de glicemia similares aos controles. Nossos resultados corroboram esses achados da literatura e estão em acordo com os resultados obtidos por Thieme e colaboradores [83]. Para confirmar o estado normoglicêmico dos animais controles, obesos e tratados, avaliamos os níveis de frutosamina no plasma dos grupos de 28 e 42 dias. A frutosamina é formada pela ligação da glicose a proteínas plasmáticas (principalmente albumina) formando proteínas glicadas e se mantem aumentada em indivíduos diabéticos [84]. Não encontramos diferenças desse parâmetro entre os grupos estudos, confirmando que os animais obesos utilizados neste estudo não eram diabéticos.

Surpreendentemente, no grupo de 42 dias houve redução da glicemia apenas nos animais obesos tratados com leptina em relação tanto aos animais controles como obesos. Sabe-se que a leptina tem efeitos metabólicos em vários tecidos, incluindo a supressão da produção de glucagon e corticosterona, aumento da captação de glicose (aumenta sensibilidade a insulina) e inibição da produção de glicose hepática, contribuindo para a diminuição da glicemia, inclusive

em animais diabéticos[85]. Levando em consideração estes dados da literatura e que os animais ob/ob são mais sensíveis a ação da leptina exógena [73; 86], a redução da glicemia nos animais obesos tratados com leptina observada no nosso protocolo de 42 dias pode ser uma resposta exacerbada ao tratamento com leptina no metabolismo da glicose destes animais.

Após constatarmos o efeito da leptina sobre os parâmetros metabólicos, passamos a investigar a contribuição da obesidade e o efeito da leptina nos parâmetros renais. Com relação à função renal, sabe-se que a obesidade associada a outras doenças como diabetes e hipertensão arterial é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) [87]. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos da obesidade propriamente dita na função renal, embora alguns estudos relatem aumento do fluxo sanguíneo renal e hiperfiltração glomerular em obesos não diabéticos ou hipertensos [88; 89] e associem essas alterações hemodinâmicas com injúria renal e progressão da DRC.

A creatinina é um produto de degradação da creatina no músculo, utilizada para avaliar a função renal na prática clínica e seus valores podem ser utilizados para estimar o RFG, pois ela é filtrada livremente nos glomérulos, não é reabsorvida e apenas uma pequena quantidade é secretada pelos túbulos proximais [90]. Nossos resultados indicam que apesar de não haver alteração estatisticamente significativa no fluxo urinário, nos níveis de creatinina no plasma ou no clearance de creatinina dos animais ob/ob do grupo de 28 dias, foi possível observar um aumento da creatinina plasmática nos animais obesos em relação ao controle do grupo de 42 dias. O tratamento com leptina não alterou este parâmetro. Em relação ao clearance de creatinina, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, foi possível observar uma tendência a queda neste parâmetro nos animais obesos em relação ao controle. O interessante, é que o tratamento com leptina reverteu a pequena queda no clearance de creatinina que voltou para níveis dos respectivos controles, sugerindo que nessa condição parece ter havido uma resposta renoprotetora do peptídeo. Estes resultados indicam um comprometimento da função renal dos animais obesos, principalmente no grupo de 42 dias.

Além da creatinina, avaliamos também os níveis de ureia no plasma. A ureia é o principal produto do catabolismo de proteínas, produzido pelo fígado e também é utilizada para avaliar a função renal. Altos níveis de ureia plasmática podem indicar a diminuição da sua excreção urinária devido à redução do RFG [91]. Além da creatinina, a ureia plasmática também é um indicador de função renal. Apesar de ser livremente filtrada pelo glomérulo, parte da ureia retorna para o plasma por difusão paracelular e transportadores específicos distribuídos no epitélio tubular [92]. Além disso, a ureia plasmática é considerada um marcador menos confiável da taxa de filtração glomerular do que a creatinina, já que alterações na dieta como aumento ou

diminuição na ingestão proteica são fatores que podem influenciar de forma significativa os níveis plasmáticos deste metabólito[93]. Embora apresente essas limitações, alterações nos níveis plasmáticos da ureia decorrentes da insuficiência renal surgem mais precocemente quando comparado à creatinina [94]. Nossos resultados corroboram esses achados, uma vez que os animais obesos dos dois grupos apresentaram aumento significativo da ureia plasmática mesmo sem alterar a creatinina. Nessa condição, a função renoprotetora da leptina também se pronunciou no grupo de 42 dias.

Embora os animais obesos tenham apresentado maior ingestão alimentar do que os animais dos grupos controle ou obesos tratados com leptina (no protocolo de 42 dias), a composição nutricional da ração ofertada a todos os grupos foi a mesma. Desta forma, concluímos que a alteração observada na ureia plasmática foi devido, em grande parte, ao comprometimento da função renal, e não apenas devido ao aumento da ingestão calórica. De fato, as alterações sutis na creatinina plasmática e no clearance de creatinina associado ao resultado de ureia plasmática nos fizeram considerar que no nosso modelo a obesidade poderia levar a injúrias renais que desencadeariam em comprometimento da função renal e que a leptina poderia ser renoprotetora. Por esse motivo avaliamos outros parâmetros de função renal para corroborar nossos achados.

É bem descrito que na condição de lesão renal, a albuminúria confirma a perda da função renal, especialmente por estar associada à injúria glomerular e/ou tubular [95; 96]. Nossos resultados corroboram tais achados, visto que no grupo de 42 dias, e não no de 28 dias, os animais obesos apresentaram albuminúria em comparação aos animais controle, interessantemente, a albuminúria foi reparada pelo tratamento com leptina. Levando em consideração que alterações estruturais na barreira de ultrafiltração glomerular dificilmente seriam reparadas pelo tratamento com leptina, nossa hipótese é que este peptídeo pode ter uma ação no transporte de proteínas do túbulo proximal, que contribui para melhora da proteinúria obeservada em nosso modelo.

A megalina é uma glicoproteína de alto peso molecular (600 kDa) que pertence a família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), esta amplamente distribuída na membrana apical das células do túbulo proximal e tem como função reabsorver e metabolizar proteínas filtradas pelo glomérulo [97]. Sabe-se que a megalina esta envolvida com a reabsorção de albumina e leptina pelo túbulo proximal[98]. De fato um estudo de 2015 conduzido por Briffa e colaboradores mostrou que o aumento de leptina plasmática leva a redução da expressão de megalina nos túbulos proximais, o que pode contribuir para a proteinúria associada a obesidade e hiperleptinemia [99]. Porém, não há na literatura dados sobre a ação da megalina em modelos

experimentais que não produzem leptina. O foco do presente estudo foi nas alterações glomerulares, mas, a investigação da expressão de megalina tubular em nosso modelo poderia responder se a reposição de leptina tem ação no funcionamento da megalina em consequentemente na reabsorção de albumina.

Quanto ao manejo renal de eletrólitos, não observamos alterações nos níveis plasmáticos de Na^+ e K^+, o que sugere que os grupos experimentais mantiveram o balanço de eletrólitos no meio interno. Desta forma, a regulação do volume do fluido extracelular parece não ter sido afetada pela obesidade e ocorreu dentro de níveis fisiológicos nos grupos estudados.

Diante das evidências de alterações na função renal observadas julgamos pertinente avaliar a integridade da barreira de ultrafiltração glomerular. Os podócitos são os principais componentes da barreira de filtração glomerular e alterações na morfologia de seus processos podais são uma característica comum das doenças renais. Os processos podais vizinhos são conectados por uma junção intercelular especializada conhecida como diafragma, que serve como barreira para regular a passagem de macromoléculas do plasma[100]. Um dos principais componentes do diafragma é a nefrina, uma proteína de adesão glomerular especializada que interage com outras proteínas dentro e fora da célula mantendo a estrutura e função da barreira de ultrafiltração glomerular. Além de seu papel estrutural, a nefrina também está envolvida na sinalização de podócitos[57]. Portanto, alterações na expressão e sinalização da nefrina podem levar a injúria da barreira de ultrafiltração glomerular e consequentemente ao comprometimento da função renal e proteinúria.

Interessantemente, nossos resultados mostram uma redução da expressão de nefrina nos animais obesos quando comparados ao controle o que indica comprometimento do processo de filtração glomerular. Este resultado está de acordo com nossos achados, principalmente com a albuminúria observada nos animais obesos. O tratamento com leptina não reverteu a perda de nefrina em relação aos animais obesos e não desempenhou papel renoprotetor em relação a este parâmetro. Provavelmente isso ocorreu porque nós utilizamos animais em idade adulta para iniciar o protocolo experimental e a perda de nefrina é uma alteração estrutural que ocorreu previamente ao tratamento com leptina.

Sabendo que a angiotensina II está associada à inflamação e fibrose [101] e pode levar a lesões na barreira de ultrafiltração glomerular [102] passamos a investigar o papel do sistema renina-angiotensina (SRA) nas alterações da função renal associada a obesidade observada em nosso modelo. Em vários modelos experimentais, a hiperleptinemia está associada ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS), hipertensão arterial [26; 27; 28; 29; 30] e atividade do sistema renina-angiotensina [32; 33; 34]. Além disso, o tecido adiposo sintetiza todos os

componentes do SRA e a síntese destes componentes é maior quanto maior a área deste tecido [45]. Sendo assim, analisamos a expressão gênica de componentes do SRA intra-renal nos grupos de 28 e 42 dias. Nossos resultados mostram aumento significativo da expressão de RNAm para angiotensinogênio nos animais obesos dos grupos de 28 e 42 dias e aumento da expressão de RNAm para renina no grupo de 42 dias. Como esses animais não possuem leptina circulante, é plausível sugerir uma participação direta do tecido adiposo na ativação do SRA intra-renal dos obesos.

Geralmente, pacientes ou modelos experimentais com doenças crônicas como diabetes, hipertensão, obesidade e DRC apresentam um quadro avançado de inflamação [103; 104]. A inflamação é uma resposta imediata do sistema imunológico frente às infecções e/ou injúria tecidual. Na injúria renal, há intenso processo inflamatório com, aumento na expressão de moléculas de adesão além do recrutamento de leucócitos [105] e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucinas 1 beta, 6 e 8 (IL-1β, IL-6, IL-8) e do fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), que sustentam a injúria renal [106]. Além disso, sabe-se que o tecido adiposo de indivíduos obesos produz citocinas pró inflamatórias que contribuem para um quadro de inflamação generalizada [10; 11]. Esta elevada produção de citocinas inflamatórias, pode contribuir para o desenvolvimento de um quadro inflamatório no tecido renal e, consequentemente, levar a injúria renal.

Nossos resultados confirmam o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNFα, IL6 e MCP-1) no tecido adiposo dos animais obesos no grupo de 42 dias. Observando estes resultados, podemos sugerir que o aumento do TNFα e das outras citocinas inflamatórias circulantes, nos animais obesos pode ter contribuído para o desencadeamento de uma resposta inflamatória no rim com consequente comprometimento da função renal.

De fato, apesar de não termos encontrados alterações na expressão de TNFα no tecido renal em ambos grupos, nossos resultados confirmam o processo inflamatório neste tecido, uma vez que os animais obesos, especialmente os do grupo de 42 dias, apresentaram significativo aumento da expressão de RNAm para IL-6 e MCP-1 e o tratamento com leptina não foi capaz de reverter este aumento. Estudos demonstraram que a leptina estimula a produção e liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, inclusive a IL6 em linfócitos B humanos [107] e em fibroblastos sinoviais humanos [108] de forma dose dependente. Além disso, como dito anteriormente, os animais *ob/ob* são mais sensíveis a leptina [73; 86], o que pode explicar o estimulo da produção de citocinas inflamatórias mesmo com tratamento em dose fisiológica de leptina. Portanto, o tratamento com leptina por 42 dias pode ter sustentado o aumento da expressão renal de IL-6 nos animais obesos.

A fibrose é uma alteração do processo normal de cicatrização e é caracterizada por lesão, ativação e migração de miofibroblastos e deposição e remodelação de matriz [109]. Assim, considerando que a inflamação sustentada pode ser um fator importante no desenvolvimento de fibrose, e que a fibrose é o desfecho de diversas nefropatias, incluindo a DRC, passamos a investigar a expressão gênica de componentes pró-fibróticos como α-SMA e colágenos I e III. Os miofibroblastos são um conjunto de fibroblastos "ativos" responsáveis pelo depósito de colágenos durante o desenvolvimento do processo fibrótico no tecido renal [110]. A principal característica dos miofibroblastos é a expressão de α-SMA e [111], por esse motivo, α-SMA é comumente utilizado como um marcador da transição de células epiteliais e endoteliais em miofibroblastos. Os colágenos são proteínas estruturais importantes para a constituição da matriz extracelular [110]. A produção exacerbada dos colágenos I e III contribui para a fibrose túbulo-intersticial e é característica comum para a progressão de doenças renais crônicas [112; 113; 114].

Nossos resultados indicam que os animais obesos dos grupos de 28 e 42 dias, apresentaram aumento da expressão de RNAm para α-SMA e o tratamento com leptina não corrigiu este parâmetro no grupo de 28 dias, mas reverteu no grupo de 42 dias, sugerindo um estado pró-fibrótico. Quanto aos colágenos, somente o grupo de 42 dias foi avaliado e os animais obesos apresentaram aumento na expressão de RNAm para colágeno I, sem interferência da leptina. Apesar dos resultados de expressão gênica mostrarem um estado pró-fibrótico, ao avaliarmos a expressão proteica de α-SMA não encontramos diferença entre os grupos. Além disso, avaliamos cortes histológicos corados pela técnica de tricromo de masson (resultado não mostrado) que evidencia expressão de colágeno e não encontramos diferença entre os grupos. Estes resultados nos mostraram que, em nosso modelo, a obesidade não levou a fibrose. Diante destes resultados julgamos pertinente investigar a morfologia renal e glomerular.

Alterações na morfologia glomerular estão associadas com diversas condições, como a glomeruloesclerose segmentar focal (GESF)[115], que podem levar a doenças renais. A obesidade esta associada a alterações estruturais, hemodinâmicas e metabólicas no rim e, consequentemente, torna-se um fator de risco para o desenvolvimento de doenças renais, como a glomerulopatia relacionada à obesidade[66]. A glomerulopatia relacionada à obesidade é caracterizada por glomerulomegalia, redução na densidade de podócitos, aumento da matriz mesangial e a GESF pode ou não estar associada a esta condição [66; 116]. Em nosso estudo, não encontramos alterações no peso do rim nos grupos de 28 e 42 dias, o que indica que não há hipertrofia renal nos animais obesos. Porém, ao avaliarmos a morfologia renal encontramos um

aumento da área glomerular nos animais obesos em relação ao controle do grupo experimental de 28 dias, que não se manteve no grupo de 42 dias. A evolução da glomerulopatia relacionada a obesidade acontece de forma lenta com progressiva proteinuria e perda da função renal, podendo culminar em doença renal terminal[66]. Um dos fatores associado a evolução e um pior desfecho da glomerulopatia relacionada à obesidade é a idade avançada[66; 67]. Desta forma, é possível que a progressão das alterações glomerulares encontradas em nosso modelo ocorra de forma lenta e gradual e que em idades mais avançadas estas alterações sejam mais pronunciadas. Porém, para confirmar esta hipótese seria necessário investigar os animais em idade mais avançada do que os utilizados no presente estudo.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a idade dos animais do grupo de 42 dias. Sabe-se que ao envelhecer camundongos C57BL6-J, machos e fêmeas, apresentam hipertrofia glomerular[117; 118]. Nossos resultados estão de acordo com estes dados da literatura, já que mostram que os animais do grupo controle magro do protocolo de 42 dias tem glomérulos maiores do que os controles do protocolo de 28 dias. Já nos animais obesos, a hipertrofia glomerular devido ao envelhecimento não parece ter acontecido no mesmo ritmo do que no grupo controle. Desta forma, não observamos diferença significativa na área glomerular dos animais controle e obesos do protocolo de 42 dias.

Apesar das diferenças em relação a área glomerular entre os grupos de 28 e 42 dias, nossos resultados indicam que o aumento da área glomerular nos camundongos obesos mais jovens, podem impactar a função renal destes animais em idade mais avançada. Além do aumento da área glomerular, nosso modelo experimental apresenta algumas características em comum com a glomerulopatia relacionada à obesidade como: proteinúria, redução da expressão de nefrina, o que indica redução na densidade de podócitos e ativação do SRA que pode contribuir para o agravamento da injúria renal[66; 67;119]. Porém, não observamos em nosso modelo fibrose ou glomeruloesclerose, levando em conta o aumento da área glomerular e a provável perda de podócitos, julgamos pertinente avaliar se a obesidade estimula a proliferação celular em glomérulos, já que na glomerulopatia relacionada à obesidade há expansão mesangial e proliferação de células mesangiais[116].

Ki67 é uma proteína nuclear não-histona, envolvida nas etapas iniciais da síntese de RNA ribossômico dependente de polimerase I. É expressa no núcleo da célula durante as fases do ciclo celular G1, S, G2 e M, mas não na fase G0 (quando a célula esta em estado quiescente), sendo que a célula atinge o nível máximo de expressão de Ki67 durante a mitose[120]. Por este motivo, o Ki67 é utilizado como marcador de proliferação celular. Interessantemente, nossos resultados mostram um aumento na expressão gênica de Ki67 no tecido renal dos animais

obesos do grupo de 42 dias quando comparados ao controle. O tratamento com leptina reduziu a expressão de Ki67 em relação aos animais obesos sem tratamento. Este resultado indica que há aumento da proliferação celular no rim dos animais obesos e que a leptina parece desempenhar papel renoprotetor.

Diante deste resultado, julgamos pertinente avaliar a proliferação celular glomerular no grupo experimental de 42 dias. Nos animais obesos houve um aumento na quantidade de núcleos celulares no glomérulo quando comparados com os animas controle, o tratamento com leptina não reduziu a quantidade de núcleos celulares de forma significativa em relação aos animais obesos sem tratamento. Este resultado confirma que no nosso modelo experimental, a obesidade estimulou a proliferação celular glomerular e não houve interferência do tratamento com leptina.

Como demonstrado anteriormente, nossos resultados indicam perda de nefrina e, consequentemente, de podócitos nos animais obesos. Diante dos resultados de proliferação celular nos glomérulos, avaliamos a marcação por imunofluorescência com Tumor de Wilms 1 (WT1) para confirmar a redução da densidade de podócitos em nosso modelo. O WT1 é um fator de transcrição que tem papel fundamental na nefrogênese e diferenciação de podócitos. No glomérulo maduro, a expressão de WT1 é restrito a podócitos[121], por este motivo o WT1 é utilizado como marcador desta células e pode ser utilizado para avaliar injuria podocitária[122]. Em nosso modelo experimental fizemos a colocalização dos núcleos marcados com DAPI (marcador de núcleos celulares) e WT1 e em seguida calculamos a razão DAPI/WT1. No grupo obeso houve redução da relação DAPI/WT1 e o tratamento com leptina não alterou este parâmetro em relação aos animais obesos. Desta forma, estes resultados confirmam a redução da densidade podocitária nos animas obesos, sem interferência do tratamento com leptina.

Estes resultados nos fizeram questionar se as células em proliferação nos glomérulos de animais obesos poderiam ser células mesangiais. Levando em consideração que nosso modelo tem muitas características em comum com a glomerulopatia associada a obesidade, e que nesta condição há expansão mesangial, seria pertinente investigar este parâmetro. De fato, este era nosso objetivo, porém, devido a pandemia de Sars-CoV-2 e as restrições de circulação impostas pela mesma, não foi possível realizar estes experimentos.

7 CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos resultados mostram que a obesidade dos camundongos *ob/ob* compromete a barreira de ultrafiltração glomerular e a função renal. Nos animais obesos há maior ativação do SRA intrarenal e maior liberação de citocinas inflamatórias sistêmicas, que por sua vez, estimulam a produção de fatores inflamatórios no rim. A inflamação do tecido renal contribui para injúrias que podem estar associadas a diversas doenças renais. Nosso modelo de obesidade tem muitas características em comum com a glomerulopatia associada a obesidade. Porém, não encontramos evidencias de fibrose ou glomeruloesclerose em nossos animais obesos, apesar de em camundongos mais jovens haver aumento da área glomerular que pode contribuir com as alterações renais observadas, mesmo em idade mais avançada. Nossos resultados também apontam que nos animais obesos houve proliferação celular no tecido renal como um todo e em glomérulos, o que pode indicar expansão mesangial, que também é uma característica da glomerulopatia associada a obesidade. Porém, para confirmar esta hipótese seriam necessários mais estudos.

O tratamento com leptina por 42 dias, por reduzir a massa de tecido adiposo, reduz a inflamação sistêmica e a ativação do SRA intrarenal e, portanto, tem papel renoprotetor neste processo. Porém, a leptina não foi capaz de reverter todos os parâmetros observados, portanto, mostrou-se parcialmente renoprotetora.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1 NCD-RisC. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. **Lancet (London, England)**, v. 390, n. 10113, 12/16/2017 2017. ISSN 1474-547X. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029897.

2 SAÚDE, M. D. **Vigilancia de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefonico (VIGITEL)**. Brasilia, DF, São Paulo 2007.

3 _____. **Vigilancia de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefonico (VIGITEL)**. Brasil 2019.

4 IBGE, M. D. S. E. M. D. P., ORÇAMENTO E GESTÃO. **Pesquisa Nacional de Saúde**. Rio de Janeiro 2015.

5 MAUER, M. et al. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. **N Engl J Med,** v. 361, n. 1, p. 40-51, Jul 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571282.

6 TERVAERT, T. W. *et al*. Pathologic classification of diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 4, p. 556-63, Apr 2010. ISSN 1533-3450. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167701.

7 ORGANIZATION, W. H. **Nutrition in universal health coverage.** Geneva, 2019.

8 PARK, A.; KIM, W. K.; BAE, K. H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World J Stem Cells**, v. 6, n. 1, p. 33-42, Jan 2014. ISSN 1948-0210. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567786.

9 LACASA, D. *et al*. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 868-77, Feb 2007. ISSN 0013-7227. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082259.

10 TESAURO, M. *et al*. Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: the role of leptin and adiponectin. **Int J Hypertens**, v. 2012, p. 943605, 2012. ISSN 2090-0392. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320148.

11 FELIZARDO, R. J. *et al*. Obesity in kidney disease: A heavyweight opponent. **World J Nephrol**, v. 3, n. 3, p. 50-63, Aug 2014. ISSN 2220-6124. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25332896.

12 GHIGLIOTTI, G. *et al*. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. **Inflammation**, v. 37, n. 4, p. 1337-53, Aug 2014. ISSN 1573-2576. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24823865.

13 YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 41-51, Jan 2007. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nri1995.

14 KAMBHAM, N. *et al*. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney Int**, v. 59, n. 4, p. 1498-509, Apr 2001. ISSN 0085-2538 (Print) 0085-2538. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590041498.x.

15 ZHANG, Y. *et al*. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236.

16 PHANISH, M. K.; WINN, S. K.; DOCKRELL, M. E. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. **Nephron Exp Nephrol**, v. 114, n. 3, p. e83-92, 2010. ISSN 1660-2129. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19955828.

17 KONUKOGLU, D.; SERIN, O.; ERCAN, M. Plasma leptin levels in obese and non-obese postmenopausal women before and after hormone replacement therapy. **Maturitas**, v. 36, n. 3, p. 203-7, Oct 2000. ISSN 0378-5122. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063902.

18 TARTAGLIA, L. A. The leptin receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 10, p. 6093-6, Mar 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9102398.

19 LAPORTE, S. A. *et al*. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 7, p. 3712-7, Mar 30 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: http://dx.doi.org/.

20 HOPFNER, R. L.; GOPALAKRISHNAN, V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. **Diabetologia**, v. 42, n. 12, p. 1383-94, Dec 1999. ISSN 0012-186X. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10651255.

21 BENIGNI, A. Defining the role of endothelins in renal pathophysiology on the basis of selective and unselective endothelin receptor antagonist studies. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 4, n. 4, p. 349-53, Jul 1995. ISSN 1062-4821 (Print)1062-4821 (Linking). Disponível em: http://dx.doi.org/.

22 HALPERIN, M. L. *et al*. Properties permitting the renal cortex to be the oxygen sensor for the release of erythropoietin: clinical implications. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 1, n. 5, p. 1049-53, Sep 2006. ISSN 1555-905X. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699326.

23 PAZ-FILHO, G. *et al*. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 56, n. 9, p. 597-607, Dec 2012. ISSN 0004-2730. Disponível em: http://dx.doi.org/.

24 BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Renal arginine metabolism. **J Nutr**, v. 134, n. 10 Suppl, p. 2791S-2795S; discussion 2796S-2797S, Oct 2004. ISSN 0022-3166. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15465786.

25 MONTANI, J. P. *et al*. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26 Suppl 2, p. S28-38, Sep 2002. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12174326.

26 SHEK, E. W.; BRANDS, M. W.; HALL, J. E. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. **Hypertension**, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 409-14, Jan 1998. ISSN 0194-911X. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453337.

27 AIZAWA, T. *et al*. Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats : possible role in renoprotection. **Hypertension**, v. 35, n. 3, p. 800-6, Mar 2000. ISSN 1524-4563. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720598.

28 DA SILVA, A. A. *et al*. The role of the sympathetic nervous system in obesity-related hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 11, n. 3, p. 206-11, Jun 2009. ISSN 1534-3111. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442330.

29 PRIOR, L. J. *et al*. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. **Hypertension**, v. 55, n. 4, p. 862-8, Apr 2010. ISSN 1524-4563. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194306.

30 RAHMOUNI, K. *et al*. Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1458-67, Apr 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317593.

31 WERNER, N.; NICKENIG, G. From fat fighter to risk factor: the zigzag trek of leptin. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 1, p. 7-9, Jan 2004. ISSN 1524-4636. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707035.

32 REISER, J.; SEVER, S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. **Annu Rev Med**, v. 64, p. 357-66, 2013. ISSN 0066-4219. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-050311-163340.

33 KOHAN, D. E. Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 19, n. 2, p. 134-9, Mar 2010. ISSN 1535-3842 (Electronic)1062-4821 (Linking). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1097/MNH.0b013e328335f91f.

34 KOHAN, D. E.; PADILLA, E. Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. **J Clin Invest**, v. 91, n. 3, p. 1235-40, Mar 1993. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738 (Linking). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1172/jci116286.

35 FAROOQI, I. S. *et al*. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J Clin Invest**, v. 110, n. 8, p. 1093-103, Oct 2002. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1172/jci15693.

36 SERRADEIL-LE GAL, C. *et al*. Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. **FEBS Lett**, v. 404, n. 2-3, p. 185-91, Mar 1997. ISSN 0014-5793. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9119061.

37 BEŁTOWSKI, J. *et al*. Chronic hyperleptinemia induces resistance to acute natriuretic and NO-mimetic effects of leptin. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 155-63, Jan 2010. ISSN 1873-5169. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854228.

38 AZARANI, A.; BOILEAU, G.; CRINE, P. Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby

canine kidney cells. **Biochem J**, v. 333 (Pt 2), p. 439-48, Jul 1998. ISSN 0264-6021. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657986.

39 WANG, Y.; MISHRA, R.; SIMONSON, M. S. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II stimulates c-fos transcription and DNA synthesis by a Src-based mechanism in glomerular mesangial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 1, p. 28-36, Jan 2003. ISSN 1046-6673. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506135.

40 TAKIZAWA, S. *et al*. Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract. **J Mol Endocrinol**, v. 35, n. 2, p. 201-9, Oct 2005. ISSN 0952-5041. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216902.

41 TOUYZ, R. M. *et al*. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 84, n. 5, p. 505-15, Mar 19 1999. ISSN 0009-7330 (Print)0009-7330 (Linking). Disponível em: http://dx.doi.org/.

42 EMILSSON, V. *et al*. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. **Diabetes**, v. 46, n. 2, p. 313-6, Feb 1997. ISSN 0012-1797. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000710.

43 MARTÍNEZ-GARCÍA, C. *et al*. Accelerated renal disease is associated with the development of metabolic syndrome in a glucolipotoxic mouse model. **Dis Model Mech**, v. 5, n. 5, p. 636-48, Sep 2012. ISSN 1754-8411. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773754.

44 STACCHIOTTI, A. *et al*. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111141, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25347680.

45 KIM, S. *et al*. The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system. **J Biomed Biotechnol**, v. 2006, n. 5, p. 27012, 2006. ISSN 1110-7243 (Print)1110-7243. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/jbb/2006/27012.

46 JG, O.; E, R. Anti-hypertensive drug treatment of patients with and the metabolic syndrome and obesity: a review of evidence, meta-analysis, post hoc and guidelines publications. **Current hypertension reports**, v. 17, n. 6, 2015 Jun 2015. ISSN 1534-3111. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25916862.

47 F, M. *et al*. ACE inhibition is renoprotective among obese patients with proteinuria. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 22, n. 6, 2011 Jun 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527660.

48 BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J Mol Med (Berl)**, v. 86, n. 6, p. 615-21, Jun 2008. ISSN 0946-2716 (Print)0946-2716 (Linking). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s00109-008-0336-0.

49 NAVAR, L. G. *et al*. Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 2, p. S176-S184, Mar 2001. ISSN 1752-8976 (Electronic)1470-3203 (Linking). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1177/14703203010020013001.

[50] VIDOTTI, D. B. *et al*. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, n. 6, p. F1039-45, Jun 2004. ISSN 1931-857X. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722017.

[51] LIEBAU, M. C. *et al*. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 290, n. 3, p. F710-9, Mar 2006. ISSN 1931-857X. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189286.

[52] ATTIA, Y. M. *et al*. Telmisartan, an AT1 receptor blocker and a PPAR gamma activator, alleviates liver fibrosis induced experimentally by Schistosoma mansoni infection. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 199, 2013. ISSN 1756-3305. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829789.

[53] A, T. *et al*. Angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates proteinuria in puromycin aminonucleoside nephropathy by inhibiting the reduction of NEPH1 and nephrin. **Journal of nephrology**, v. 27, n. 6, 2014 Dec 2014. ISSN 1724-6059. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25298195.

[54] A, F. *et al*. Effects of mineralocorticoid and angiotensin II receptor blockers on proteinuria and glomerular podocyte protein expression in a model of minimal change nephrotic syndrome. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 15, n. 3, 2010 Apr 2010. ISSN 1440-1797. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470301.

55 C, Z. *et al*. Adding a statin to a combination of ACE inhibitor and ARB normalizes proteinuria in experimental diabetes, which translates into full renoprotection. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 299, n. 5, 2010 Nov 2010. ISSN 1522-1466. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719975.

56 ZHU, J. J. *et al*. Aldosterone is involved in the pathogenesis of obesity-related glomerulopathy through activation of Wnt/β-catenin signaling in podocytes. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 3, p. 4589-4598, 2021. ISSN 1791-2997. Disponível em: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8386/abstract. Disponível em: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8386/download.

57 GARG, P. A Review of Podocyte Biology. **Am J Nephrol**, v. 47 Suppl 1, p. 3-13, 2018. ISSN 1421-9670. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29852492.

58 CHUANG, P. Y.; HE, J. C. **Signaling in regulation of podocyte phenotypes**. Nephron Physiol. Switzerland: 2009 S. Karger AG, Basel. 111**:** p9-15 p. 2009.

59 CE, M.; N, J. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, 06/05/2018 2018. ISSN 1664-2392. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29922234.

60 SCOTT, R. P.; QUAGGIN, S. E. Review series: The cell biology of renal filtration. **J Cell Biol**, v. 209, n. 2, p. 199-210, Apr 2015. ISSN 1540-8140. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918223.

61 DURVASULA, R. V.; SHANKLAND, S. J. Podocyte injury and targeting therapy: an update. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 15, n. 1, p. 1-7, Jan 2006. ISSN 1062-4821. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340659.

62 SCHELL, C.; HUBER, T. B. The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, n. 11, p. 3166-3174, Nov 2017. ISSN 1533-3450. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864466.

63 CAREY, R. M. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *In*: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.45, 2005. p.840-4. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

64 MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 12, p. 3005-15, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221.

65 PADIA, S. H. *et al*. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. *In*: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.47, 2006. p.537-44. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

66 QUACK, I. *et al*. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 38, p. 14110-5, Sep 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968782.

67 Y, W. *et al*. Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **Kidney international**, v. 73, n. 1, 2008 Jan 2008. ISSN 0085-2538. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928825.

68 TSUBOI, N. *et al*. The Renal Pathology of Obesity. *In*: (Ed.). **Kidney Int Rep**, v.2, 2017. p.251-60. ISBN 2468-0249 (Electronic).

69 N, T. *et al*. Clinical features and long-term renal outcomes of Japanese patients with obesity-related glomerulopathy. **Clinical and experimental nephrology**, v. 17, n. 3, 2013 Jun 2013. ISSN 1437-7799. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135866.

70 PRAGA, M. *et al*. Clinical features and long-term outcome of obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n. 9, p. 1790-1798, 2021. ISSN 0931-0509. Disponível em: https://academic.oup.com/ndt/article-pdf/16/9/1790/23371013/161790.pdf.

71 JB, H. *et al*. Glomerular Aging and Focal Global Glomerulosclerosis: A Podometric Perspective. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 26, n. 12, 2015 Dec 2015. ISSN 1533-3450. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038526.

72 VA, L. *et al*. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. **Lancet (London, England)**, v. 382, n. 9888, 07/20/2013 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727166.

73 D, S. *et al*. Simple obesity and renal function. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 68, n. 2, 2017 Apr 2017. ISSN 1899-1505. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28614766.

74 M, N. D. Consequences of morbid obesity on the kidney. Where are we going? **Clinical kidney journal**, v. 9, n. 6, 2016 Dec 2016. ISSN 2048-8505. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27994854.

75 HARRIS, R. B. *et al*. A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. **Endocrinology**, v. 139, n. 1, p. 8-19, Jan 1998. ISSN 0013-7227. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421392.

76 RIBEIRO, A. C. *et al*. Contrasting effects of leptin on food anticipatory and total locomotor activity. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23364, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21853117.

77 AH, F. *et al*. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **CSH protocols**, v. 2008, 05/01/2008 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356829.

78 DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sci**, v. 152, p. 244-8, May 2016. ISSN 1879-0631. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596563.

79 FRÜHBECK, G. *et al*. Normalization of adiponectin concentrations by leptin replacement in ob/ob mice is accompanied by reductions in systemic oxidative stress and inflammation. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2752, Jun 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28584304.

80 KHAN, A. *et al*. Long-term leptin treatment of ob/ob mice improves glucose-induced insulin secretion. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, n. 6, p. 816-21, Jun 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439295.

81 MUZZIN, P. *et al*. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14804-8, Dec 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8962136.

82 SZABADFI, K. *et al*. Neuropeptides, trophic factors, and other substances providing morphofunctional and metabolic protection in experimental models of diabetic retinopathy. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 311, p. 1-121, 2014. ISSN 1937-6448. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952915.

83 HUMMEL, K. P., COLEMAN, D.L., LANE, P.W. The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL/KsJ and C57BL/6J strains | SpringerLink. **Biochemical Genetics**, v. Volume 7, n. Issue 1, p. 1–13, 1972. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/BF00487005.

84 COLEMAN, D. L.; HUMMEL, K. P. The influence of genetic background on the expression of the obese (ob) gene in the mouse | SpringerLink. **Diabetologia**, v. Volume 9, n. Issue 4, p. 287–293, 1973. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/BF01221856#citeas.

85 THIEME, K. *et al*. EP4 inhibition attenuates the development of diabetic and non-diabetic experimental kidney disease. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 3442, Jun 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28611444.

86 FEITOSA, A. C.; ANDRADE, F. S. [Evaluation of fructosamine as a parameter of blood glucose control in diabetic pregnant women]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 58, n. 7, p. 724-30, Oct 2014. ISSN 1677-9487. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25372581.

87 D'SOUZA, A. M. *et al*. The glucoregulatory actions of leptin. **Mol Metab**, v. 6, n. 9, p. 1052-1065, 09 2017. ISSN 2212-8778. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28951828.

88 MA, D. F. *et al*. Sensitivity of ob/ob mice to leptin-induced adipose tissue apoptosis. **Obesity research**, v. 13, n. 9, 2005 Sep 2005. ISSN 1071-7323. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222056.

89 WICKMAN, C.; KRAMER, H. Obesity and kidney disease: potential mechanisms. **Semin Nephrol**, v. 33, n. 1, p. 14-22, Jan 2013. ISSN 1558-4488. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374890.

90 KRIKKEN, J. A. *et al*. The effect of a shift in sodium intake on renal hemodynamics is determined by body mass index in healthy young men. **Kidney Int**, v. 71, n. 3, p. 260-5, Feb 2007. ISSN 0085-2538. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17091123.

91 CHAGNAC, A. *et al*. Glomerular hemodynamics in severe obesity. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 278, n. 5, p. F817-22, May 2000. ISSN 1931-857X. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807594.

92 AIRES, M. D. M. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

93 GOWDA, S. *et al*. Markers of renal function tests. **N Am J Med Sci**, v. 2, n. 4, p. 170-3, Apr 2010. ISSN 2250-1541 (Print)1947-2714. Disponível em: http://dx.doi.org/.

[94] KLEIN, J. D.; BLOUNT, M. A.; SANDS, J. M. Urea transport in the kidney. **Compr Physiol**, v. 1, n. 2, p. 699-729, Apr 2011. ISSN 2040-4603. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23737200.

[95] J, T. *et al*. How to measure renal function in clinical practice. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 333, n. 7571, 10/07/2006 2006. ISSN 1756-1833. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023465.

[96] STEVENS, L. A.; LEVEY, A. S. Measurement of kidney function. **Med Clin North Am**, v. 89, n. 3, p. 457-73, May 2005. ISSN 0025-7125. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755462.

[97] PARR, S. K. *et al*. Acute kidney injury is a risk factor for subsequent proteinuria. **Kidney Int**, v. 93, n. 2, p. 460-469, 02 2018. ISSN 1523-1755. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28927644.

[98] RODRIGUEZ-ROMO, R. *et al*. AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. **Kidney Int**, Oct 28 2015. ISSN 0085-2538. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.320.

[99] BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO Mol Med**, v. 2, n. 7, p. 247-57, Jul 2010. ISSN 1757-4684. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597104.

100 DO CARMO, J. M. *et al*. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 3, p. R803-12, Sep 2009. ISSN 1522-1490. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19605765.

101 PECOITS-FILHO, R. *et al*. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. **Am J Kidney Dis**, v. 41, n. 6, p. 1212-8, Jun 2003. ISSN 0272-6386. Disponível em: http://dx.doi.org/.

102 ZHANG, W. *et al*. Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage. **Hypertension**, v. 59, n. 1, p. 136-44, Jan 2012. ISSN 0194-911x. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.111.173328.

103 BONVENTRE, J. V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int**, v. 66, n. 2, p. 480-5, Aug 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253693.

104 GLYNNE, P. A.; PICOT, J.; EVANS, T. J. Coexpressed nitric oxide synthase and apical beta(1) integrins influence tubule cell adhesion after cytokine-induced injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 11, p. 2370-83, Nov 2001. ISSN 1046-6673 (Print)1046-6673. Disponível em: http://dx.doi.org/.

105 AGRAWAL, S. *et al*. Leptin Activates Human B Cells to Secrete TNF-α, IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 Signaling Pathway. *In*: (Ed.). **J Clin Immunol**, v.31, 2011. p.472-8. ISBN 0271-9142 (Print)1573-2592 (Electronic).

106 YANG, W. H. *et al*. Leptin induces IL-6 expression through OBRl receptor signaling pathway in human synovial fibroblasts. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75551, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075551.

107 HUMPHREYS, B. D. Mechanisms of Renal Fibrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 80, p. 309-326, Feb 2018. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-022516-034227.

108 KLINGBERG, F.; HINZ, B.; WHITE, E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. **J Pathol**, v. 229, n. 2, p. 298-309, Jan 2013. ISSN 1096-9896. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996908.

109 RAO K, B. *et al*. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 4, p. ZC14-7, Apr 2014. ISSN 2249-782X. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959509.

110 MENN-JOSEPHY, H. *et al*. Renal Interstitial Fibrosis: An Imperfect Predictor of Kidney Disease Progression in Some Patient Cohorts. **Am J Nephrol**, v. 44, n. 4, p. 289-299, 2016. ISSN 1421-9670. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27626625.

111 BUCHTLER, S. *et al*. Cellular Origin and Functional Relevance of Collagen I Production in the Kidney. **J Am Soc Nephrol**, v. 29, n. 7, p. 1859-1873, Jul 2018. ISSN 1533-3450. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29777019.

112 YANG, J. *et al*. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **J Clin Invest**, v. 110, n. 10, p. 1525-38, Nov 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438450.

113 MEYRIER, A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 1, n. 1, p. 44-54, Nov 2005. ISSN 1745-8323. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932363.

114 M, C. *et al*. Obesity-related glomerulopathy and podocyte injury: a mini review. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, 01/01/2012 2012. ISSN 1945-0508. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201936.

115 F, Z. *et al*. Resistance to glomerulosclerosis in B6 mice disappears after menopause. **The American journal of pathology**, v. 162, n. 4, 2003 Apr 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651625.

116 Z, F. *et al*. Glomerular aging in females is a multi-stage reversible process mediated by phenotypic changes in progenitors. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 2, 2005 Aug 2005. ISSN 0002-9440. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16049323.

117 S, Y. *et al*. Obesity-Related Glomerulopathy: A Latent Change in Obesity Requiring More Attention. **Kidney & blood pressure research**, v. 45, n. 4, 2020 2020. ISSN 1423-0143. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32498064.

118 F, P.-L.; N, R.-R. Ki67 assessment in breast cancer: an update. **Pathology**, v. 49, n. 2, 2017 Feb 2017. ISSN 1465-3931. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28065411.

119 S, M. *et al*. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. **Development (Cambridge, England)**, v. 119, n. 4, 1993 Dec 1993. ISSN 0950-1991. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306891.

120 J, S. *et al*. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte marker. **Diabetes research and clinical practice**, v. 87, n. 2, 2010 Feb 2010. ISSN 1872-8227. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969384.

1 Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. **Lancet (London, England),** v. 390, n. 10113, 12/16/2017 2017. ISSN 1474-547X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029897 >.

2 SAÚDE, M. D. **Vigilancia de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefonico (VIGITEL)**. Brasilia, DF, São Paulo 2007.

3 _____. **Vigilancia de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefonico (VIGITEL)**. Brasil 2019.

4 IBGE, M. D. S. E. M. D. P., ORÇAMENTO E GESTÃO. **Pesquisa Nacional de Saúde**. Rio de Janeiro 2015.

5 MAUER, M. et al. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. **N Engl J Med,** v. 361, n. 1, p. 40-51, Jul 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571282 >.

6 TERVAERT, T. W. et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol,** v. 21, n. 4, p. 556-63, Apr 2010. ISSN 1533-3450. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167701 >.

7 ORGANIZATION, W. H. **Nutrition in universal health coverage.** Geneva 2019.

8 PARK, A.; KIM, W. K.; BAE, K. H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World J Stem Cells,** v. 6, n. 1, p. 33-42, Jan 2014. ISSN 1948-0210. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567786 >.

9 LACASA, D. et al. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. **Endocrinology,** v. 148, n. 2, p. 868-77, Feb 2007. ISSN 0013-7227. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082259 >.

10 TESAURO, M. et al. Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: the role of leptin and adiponectin. **Int J Hypertens,** v. 2012, p. 943605, 2012. ISSN 2090-0392. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320148 >.

11 FELIZARDO, R. J. et al. Obesity in kidney disease: A heavyweight opponent. **World J Nephrol,** v. 3, n. 3, p. 50-63, Aug 2014. ISSN 2220-6124. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25332896 >.

12 GHIGLIOTTI, G. et al. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. **Inflammation,** v. 37, n. 4, p. 1337-53, Aug 2014. ISSN 1573-2576. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24823865 >.

13 YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 1, p. 41-51, Jan 2007. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/nri1995 >.

14 KAMBHAM, N. et al. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney Int,** v. 59, n. 4, p. 1498-509, Apr 2001. ISSN 0085-2538 (Print)0085-2538. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590041498.x >.

15 ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature,** v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236 >.

16 PHANISH, M. K.; WINN, S. K.; DOCKRELL, M. E. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. **Nephron Exp Nephrol,** v. 114, n. 3, p. e83-92, 2010. ISSN 1660-2129. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19955828 >.

17 KONUKOGLU, D.; SERIN, O.; ERCAN, M. Plasma leptin levels in obese and non-obese postmenopausal women before and after hormone replacement therapy. **Maturitas,** v. 36, n.

3, p. 203-7, Oct 2000. ISSN 0378-5122. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063902 >.

18 TARTAGLIA, L. A. The leptin receptor. **J Biol Chem,** v. 272, n. 10, p. 6093-6, Mar 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9102398 >.

19 LAPORTE, S. A. et al. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 7, p. 3712-7, Mar 30 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

20 HOPFNER, R. L.; GOPALAKRISHNAN, V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. **Diabetologia,** v. 42, n. 12, p. 1383-94, Dec 1999. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10651255 >.

21 BENIGNI, A. Defining the role of endothelins in renal pathophysiology on the basis of selective and unselective endothelin receptor antagonist studies. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 4, n. 4, p. 349-53, Jul 1995. ISSN 1062-4821 (Print)1062-4821 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

22 HALPERIN, M. L. et al. Properties permitting the renal cortex to be the oxygen sensor for the release of erythropoietin: clinical implications. **Clin J Am Soc Nephrol,** v. 1, n. 5, p. 1049-53, Sep 2006. ISSN 1555-905X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699326 >.

23 PAZ-FILHO, G. et al. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 56, n. 9, p. 597-607, Dec 2012. ISSN 0004-2730. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

24 BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Renal arginine metabolism. **J Nutr,** v. 134, n. 10 Suppl, p. 2791S-2795S; discussion 2796S-2797S, Oct 2004. ISSN 0022-3166. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15465786 >.

25 MONTANI, J. P. et al. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 26 Suppl 2, p. S28-38, Sep 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12174326 >.

26 SHEK, E. W.; BRANDS, M. W.; HALL, J. E. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. **Hypertension,** v. 31, n. 1 Pt 2, p. 409-14, Jan 1998. ISSN 0194-911X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453337 >.

27 AIZAWA, T. et al. Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats : possible role in renoprotection. **Hypertension,** v. 35, n. 3, p. 800-6, Mar 2000. ISSN 1524-4563. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720598 >.

28 DA SILVA, A. A. et al. The role of the sympathetic nervous system in obesity-related hypertension. **Curr Hypertens Rep,** v. 11, n. 3, p. 206-11, Jun 2009. ISSN 1534-3111. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442330 >.

29 PRIOR, L. J. et al. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. **Hypertension,** v. 55, n. 4, p. 862-8, Apr 2010. ISSN 1524-4563. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194306 >.

30 RAHMOUNI, K. et al. Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. **J Clin Invest,** v. 118, n. 4, p. 1458-67, Apr 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317593 >.

31 WERNER, N.; NICKENIG, G. From fat fighter to risk factor: the zigzag trek of leptin. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 24, n. 1, p. 7-9, Jan 2004. ISSN 1524-4636. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707035 >.

32 REISER, J.; SEVER, S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. **Annu Rev Med,** v. 64, p. 357-66, 2013. ISSN 0066-4219. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-050311-163340 >.

33 KOHAN, D. E. Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 19, n. 2, p. 134-9, Mar 2010. ISSN 1535-3842 (Electronic)1062-4821 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1097/MNH.0b013e328335f91f >.

34 KOHAN, D. E.; PADILLA, E. Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. **J Clin Invest,** v. 91, n. 3, p. 1235-40, Mar 1993. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1172/jci116286 >.

35 FAROOQI, I. S. et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J Clin Invest,** v. 110, n. 8, p. 1093-103, Oct 2002. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1172/jci15693 >.

36 SERRADEIL-LE GAL, C. et al. Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. **FEBS Lett,** v. 404, n. 2-3, p. 185-91, Mar 1997. ISSN 0014-5793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9119061 >.

37 BEŁTOWSKI, J. et al. Chronic hyperleptinemia induces resistance to acute natriuretic and NO-mimetic effects of leptin. **Peptides,** v. 31, n. 1, p. 155-63, Jan 2010. ISSN 1873-5169. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854228 >.

38 AZARANI, A.; BOILEAU, G.; CRINE, P. Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby canine kidney cells. **Biochem J,** v. 333 (Pt 2), p. 439-48, Jul 1998. ISSN 0264-6021. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657986 >.

39 WANG, Y.; MISHRA, R.; SIMONSON, M. S. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II stimulates c-fos transcription and DNA synthesis by a Src-based mechanism in glomerular mesangial cells. **J Am Soc Nephrol,** v. 14, n. 1, p. 28-36, Jan 2003. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506135 >.

40 TAKIZAWA, S. et al. Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract. **J Mol Endocrinol,** v. 35, n. 2, p. 201-9, Oct 2005. ISSN 0952-5041. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216902 >.

41 TOUYZ, R. M. et al. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. **Circ Res,** v. 84, n. 5, p. 505-15, Mar 19 1999. ISSN 0009-7330 (Print)0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

42 EMILSSON, V. et al. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. **Diabetes,** v. 46, n. 2, p. 313-6, Feb 1997. ISSN 0012-1797. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000710 >.

43 MARTÍNEZ-GARCÍA, C. et al. Accelerated renal disease is associated with the development of metabolic syndrome in a glucolipotoxic mouse model. **Dis Model Mech,** v. 5, n. 5, p. 636-48, Sep 2012. ISSN 1754-8411. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773754 >.

44 STACCHIOTTI, A. et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. **PLoS One,** v. 9, n. 10, p. e111141, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25347680 >.

45 KIM, S. et al. The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system. **J Biomed Biotechnol,** v. 2006, n. 5, p. 27012, 2006. ISSN 1110-7243 (Print)1110-7243. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/jbb/2006/27012 >.

46 JG, O.; E, R. Anti-hypertensive drug treatment of patients with and the metabolic syndrome and obesity: a review of evidence, meta-analysis, post hoc and guidelines publications. **Current hypertension reports,** v. 17, n. 6, 2015 Jun 2015. ISSN 1534-3111. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25916862 >.

47 F, M. et al. ACE inhibition is renoprotective among obese patients with proteinuria. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN,** v. 22, n. 6, 2011 Jun 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527660 >.

48 BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J Mol Med (Berl),** v. 86, n. 6, p. 615-21, Jun 2008. ISSN 0946-2716 (Print)0946-2716 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00109-008-0336-0 >.

49 NAVAR, L. G. et al. Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst,** v. 2, p. S176-S184, Mar 2001. ISSN 1752-8976 (Electronic)1470-3203 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1177/14703203010020013001 >.

50 VIDOTTI, D. B. et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 286, n. 6, p. F1039-45, Jun 2004. ISSN 1931-857X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722017 >.

51 LIEBAU, M. C. et al. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 290, n. 3, p. F710-9, Mar 2006. ISSN 1931-857X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189286 >.

52 ATTIA, Y. M. et al. Telmisartan, an AT1 receptor blocker and a PPAR gamma activator, alleviates liver fibrosis induced experimentally by Schistosoma mansoni infection. **Parasit Vectors,** v. 6, p. 199, 2013. ISSN 1756-3305. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829789 >.

53 A, T. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates proteinuria in puromycin aminonucleoside nephropathy by inhibiting the reduction of NEPH1 and nephrin. **Journal of nephrology,** v. 27, n. 6, 2014 Dec 2014. ISSN 1724-6059. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25298195 >.

54 A, F. et al. Effects of mineralocorticoid and angiotensin II receptor blockers on proteinuria and glomerular podocyte protein expression in a model of minimal change nephrotic syndrome. **Nephrology (Carlton, Vic.),** v. 15, n. 3, 2010 Apr 2010. ISSN 1440-1797. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470301 >.

55 C, Z. et al. Adding a statin to a combination of ACE inhibitor and ARB normalizes proteinuria in experimental diabetes, which translates into full renoprotection. **American journal of physiology. Renal physiology,** v. 299, n. 5, 2010 Nov 2010. ISSN 1522-1466. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719975 >.

56 ZHU, J. J. et al. Aldosterone is involved in the pathogenesis of obesity-related glomerulopathy through activation of Wnt/β-catenin signaling in podocytes. **Molecular Medicine Reports,** v. 17, n. 3, p. 4589-4598, 2021. ISSN 1791-2997. Disponível em: < http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8386/abstract >.Disponível em: < http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8386/download >.

57 GARG, P. A Review of Podocyte Biology. **Am J Nephrol,** v. 47 Suppl 1, p. 3-13, 2018. ISSN 1421-9670. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29852492 >.

58 CHUANG, P. Y.; HE, J. C. **Signaling in regulation of podocyte phenotypes**. Nephron Physiol. Switzerland: 2009 S. Karger AG, Basel. 111**:** p9-15 p. 2009.

59 DURVASULA, R. V.; SHANKLAND, S. J. Podocyte injury and targeting therapy: an update. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 15, n. 1, p. 1-7, Jan 2006. ISSN 1062-4821. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340659 >.

60 CAREY, R. M. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. In: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.45, 2005. p.840-4. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

61 SCHELL, C.; HUBER, T. B. The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. **J Am Soc Nephrol,** v. 28, n. 11, p. 3166-3174, Nov 2017. ISSN 1533-3450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864466 >.

62 MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol,** v. 13, n. 12, p. 3005-15, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221 >.

63 PADIA, S. H. et al. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. In: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.47, 2006. p.537-44. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

64 QUACK, I. et al. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 103, n. 38, p. 14110-5, Sep 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968782 >.

65 Y, W. et al. Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **Kidney international,** v. 73, n. 1, 2008 Jan 2008. ISSN 0085-2538. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928825 >.

66 TSUBOI, N. et al. The Renal Pathology of Obesity. In: (Ed.). **Kidney Int Rep**, v.2, 2017. p.251-60. ISBN 2468-0249 (Electronic).

67 N, T. et al. Clinical features and long-term renal outcomes of Japanese patients with obesity-related glomerulopathy. **Clinical and experimental nephrology,** v. 17, n. 3, 2013 Jun 2013. ISSN 1437-7799. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135866 >.

68 PRAGA, M. et al. Clinical features and long-term outcome of obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology Dialysis Transplantation,** v. 16, n. 9, p. 1790-1798, 2021. ISSN 0931-0509. Disponível em: < https://academic.oup.com/ndt/article-pdf/16/9/1790/23371013/161790.pdf >.

69 JB, H. et al. Glomerular Aging and Focal Global Glomerulosclerosis: A Podometric Perspective. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN,** v. 26, n. 12, 2015 Dec 2015. ISSN 1533-3450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038526 >.

70 VA, L. et al. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. **Lancet (London, England),** v. 382, n. 9888, 07/20/2013 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727166 >.

71 D, S. et al. Simple obesity and renal function. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society,** v. 68, n. 2, 2017 Apr 2017. ISSN 1899-1505. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28614766 >.

72 M, N. D. Consequences of morbid obesity on the kidney. Where are we going? **Clinical kidney journal,** v. 9, n. 6, 2016 Dec 2016. ISSN 2048-8505. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27994854 >.

73 HARRIS, R. B. et al. A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. **Endocrinology,** v. 139, n. 1, p. 8-19, Jan 1998. ISSN 0013-7227. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421392 >.

74 RIBEIRO, A. C. et al. Contrasting effects of leptin on food anticipatory and total locomotor activity. **PLoS One,** v. 6, n. 8, p. e23364, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21853117 >.

75 AH, F. et al. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **CSH protocols,** v. 2008, 05/01/2008 2008. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356829 >.

76 DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sci,** v. 152, p. 244-8, May 2016. ISSN 1879-0631. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596563 >.

77 FRÜHBECK, G. et al. Normalization of adiponectin concentrations by leptin replacement in ob/ob mice is accompanied by reductions in systemic oxidative stress and inflammation. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 2752, Jun 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28584304 >.

78 KHAN, A. et al. Long-term leptin treatment of ob/ob mice improves glucose-induced insulin secretion. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 25, n. 6, p. 816-21, Jun 2001. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439295 >.

79 MUZZIN, P. et al. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 93, n. 25, p. 14804-8, Dec 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8962136 >.

80 SZABADFI, K. et al. Neuropeptides, trophic factors, and other substances providing morphofunctional and metabolic protection in experimental models of diabetic retinopathy. **Int Rev Cell Mol Biol,** v. 311, p. 1-121, 2014. ISSN 1937-6448. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952915 >.

81 HUMMEL, K. P., COLEMAN, D.L., LANE, P.W. The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL/KsJ and C57BL/6J strains | SpringerLink. **Biochemical Genetics,** v. Volume 7, n. Issue 1, p. 1–13, 1972. Disponível em: < https://link.springer.com/article/10.1007/BF00487005 >.

82 COLEMAN, D. L.; HUMMEL, K. P. The influence of genetic background on the expression of the obese (ob) gene in the mouse | SpringerLink. **Diabetologia,** v. Volume 9, n. Issue 4, p. 287–293, 1973. Disponível em: < https://link.springer.com/article/10.1007/BF01221856#citeas >.

83 THIEME, K. et al. EP4 inhibition attenuates the development of diabetic and non-diabetic experimental kidney disease. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 3442, Jun 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28611444 >.

84 FEITOSA, A. C.; ANDRADE, F. S. [Evaluation of fructosamine as a parameter of blood glucose control in diabetic pregnant women]. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 58, n. 7, p. 724-30, Oct 2014. ISSN 1677-9487. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25372581 >.

85 D'SOUZA, A. M. et al. The glucoregulatory actions of leptin. **Mol Metab,** v. 6, n. 9, p. 1052-1065, 09 2017. ISSN 2212-8778. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28951828 >.

86 MA, D.-F. et al. Sensitivity of ob/ob mice to leptin-induced adipose tissue apoptosis. **Obesity research,** v. 13, n. 9, 2005 Sep 2005. ISSN 1071-7323. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222056 >.

87 WICKMAN, C.; KRAMER, H. Obesity and kidney disease: potential mechanisms. **Semin Nephrol,** v. 33, n. 1, p. 14-22, Jan 2013. ISSN 1558-4488. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374890 >.

88 KRIKKEN, J. A. et al. The effect of a shift in sodium intake on renal hemodynamics is determined by body mass index in healthy young men. **Kidney Int,** v. 71, n. 3, p. 260-5, Feb 2007. ISSN 0085-2538. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17091123 >.

89 CHAGNAC, A. et al. Glomerular hemodynamics in severe obesity. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 278, n. 5, p. F817-22, May 2000. ISSN 1931-857X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807594 >.

90 AIRES, M. D. M. **Fisiologia**. 5°ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2018. 1376

91 GOWDA, S. et al. Markers of renal function tests. **N Am J Med Sci,** v. 2, n. 4, p. 170-3, Apr 2010. ISSN 2250-1541 (Print)1947-2714. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

92 KLEIN, J. D.; BLOUNT, M. A.; SANDS, J. M. Urea transport in the kidney. **Compr Physiol,** v. 1, n. 2, p. 699-729, Apr 2011. ISSN 2040-4603. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23737200 >.

93 J, T. et al. How to measure renal function in clinical practice. **BMJ (Clinical research ed.),** v. 333, n. 7571, 10/07/2006 2006. ISSN 1756-1833. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023465 >.

94 STEVENS, L. A.; LEVEY, A. S. Measurement of kidney function. **Med Clin North Am,** v. 89, n. 3, p. 457-73, May 2005. ISSN 0025-7125. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755462 >.

95 PARR, S. K. et al. Acute kidney injury is a risk factor for subsequent proteinuria. **Kidney Int,** v. 93, n. 2, p. 460-469, 02 2018. ISSN 1523-1755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28927644 >.

96 RODRIGUEZ-ROMO, R. et al. AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. **Kidney Int**, Oct 28 2015. ISSN 0085-2538. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.320 >.

97 H, H. et al. Evidence indicating that renal tubular metabolism of leptin is mediated by megalin but not by the leptin receptors. **Endocrinology,** v. 145, n. 8, 2004 Aug 2004. ISSN 0013-7227. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131016 >.

98 R, N.; EI, C.; H, B. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. **Kidney international,** v. 89, n. 1, 2016 Jan 2016. ISSN 1523-1755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26759048 >.

99 JF, B. et al. Acute leptin exposure reduces megalin expression and upregulates TGFβ1 in cultured renal proximal tubule cells. **Molecular and cellular endocrinology,** v. 401, 02/05/2015 2015. ISSN 1872-8057. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25478926 >.

100 CE, M.; N, J. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. **Frontiers in endocrinology,** v. 9, 06/05/2018 2018. ISSN 1664-2392. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29922234 >.

101 BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO Mol Med,** v. 2, n. 7, p. 247-57, Jul 2010. ISSN 1757-4684. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597104 >.

102 DO CARMO, J. M. et al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 297, n. 3, p. R803-12, Sep 2009. ISSN 1522-1490. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19605765 >.

103 PECOITS-FILHO, R. et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. **Am J Kidney Dis,** v. 41, n. 6, p. 1212-8, Jun 2003. ISSN 0272-6386. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

104 ZHANG, W. et al. Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage. **Hypertension,** v. 59, n. 1, p. 136-44, Jan 2012. ISSN 0194-911x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.111.173328 >.

105 BONVENTRE, J. V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int,** v. 66, n. 2, p. 480-5, Aug 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253693 >.

106 GLYNNE, P. A.; PICOT, J.; EVANS, T. J. Coexpressed nitric oxide synthase and apical beta(1) integrins influence tubule cell adhesion after cytokine-induced injury. **J Am Soc Nephrol,** v. 12, n. 11, p. 2370-83, Nov 2001. ISSN 1046-6673 (Print)1046-6673. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

107 AGRAWAL, S. et al. Leptin Activates Human B Cells to Secrete TNF-α, IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 Signaling Pathway. In: (Ed.). **J Clin Immunol**, v.31, 2011. p.472-8. ISBN 0271-9142 (Print)1573-2592 (Electronic).

108 YANG, W. H. et al. Leptin induces IL-6 expression through OBRl receptor signaling pathway in human synovial fibroblasts. **PLoS One,** v. 8, n. 9, p. e75551, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075551 >.

109 HUMPHREYS, B. D. Mechanisms of Renal Fibrosis. **https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034227**, 2018-02-12 2018. Disponível em: < https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-022516-034227 >.

110 KLINGBERG, F.; HINZ, B.; WHITE, E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. **J Pathol,** v. 229, n. 2, p. 298-309, Jan 2013. ISSN 1096-9896. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996908 >.

111 RAO K, B. et al. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. **J Clin Diagn Res,** v. 8, n. 4, p. ZC14-7, Apr 2014. ISSN 2249-782X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959509 >.

112 MENN-JOSEPHY, H. et al. Renal Interstitial Fibrosis: An Imperfect Predictor of Kidney Disease Progression in Some Patient Cohorts. **Am J Nephrol,** v. 44, n. 4, p. 289-299, 2016. ISSN 1421-9670. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27626625 >.

113 BUCHTLER, S. et al. Cellular Origin and Functional Relevance of Collagen I Production in the Kidney. **J Am Soc Nephrol,** v. 29, n. 7, p. 1859-1873, Jul 2018. ISSN 1533-3450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29777019 >.

114 YANG, J. et al. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **J Clin Invest,** v. 110, n. 10, p. 1525-38, Nov 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438450 >.

115 MEYRIER, A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Clin Pract Nephrol,** v. 1, n. 1, p. 44-54, Nov 2005. ISSN 1745-8323. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932363 >.

[116] M, C. et al. Obesity-related glomerulopathy and podocyte injury: a mini review. **Frontiers in bioscience (Elite edition),** v. 4, 01/01/2012 2012. ISSN 1945-0508. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201936 >.

[117] F, Z. et al. Resistance to glomerulosclerosis in B6 mice disappears after menopause. **The American journal of pathology,** v. 162, n. 4, 2003 Apr 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651625 >.

[118] Z, F. et al. Glomerular aging in females is a multi-stage reversible process mediated by phenotypic changes in progenitors. **The American journal of pathology,** v. 167, n. 2, 2005 Aug 2005. ISSN 0002-9440. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16049323 >.

[119] S, Y. et al. Obesity-Related Glomerulopathy: A Latent Change in Obesity Requiring More Attention. **Kidney & blood pressure research,** v. 45, n. 4, 2020 2020. ISSN 1423-0143. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32498064 >.

[120] F, P.-L.; N, R.-R. Ki67 assessment in breast cancer: an update. **Pathology,** v. 49, n. 2, 2017 Feb 2017. ISSN 1465-3931. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28065411 >.

[121] S, M. et al. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. **Development (Cambridge, England),** v. 119, n. 4, 1993 Dec 1993. ISSN 0950-1991. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306891 >.

[122] J, S. et al. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte marker. **Diabetes research and clinical practice,** v. 87, n. 2, 2010 Feb 2010. ISSN 1872-8227. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969384 >.