

DESIREE RITA DENELLE BERNARDO

**Influência da deficiência de vitamina D e obesidade na progressão da
doença renal em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão
renal**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Dr. Rildo Aparecido Volpini

SÃO PAULO

2022

DESIREE RITA DENELLE BERNARDO

**Influência da deficiência de vitamina D e obesidade na progressão da
doença renal em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão
renal**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Dr. Rildo Aparecido Volpini

SÃO PAULO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bernardo, Desiree Rita Denelle
Influência da deficiência de vitamina D e
obesidade na progressão da doença renal em ratos
submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal
/ Desiree Rita Denelle Bernardo. -- São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Rildo Aparecido Volpini.

Descritores: 1.Injúria renal aguda
2.Insuficiência renal crônica 3.Obesidade 4.Tecido
adiposo 5.Deficiência de vitamina D 6.Inflamação
7.Fibrose

USP/FM/DBD-203/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM12), Disciplina de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Proc. n° 88887.470388/2019-00) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio à pesquisa (Proc.: n° 2019/20840-0, n° 2018/12297-1 e n° 2018/04930-6).

Dedicatória

A todos os meus professores que em alguma passagem dessa minha vida, me ensinaram e contribuíram para quem sou hoje.

Aos meus pais, Margarete e Adilson Bernardo, meus melhores e eternos educadores. Minha dedicação e busca para ser melhor a cada dia, é por vocês.

Agradecimentos

A vida não espera e o tempo passa depressa. O dia amanhece e quando anoitece, tudo é sempre igual: queremos sempre ser melhores do que ontem. Quando nos deparamos, não expomos nossa gratidão à oportunidade em viver e às pessoas que se fazem presente e contribuem para o meu eu e para momentos como este. Mergulhar na vida acadêmica requer um pouco mais do que brilho nos olhos, coragem, dedicação e compromisso. Deixo aqui então, com profundo amor, respeito e em palavras singelas, meu agradecimento a Deus e a pessoas únicas e excepcionais que me apoiaram, impulsionaram e contribuíram nesta minha jornada.

O direcionamento e condução na construção de um aluno de mestrado são de fato diferenciais na formação de um profissional. Agradeço em primeira ordem o Dr. Rildo Aparecido Volpini, a quem tenho profunda admiração e honro-me em dizer ser meu orientador. Não seria possível desenvolver este trabalho sem todos os seus ensinamentos, profissionalismo, paciência e suporte. Serei eternamente grata por conceder a oportunidade de ser sua aluna.

A ciência é inspiradora e as pesquisadoras Dra. Daniele Canale Cavicchioli e Dra. Ana Carolina de Bragança Viciano demonstram o compromisso e a contribuição que mulheres representam na pesquisa científica. Me inspiram, transbordam conhecimento, didática, generosidade e foram grandes pilares em minha formação. Agradeço imensamente o aprendizado, conselhos, abraços em momentos difíceis e por serem grandes exemplos da profissional a qual almejo ser.

Nada se conquista sozinha. Essa dissertação possui além de pessoas, muitas sensações, momentos e sentimentos. É possível conhecer o que é cumplicidade quando se tem uma pessoa como minha amiga Mariana Nascimento. Você foi e é realmente especial nessa minha jornada. Abraçou comigo nosso sonho em comum, deixando tudo mais leve, engraçado e único.

Mais do que ensinamentos que só ela tem a oferecer, a Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu me mostrou como é bom se sentir acolhida, cuidada e especial

para alguém. Seu astral e carinho fizeram a diferença no decorrer destes anos. Meu muito obrigada por tanto. Meu agradecimento também para a Profa. Dra. Maria de Oliveira, uma pessoa especial que me ensinou muito e contribuiu para o meu desenvolvimento intelectual em relação aos conceitos da Fisiologia Renal. Exemplo de profissionalismo e amor pelo ensino.

Agradeço à toda equipe do LIM-12, que me recebeu de braços abertos. Aos supervisores Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro e Prof. Dr. Antonio José Barros Magaldi e aos secretários Eloá Neves e Nivaldo da Silva, o meu muito obrigada por todo o auxílio, suporte e carinho.

Obrigada de coração aos meus amigos que, mesmo indiretamente, contribuíram para que eu tivesse força nos momentos difíceis, compartilharam felicidade e torceram pela minha evolução como pessoa. Vocês me tornam uma pessoa melhor. Em especial, Marina Mendes, Camilla Chicaroni, Bruna Eugenio e Francesca Vocale e Carolina Brandão.

E por fim, agradeço imensamente a Deus por ter concedido o bem mais precioso que poderia ter, o apoio de minha família. Cada um com sua maneira e sempre acreditando em mim. Meus pais, Margarete e Adilson, que me educam, protegem e torcem sempre pelo meu sucesso. Meu namorado Leonardo Garcia, com quem tenho dividido minhas alegrias, meus anseios, pensamentos, planos futuros e aprendido o verdadeiro significado de cumplicidade e amor. Meu irmão Henry Nathan, primeiro e eterno melhor amigo, que me conhece como ninguém e esteve sempre disposto a me ajudar quando precisei. Minha amiga e cunhada Anna Carolina, que sempre estende sua mão e mostra como podemos enxergar as situações por uma perspectiva diferente. O meu muito obrigada a minha linda família. Vocês são um grande presente para mim e foram o apoio mais importante para que eu pudesse chegar até aqui.

Meu eterno *reverence* à vida, a todos vocês supracitados.

“Faço o possível para me conservar calma e para não me preocupar (...) O mundo não parará por causa de mim, e eu, pela minha parte, não posso também fazer parar os acontecimentos. Venha o que vier. Entretanto, estudo e trabalho e tenho esperança que tudo acabará bem.”

O diário de Anne Frank

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e Siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fatores de risco e progressão da doença renal	2
1.2 Vitamina D e doença renal	2
1.3 Adiposidade e doença renal	5
1.4 Adiposidade e vitamina D	6
1.5 Justificativa da execução do projeto de pesquisa	7
2. OBJETIVO	9
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Animais	10
3.1.1 Delineamento experimental	10
3.2 Estudos de gaiola metabólica	12
3.3 Parâmetros antropométricos	12
3.4 Determinação da pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular (Clearance de Inulina)	13
3.5 Análises Bioquímicas	14
3.6 Análise e quantificação de proteínas	15
3.7 Análise da expressão gênica: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	16
3.8 Análise Histomorfométrica	17
3.9 Análise Imuno-histoquímica	17
3.10 Análise estatística	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	48

6. CONCLUSÃO	62
7. ANEXOS	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol ou 1,25 di-hidroxitamina D
7-DHC	7-di-hidroxicolesterol
25(OH)D	Calcidiol ou 25-hidroxitamina D
AIR	Área intersticial relativa
ATP	Adenosina Trisfosfato
Ang II	Angiotensina II
C	Comprimento
CA	Circunferência Abdominal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
C _{in}	Clearance de Inulina
Col-3	Colágeno do Tipo 3
CT	Circunferência Torácica
DBP	Proteína ligante da vitamina D
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DRC	Doença Renal Crônica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro Padrão Médio
ESRD	Estágio final da Doença Renal
ET-1	Endotelina-1
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblasto-23
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal

GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
HA	Hipertensão Arterial
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMGCoA	3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
IRA	Injúria Renal Aguda
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos 1
MEC	Matriz extracelular
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PAM	Pressão arterial média
PC	Peso Corpóreo
P _{25(OH)D}	Concentração plasmática de 25-hidroxivitamina D
P _{Aldo}	Concentração plasmática de aldosterona
P _{Angio}	Concentração plasmática de angiotensina II
P _{Ca}	Concentração plasmática de cálcio total
P _K	Concentração plasmática de potássio
P _{Na}	Concentração plasmática de sódio
P _P	Concentração plasmática de fósforo
P _{PTH}	Concentração plasmática de paratormônio
PPAR- α	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma α
PPAR- γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma γ

PR/PC	Relação peso renal/peso corpóreo
PTH	Paratormônio
RVR	Resistência Vascular Renal
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SREBP-1	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1
SREBP-2	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 2
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
UV-B	Raios ultravioleta
VDR	Receptor de vitamina D
Vitamina D ₂	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	Colecalciferol
VU	Volume urinário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Peso corpóreo	19
Figura 2.	Índice de massa corporal, circunferência abdominal e circunferência torácica.....	20
Figura 3.	Comprimento.....	21
Figura 4.	Concentração plasmática de vitamina D [25(OH)D].....	22
Figura 5.	Avaliação semiquantitativa da expressão proteica de VDR no tecido renal.....	23
Figura 6.	Expressão gênica de VDR no tecido adiposo.....	24
Figura 7.	Concentração plasmática de paratormônio (PTH).....	25
Figura 8.	Quantificação da proteína Klotho.....	26
Figura 9.	Concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides	27
Figura 10.	Concentração plasmática de glicose.....	28
Figura 11.	Concentração plasmática de leptina.....	28
Figura 12.	Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada pelo clearance de inulina	29
Figura 13.	Avaliação do volume urinário e proteinúria.....	30
Figura 14.	Expressão da aminopeptidase P (JG12) no córtex renal.....	31
Figura 15.	Pressão arterial média (PAM), concentração plasmática de angiotensina II (Ang II), quantificação de angiotensina II (Ang II) no tecido renal e concentração plasmática de aldosterona.....	32
Figura 16.	Fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal.....	33
Figura 17.	Quantificação tecidual da MCP-1 (ELISA).....	34

Figura 18.	Imunolocalização de células CD68+ (macrófagos M1 + M2) no córtex renal.....	35
Figura 19.	Imunolocalização de células CD206+ (macrófagos M2) no córtex renal.....	36
Figura 20.	Gráfico ilustrativo do balanço da expressão de macrófagos M1 e M2	37
Figura 21.	Imunolocalização de células CD3+ (células T) no córtex renal.....	38
Figura 22.	Imunolocalização de TGF- β no córtex renal.....	40
Figura 23.	Quantificação de colágeno III (ELISA) em tecido renal	41
Figura 24.	Imunolocalização de fibronectina no córtex renal	42
Figura 25.	Imunolocalização de α -SMA no córtex renal	44
Figura 26.	Imunolocalização de vimentina no córtex renal	45
Figura 27.	Imunolocalização de PCNA no córtex renal.....	46
Figura 28.	Avaliação da área intersticial relativa (AIR) no córtex renal.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros antropométricos.....	21
Tabela 2. Análise da concentração plasmática de vitamina D e parâmetros bioquímicos.....	23
Tabela 3. Avaliação da expressão proteica e gênica pelos métodos de <i>western blotting</i> , ELISA e qPCR.....	25
Tabela 4. Parâmetros metabólicos.....	29
Tabela 5. Parâmetros funcionais e hemodinâmicos.....	33
Tabela 6. Análise histomorfológica e avaliação imuno-histoquímica.....	39

Bernardo DRD. Influência da deficiência de vitamina D e obesidade na progressão da doença renal em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

RESUMO

A injúria renal aguda (IRA) altera a hemodinâmica renal, leva à injúria tubular, ativa vias de inflamação, proliferação e de morte celular. O dano inicial causado no tecido renal após um evento de isquemia/reperfusão (I/R) participa na patogênese do curso da IRA, assim como na predisposição à doença renal crônica. A deficiência de vitamina D tem sido considerada um fator de risco para a doença renal e está associada ao dano túbulo-intersticial, contribuindo para a progressão da doença renal. A obesidade está relacionada diretamente ao diabetes *mellitus* e hipertensão arterial, principais desordens metabólicas responsáveis pela progressão da doença renal. Além disso, a expansão do tecido adiposo é descrita como um importante fator para uma maior secreção de citocinas pró-inflamatórias e respectiva influência na progressão da doença renal. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da deficiência de vitamina D e da obesidade na progressão da doença renal em modelo de I/R renal em ratos. Ratos Wistar foram submetidos à cirurgia de I/R renal no 45º dia e acompanhados até o 90º dia de protocolo. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a dieta recebida: padrão (P), depletada em vitamina D (dVD), hiperlipídica (H) ou hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Ao final dos 90 dias foram observados níveis quase indetectáveis de vitamina D nos animais dos grupos dVD e HdVD. Além disso, foram constatadas alterações no perfil antropométrico e metabólico nos animais dos grupos H e HdVD. A combinação de deficiência de vitamina D e obesidade contribuiu para o agravamento dos parâmetros funcionais e hemodinâmicos nos animais do grupo HdVD. Ademais, essa combinação favoreceu a exacerbação do processo inflamatório e da expressão renal de proteínas da matriz extracelular e de marcadores de alteração fenotípica, resultando em uma expansão do

compartimento túbulo-intersticial. Todas essas alterações estiveram associadas com uma maior expressão renal do fator de crescimento transformante β e redução da expressão do receptor de vitamina D. Nossos resultados mostram que o efeito sinérgico da obesidade e da deficiência de vitamina D agravou as alterações funcionais, hemodinâmicas e morfológicas observadas na evolução da doença renal em modelo de I/R.

Descritores: Lesão renal aguda; Doença renal crônica; Obesidade; Tecido adiposo; Deficiência de vitamina D; Inflamação; Fibrose.

Bernardo DRD. Influence of vitamin D deficiency and obesity on renal disease progression in rats submitted to renal ischemia/reperfusion injury [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) alters renal hemodynamics, leads to tubular injury, activates pathways of inflammation, proliferation and cell death. The initial damage caused to renal tissue after an ischemia/reperfusion (I/R) injury exerts an important role in the pathogenesis of the course of AKI, as well as in the predisposition to chronic kidney disease. Vitamin D deficiency has been considered a risk factor for kidney disease and is associated with tubulointerstitial damage, contributing to the progression of kidney disease. Obesity is directly related to diabetes mellitus and hypertension, the main metabolic disorders responsible for the progression of kidney disease. Furthermore, the expansion of adipose tissue is described as an important factor for an increased secretion of pro-inflammatory cytokines and respective influence on the progression of kidney disease. We aimed to investigate the influence of vitamin D deficiency and obesity on the progression of renal disease in a murine model of renal I/R. Male Wistar rats underwent renal I/R surgery on day 45 and followed until day 90 of the protocol. We allocated the animals to four groups according to each diet received: standard (H), vitamin D-depleted (dVD), high fat (H) or high fat vitamin D-depleted (HdVD). At the end of 90 days, we observed almost undetectable levels of vitamin D in the dVD and HdVD groups. In addition, H and HdVD groups presented alterations in the anthropometric and metabolic profile. The combination of vitamin D deficiency and obesity contributed to the worsening of functional and hemodynamic parameters observed in the HdVD group. Moreover, this combination favored the exacerbation of the inflammatory process and the renal expression of extracellular matrix proteins and phenotypic alteration markers, resulting in an enlargement of the tubulointerstitial compartment. All these changes were associated with an increased renal expression of transforming growth factor β and reduced expression of the vitamin D receptor. Our results show that the synergistic effect of obesity and vitamin D deficiency

exacerbated the functional, hemodynamic and morphological changes present in the evolution of renal disease induced by I/R.

Keywords: Acute kidney injury; Chronic kidney disease; Obesity; Adipose tissue; Vitamin D deficiency; Inflammation; fibrosis.

1. INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado que o número de pacientes acometidos por injúria renal aguda (IRA) continua em crescimento e inaceitavelmente alto [1-3]. Apesar de a maioria dos pacientes sobreviver e geralmente recuperar a função renal, vários estudos demonstram e sugerem que uma parcela significativa destes pacientes desenvolve uma predisposição à doença renal crônica (DRC) [3-5]. Modelos animais que mimetizam a IRA, incluindo a isquemia/reperfusão (I/R) experimental, têm sido muito utilizados para estudar os mecanismos de injúria renal e os subsequentes processos de reparação e recuperação [5-7].

A fisiopatologia da injúria da I/R renal envolve um complexo intercâmbio entre a hemodinâmica renal [8], a injúria tubular e o processo inflamatório [9], assim como a ativação de vias de proliferação e morte celular [4, 10]. A isquemia leva a interrupção do fluxo sanguíneo para as células, resultando em hipóxia ou anoxia, promovendo imediatamente a redução dos citocromos mitocondriais e interrompendo a cadeia de fosforilação [11]. A baixa demanda de oxigênio durante a isquemia leva à degeneração e morte celular devido à degradação e diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), ocasionando prejuízo da função celular e interferindo nos processos de recuperação [3, 11, 12].

Alterações funcionais e estruturais da vasculatura renal também estão envolvidas na resposta à IRA [7]. Estudos têm demonstrado que a vasculatura renal possui uma capacidade reduzida de regeneração após o insulto de I/R [7, 13]. A redução da densidade vascular pode ter importantes consequências na função renal por promover hipóxia e prejuízo da hemodinâmica, assim como na regulação da resposta ao sódio, predispondo à DRC e à hipertensão [5, 7]. A vasculatura renal após o insulto isquêmico é influenciada por fatores que derivam da circulação e/ou do estresse do parênquima renal, onde vias de sinalização que levam à vasoconstrição são ativadas em consequência da injúria inicial [4].

1.1 Fatores de risco e progressão da doença renal

Ao longo da última década, tem-se destacado o aumento no interesse sobre os fatores de risco relacionados à progressão da doença renal. Tal fato deve-se à alta prevalência da DRC e seus custos elevados, assim como ao risco de progressão para um estágio terminal [6, 14]. Além dos fatores de risco não modificáveis envolvidos na progressão da doença renal como idade avançada, gênero e histórico familiar, existem fatores tradicionais e comumente relacionados à DRC, como diabetes *mellitus* (DM), hipertensão arterial (HA), obesidade e doenças cardiovasculares (DCV) [15]. Ademais, a presença de fatores de risco não tradicionais como a deficiência de vitamina D têm sido considerados como agravantes na evolução da doença renal [16]. Entretanto a influência da associação da obesidade e da deficiência de vitamina D na progressão da doença renal ainda é incerto e vem recebendo atenção do meio científico.

1.2 Vitamina D e doença renal

A vitamina D é um hormônio circulante no organismo classicamente envolvido na regulação de várias funções fisiológicas essenciais como a osteogênese e a manutenção da homeostase mineral [17, 18]. Além dessa conhecida função, sabe-se que a 1,25 di-hidroxitamina D₃ [1,25(OH)₂ D₃] atua em vários sistemas biológicos do organismo [18, 19].

A expressão “vitamina D” é empregada para designar vários compostos, entre eles, o colecalciferol (vitamina D₃) e o ergocalciferol (vitamina D₂). Através da dieta, ambos podem ser encontrados em alimentos que contenham naturalmente vitamina D (ovos, atum, salmão, sardinha, shitake), alimentos fortificados (leites, iogurtes, queijos, sucos de laranja), e suplementação [18]. Entretanto a síntese cutânea a partir da exposição solar representa sua principal fonte a fim de produzir sua forma biologicamente ativa, a 1,25(OH)₂D₃ [20, 21].

A formação do colecalciferol inicia-se em resposta à exposição dos queratinócitos aos raios ultravioletas (UV-B), onde o produto residual do 7-dihidroxicolesterol (7-DHC) é convertido em pré-vitamina D₃. Esta síntese cutânea primária é seguida da isomerização termo-dependente da pré-vitamina D₃ para a subsequente síntese da vitamina D₃. Assim que formada, a vitamina D₃ pode ser armazenada na célula adiposa e/ou secretada para a circulação sanguínea ainda em sua forma não-ativa [18, 22]. O processo de reabsorção da vitamina D obtida através da dieta (D₂ e D₃) envolve a incorporação deste hormônio por quilomícrons no intestino, chegando à circulação sanguínea através do sistema linfático [22]. Na circulação sanguínea ambas as formas se ligam a uma α -globulina, a proteína ligante de vitamina D (DBP), e são transportadas até o fígado. Neste órgão ocorre a primeira hidroxilação via ação da 25-hidroxilase (*Cyp2R1*), resultando na formação do composto 25-hidroxivitamina D [(25(OH)D] ou calcidiol, também conhecido como a forma circulante da vitamina D [18, 20]. A produção da 25(OH)D no fígado, além de rápida, sofre pouca regulação. A 25(OH)D ligada à DBP entra na corrente sanguínea e é transportada até o rim, considerado o principal órgão ativador dessa molécula [22]. A conversão final para a forma biologicamente ativa ocorre nas mitocôndrias dos túbulos proximais dos rins, onde a 25(OH)D sofre uma segunda hidroxilação pela enzima 1- α -hidroxilase (*Cyp27b1*), transformando-se em 1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol [18, 20, 22]. É importante salientar que esta última etapa de hidroxilação é estreitamente regulada por fatores importantes, tais como o paratormônio (PTH), o fósforo e o fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) [20, 23]. Além disso, níveis elevados da 1,25(OH)₂D₃ regulam o próprio metabolismo a partir da expressão da 25(OH)D-24-hidroxilase (*Cyp24A1*). A ativação e ação desta enzima resulta na catabolização da 1,25(OH)₂D₃ e da 25(OH)D, as quais são metabolizadas em formas hidrossolúveis inativas e excretadas como ácido calcitroico pelos sais biliares do fígado [18, 22].

A determinação da concentração plasmática da vitamina D é comumente mensurada pelos níveis séricos da 25(OH)D. Além de representar a soma da produção biológica provinda tanto da dieta quanto da exposição solar, o calcidiol apresenta a maior meia vida sérica comparado às demais formas deste hormônio [24]. Diretrizes atuais sugerem e definem níveis plasmáticos de vitamina D <20

ng/mL como deficiência; valores entre 20-29 ng/mL como insuficiência; e >30 ng/mL como suficiência [25, 26]. Para nortear o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D no Brasil, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) juntamente com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC) definiu os seguintes parâmetros de referência para níveis de vitamina D para a população com até 65 anos de idade: deficiência como níveis <20 ng/mL; suficiência como níveis entre 20-60 ng/mL; e intoxicação como níveis >100 ng/mL [27].

A prevalência da hipovitaminose D na população mundial é cada vez mais comum. É estimado que 20-80% da população de países da América do Norte e Europa apresente níveis insuficientes de vitamina D [22]. A hipovitaminose D também é observada em continentes ensolarados como América do Sul, África e Oceania [25]. Esse paradoxo parece ser resultante de diversos fatores que influenciam na produção biológica da vitamina D, como inadequada exposição solar ou uso de fatores de proteção, fatores ambientais (regiões de alta latitude, inverno prolongado), fatores fisiológicos (pigmentação escura da pele, idade avançada, gravidez, obesidade, doenças hepáticas e renais) e ingestão inadequada dessa vitamina (baixa ou nula ingestão de alimentos fonte e/ou suplementação) [22]. As consequências relacionadas à hipovitaminose D têm sido descritas na literatura, principalmente aquelas relacionadas ao metabolismo de cálcio e fósforo [18, 21]. Entretanto a hipovitaminose D tem sido referida como um importante precursor de desordens como hipertensão, diabetes, obesidade, doenças autoimunes, respiratórias, cardiovasculares e progressão de doenças renais [21, 25, 28].

O rim desempenha funções importantes no metabolismo da vitamina D e esta, por sua vez, é responsável pela proteção renal e regulação de inúmeras atividades fisiológicas [16, 23]. As doenças renais, mesmo nas fases iniciais, são acompanhadas pela diminuição dos níveis de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D₃ [23, 29]. Estudos realizados em nosso laboratório têm demonstrado que a hipovitaminose D é um fator de risco importante para o agravamento e progressão da doença renal [6-8, 30, 31]. Em modelos de IRA por I/R foi observado que a deficiência de vitamina D potencializou a injúria renal, agravou o dano tubular e glomerular

e contribuiu para a rarefação da vasculatura renal [7, 8]. Em modelos experimentais de DRC, a deficiência de vitamina D esteve relacionada com uma maior formação de fibrose intersticial [6] e modificações na função e hemodinâmica renal [30]. Sendo assim, tanto a deficiência quanto a insuficiência de vitamina D podem acelerar a progressão da doença renal e refletir em um mau prognóstico em casos de IRA e DRC [6, 8, 31].

1.3 Adiposidade e doença renal

Definida como doença crônica, a obesidade é comumente caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal, sendo considerada uma epidemia mundial condicionada aos hábitos de vida. Na idade adulta, seu diagnóstico é dado principalmente a partir da classificação do Índice de Massa Corporal (IMC, kg/m^2), com valores iguais ou superiores a 30 kg/m^2 [32, 33]. Em proporção global, a prevalência de indivíduos classificados com sobrepeso e obesidade atinge praticamente um terço da população mundial, sendo estimado que nos próximos 10 anos essa porcentagem chegue a 57,8% [34]. A Organização Mundial da Saúde mostra o crescimento rápido e epidêmico da obesidade infanto-juvenil nos últimos 40 anos. Os dados revelam que o número de crianças consideradas obesas aumentou de 11 milhões (1976) para cerca de 124 milhões (2016), refletindo a saúde adulta nos próximos anos [35]. No Brasil, de acordo com a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), a frequência de indivíduos com excesso de peso e obesidade no ano de 2019 representou 55,4% e 20,3%, respectivamente, da população adulta [36].

O excesso de ganho de peso e gordura corporal relaciona-se diretamente a desordens metabólicas, tais como dislipidemia, resistência à insulina, DM e HA. Dentre estas, destacam-se o DM e a HA como os principais responsáveis pela progressão para o estágio final da doença renal [37, 38]. Segundo o Censo Brasileiro de Diálise, o DM e a HA representam as principais patologias de base em pacientes em diálise no Brasil, refletindo a influência destas desordens metabólicas no curso da doença renal [39].

Alterações renais associadas à obesidade são demonstradas na literatura. Tais modificações estão relacionadas às alterações hemodinâmicas, principalmente hiperperusão glomerular, aumento da fração de filtração e da proteinúria [40-42]. Além disso, alterações estruturais como aumento de peso renal, glomerulomegalia, espessamento da membrana basal glomerular, expansão da matriz mesangial e disfunção de podócitos são observadas no curso das principais patologias renais associadas à obesidade [41-43]. Em modelo de estágio inicial de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, Henegar e col. demonstraram que cães alimentados com uma dieta rica em lipídios apresentaram alterações renais, tais como hiperperusão glomerular, hiperfiltração, espessamento da membrana basal glomerular, expansão da matriz mesangial e maior expressão do fator de crescimento transformante β (TGF- β) [42, 44]. Além disso, os autores relataram que quando sustentadas, essas alterações podem contribuir para a perda de função renal e sucessiva progressão da DRC [42].

É sabido que o tecido adiposo não é apenas um reservatório de gordura, mas um tecido dinâmico envolvido na produção de adipocinas, incluindo a leptina, a adiponectina, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1), TGF- β , a angiotensina II (Ang II) e a endotelina 1 [45]. Essa ação endócrina do tecido adiposo com produção de adipocinas gera estresse oxidativo, ativa o sistema renina-angiotensina e promove resistência à insulina e produção/acúmulo anormal de lipídeos [37, 46]. Além disso, tem sido observado que a obesidade está associada à inflamação, a qual também é um fator de risco para perda de função renal. Estudos mostram que o acúmulo irreversível de matriz extracelular (MEC) juntamente com a formação de fibrose renal é um processo que pode estar inter-relacionado à ação das adipocinas no rim [40, 41, 43, 45].

1.4 Adiposidade e vitamina D

Na última década, um crescente número de estudos tem demonstrado a associação entre a hipovitaminose D e o estado antropométrico [47-49]. Em

2015, uma meta-análise mostrou que a prevalência de deficiência de vitamina D em indivíduos obesos é 35% maior em relação aos indivíduos eutróficos e 24% maior quando comparada com pacientes considerados em sobrepeso, indicando uma relação positiva entre IMC e hipovitaminose D [50]. Essa observação também é descrita em países ensolarados como o Brasil. Unger e col. verificaram além de uma alta prevalência de hipovitaminose D (<30ng/mL) na população adulta avaliada, uma relação negativa entre níveis séricos de 25(OH)D e IMC, propondo uma possível participação do sequestro e depósito da vitamina D no tecido adiposo e menor exposição solar por escolha e estilo de vida [51, 52].

Uma vez que a vitamina D é considerada um hormônio lipossolúvel, é descrito que indivíduos com maior percentual de gordura corporal apresentem sequestro e armazenamento de vitamina D no tecido adiposo [50, 53]. Além disso, tem sido descrito que a hipovitaminose D na obesidade ocorre independentemente de fatores como idade, etnia, gênero, exposição solar e latitude [50, 53]. Na década de 70, Rosenstreich e col. demonstraram experimentalmente que o tecido adiposo apresentava uma grande capacidade de armazenamento das diferentes formas da vitamina D em comparação com outros órgãos e tecidos [54]. No ano de 2000, Wortsman e col. mostraram que havia uma menor biodisponibilidade de vitamina D em pacientes obesos em relação a pacientes eutróficos após ingestão aguda de ergocalciferol ou sessão de fototerapia. Esses autores ainda demonstraram uma correlação negativa do pico das formas D₂ e D₃ da vitamina D em relação ao IMC, sugerindo um maior sequestro e armazenamento das diferentes formas da vitamina D no tecido adiposo dos pacientes obesos [55].

1.5 Justificativa da execução do projeto de pesquisa

Ultimamente, há um grande interesse no estudo sobre a influência dos fatores de risco relacionados à progressão da doença renal. Tal fato deve-se à alta prevalência da DRC e seus custos elevados, assim como o risco de progressão para um estágio terminal com suas complicações cardiovasculares

e risco de morte. Os riscos tradicionais, tais como DCV, HA e infecções explicam apenas metade das causas de mortalidade nesses pacientes, havendo interesse em outros fatores de risco, incluindo o status da vitamina D e o tecido adiposo. Além da participação da vitamina D na manutenção das funções fisiológicas essenciais na homeostase mineral, há a observação da queda dos níveis deste hormônio na DRC assim como o comprometimento da sua biodisponibilidade em pacientes obesos. Em vista dessas informações e do atual panorama mundial da DRC e da obesidade, consideramos importante estudar a influência da deficiência de vitamina D associada à obesidade na progressão da doença renal após insulto isquêmico.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Estudar a influência da deficiência de vitamina D associada à obesidade na progressão da doença renal após a injúria de isquemia/reperfusão renal em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- a. Aferir parâmetros antropométricos e metabólicos;
- b. Estudar a função e a hemodinâmica renal;
- c. Investigar a influência do tecido adiposo na concentração plasmática de vitamina D e na expressão do receptor de vitamina D (VDR);
- d. Analisar as vias inflamatórias relacionadas à infiltração de macrófagos/monócitos e células T;
- e. Avaliar a formação de fibrose e o comprometimento túbulo-intersticial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com peso corpóreo inicial entre 180-200 g, obtidos do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório em temperatura controlada ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n°1438/2020).

3.1.1 Delineamento experimental

Foram utilizados quatro diferentes tipos de dieta neste protocolo experimental: (1) dieta padrão (20% proteína, 70% carboidratos e 10% lipídeos) oferecida ao grupo P; (2) dieta padrão depletada em vitamina D (20% proteína, 70% carboidratos, 10% lipídeos e livre de vitamina D) oferecida ao grupo dVD; (3) dieta hiperlipídica (20% proteína, 35% carboidratos e 45% lipídeos) oferecida ao grupo H; e (4) dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (20% proteína, 35% carboidratos, 45% lipídeos e livre de vitamina D) oferecida ao grupo HdVD - todas providas da PragSoluções Biociências (Jaú, São Paulo, Brasil). Os animais dos diferentes grupos experimentais foram colocados em gaiolas conforme a respectiva dieta oferecida com livre acesso à água, sendo avaliado diariamente o consumo de água e ração. O peso dos animais foi avaliado semanalmente.

No 45º dia após o início das dietas, todos os ratos foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (250 mg/kg), e uma incisão abdominal foi feita para a realização da cirurgia de I/R renal. Para a isquemia renal, as artérias de ambos os rins foram clameadas por 45 minutos, seguido de reperfusão.

3.2 Estudos de gaiola metabólica

Ao final dos 90 dias de acompanhamento experimental, os animais foram colocados em gaiola metabólica individual para a coleta de urina de 24 horas. O volume urinário foi avaliado gravimetricamente e as amostras de urina foram centrifugadas para remoção de material suspenso. A determinação da concentração urinária de proteína foi realizada através de sistema colorimétrico usando o kit comercial Sensiprot (LabTest, MG, Brasil). O fluxo urinário dos animais foi obtido a partir da relação entre volume urinário (mL) e tempo (min), como descrito na fórmula abaixo:

$$\dot{V} = \frac{V}{t}$$

Onde:

\dot{V} = fluxo urinário (mL/min);

V = volume urinário (mL);

t = tempo (min).

3.3 Parâmetros antropométricos

Medidas antropométricas foram aferidas nos animais anestesiados, antes do experimento de clearance de inulina. O comprimento (C, cm) dos animais foi mensurado das narinas ao início da cauda (*nose-to-anus*). Para a circunferência abdominal (CA, cm), a medida foi realizada logo acima das patas traseiras. Para a circunferência torácica (CT, cm), utilizamos o ponto médio logo após o início das patas dianteiras [56, 57]. Foi utilizada uma fita inelástica esterilizada para a mensuração de todos os parâmetros mencionados. Para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), foi realizada a divisão do peso do animal (g) referente ao dia da cirurgia pelo seu comprimento (cm) elevado ao quadrado [58], como descrito na fórmula abaixo:

$$\text{IMC} = \frac{P}{C^2}$$

Onde:

IMC = índice de massa corporal (g/cm²);

P = peso corporal (g);

C = comprimento (cm).

3.4 Determinação da pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular (Clearance de Inulina)

Ao final dos 90 dias de acompanhamento experimental, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 50 mg/Kg (Cristália, São Paulo, Brasil). A traqueia foi canulada com cateter PE-240 para a manutenção da respiração espontânea. A veia jugular foi canulada com cateter PE-60 para a infusão de inulina e de fluidos. Para o controle da pressão arterial média (PAM) e para a coleta de amostras de sangue, a artéria carótida foi cateterizada com cateter PE-50. Para a coleta de amostras de urina, foi realizada uma incisão abdominal e a bexiga do animal foi canulada com cateter PE-240. Após o procedimento cirúrgico, uma dose única de inulina (100 mg/kg diluída em 1 mL de solução salina a 0,9%) foi administrada pela veia jugular. Em seguida, uma infusão constante de inulina foi mantida (10 mg/kg em solução salina a 0,9%) em fluxo de 0,04 mL/min do início ao fim do experimento. Foram coletadas amostras de urina aos 30, 60 e 90 minutos e amostras de sangue no início e no fim do experimento. Os valores do clearance de inulina foram representados pela média dos três períodos de experimento. As concentrações de inulina no sangue e na urina foram determinadas pelo método colorimétrico da Antrona. O clearance de inulina foi corrigido por 100 g de peso corpóreo.

Para a avaliação do fluxo sanguíneo renal (FSR) foi feita uma incisão mediana abdominal, o pedículo renal esquerdo foi dissecado e a artéria renal isolada. Cuidadosamente, uma sonda de fluxo ultrassônico foi acoplada na

artéria renal para a mensuração do fluxo sanguíneo renal em mL/min (TS420; Transonic Systems, Bethesda, MD, EUA). A resistência vascular renal (RVR, mmHg/mL/min) foi obtida através da relação entre a PAM (mmHg) e o FSR (mL/min), como descrito na fórmula abaixo:

$$RVR = \frac{PAM}{FSR}$$

Onde:

RVR = resistência vascular renal (mmHg/ml/min);

PAM = pressão arterial média (mmHg);

FSR = fluxo sanguíneo renal (ml/min).

3.5 Análises Bioquímicas

Ao final do experimento de clearance, o sangue total dos animais foi colhido para as seguintes análises no plasma: sódio (P_{Na}), potássio (P_K), triglicérides, colesterol total (colesterol) e frações por eletrodo específico (ABL800 Flex Analyzer - Radiometer, Brønshøj, Dinamarca); cálcio (P_{Ca}), fósforo (P_P) e glicose através de sistema colorimétrico usando kits comerciais (LabTest Diagnóstica, MG, Brasil).

Outras análises realizadas incluíram a concentração plasmática de 25(OH)D, PTH, Ang II, aldosterona e leptina pelo método de ELISA usando os seguintes kits comerciais: *Rat 25OH Vitamin D* (ALPCO, NH, EUA); *Rat Bioactive Intact PTH* (Immutopics®, CA, EUA); *Rat Angiotensin II* (Elabscience®, TX, EUA); *Rat Aldosterone* (Enzo Life Science®, NY, USA); e Leptin (Millipore®, MO, EUA).

Após a coleta do sangue, os rins foram perfundidos com solução de tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). Em seguida, os rins foram removidos e uma parte congelada em nitrogênio líquido foi armazenada a $-80^{\circ}C$ para análise da expressão de proteínas pelas técnicas

de *western blotting* ou ELISA. O outro fragmento renal foi fixado em solução de *methacarn* (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético glacial) por um período de 24h. Em seguida, o fixador foi substituído por álcool 70% e o tecido incluído em parafina e cortado em secções de 4 μm para estudos histomorfométricos e de imuno-histoquímica.

3.6 Análise e quantificação de proteínas

Para a realização das técnicas de *western blotting* e ELISA, foram utilizadas as amostras de tecido renal previamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C . A extração de proteínas seguiu o protocolo descrito por Burnette [59] com pequenas modificações. As amostras dos tecidos renais foram homogeneizadas (Polytron PT 10-35) em solução K-Hepes (200 mM Mannitol, 80 mM Hepes, 41 mM KOH, pH 7,5) com coquetel de inibidores de protease (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos a 4°C para remover *debris* celulares. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-rad, CA, EUA).

Western blotting: As amostras foram separadas de acordo com o peso molecular em minigéis SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) em tampão de corrida (Tris/Glicina/SDS 10%, pH 8,3) e a transferência para membrana de PVDF foi feita com tampão de transferência (Tris/Glicina/metanol 20%). A membrana foi bloqueada com solução de 5% de leite em pó desnatado (Molico) em TBS-T (Tris/NaCl/EDTA, pH 7,5) por 1 hora. A incubação primária foi feita com o anticorpo anti-VDR (1:500, Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA). A incubação secundária realizada com anticorpo anti-camundongo (1:2000, Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) também em solução de TBS-T. O procedimento de detecção foi baseado em quimioluminescência (ECL, GE Healthcare-Amersham, UK). A normatização foi realizada com uma nova hibridização das membranas com anticorpo anti- β -actina (1:100.000, Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). A semi-quantificação das proteínas foi feita pelo software Image J (NIH image software).

ELISA: Foram avaliadas as expressões de Colágeno do tipo 3 (Col-3), Ang II, TGF- β e MCP-1 usando respectivamente os kits comerciais *Rat COL3*, *Rat Ang II*, *Rat TGF- β 1* e *Rat MCP-1* (Elabscience®, TX, EUA). O sistema de detecção e os cálculos de quantificação seguiram os protocolos descritos pelo fabricante. As leituras das absorvâncias foram obtidas utilizando-se o aparelho Epoch/2 (Biotek Instruments, Winooski, VE, EUA).

3.7 Análise da expressão gênica: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Extração de RNA: Em tubos plásticos de 50 mL foram adicionados ~50 mg de tecido adiposo para 1 mL de reagente *RNA Lysis Buffer* (Promega, Madison, WI, EUA) que foram homogeneizados com auxílio de um homogeneizador (Polytron PT 10-35). Em seguida, foi adicionado 350 μ L de tampão de diluição para RNA (Promega, Madison, WI, EUA) ao lisado de tecido adiposo. Após centrifugação e precipitação o lisado foi transferido para uma coluna de separação. O RNA preso à coluna foi lavado e após a centrifugação foi ressuspenso com água livre de RNase. As concentrações de RNA de cada amostra foram determinadas por Nanodrop®.

Reação de qPCR: Fitas únicas de cDNA foram sintetizadas a partir das amostras de RNA isolado utilizando o reagente GoTaq qPCR master mix (Promega, Madison, WI, EUA), na proporção de 10 μ L do reagente para até 50 ng de RNA. A reação em cadeia da polimerase foi feita por TaqMan® (Applied Biosystem, CA, EUA) para VDR (Rn00690616_ml). A sonda para GAPDH (Rn01775763_gl) foi utilizada como controle. Todas as reações de qPCR foram conduzidas em duplicata, utilizando-se o equipamento Step One Plus (Applied Biosystem, CA, EUA). A expressão gênica relativa foi calculada aplicando-se a equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para quantificar a expressão de genes [60].

3.8 Análise Histomorfométrica

As amostras de tecidos renais foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 4 μm , que foram corados pela reação de tricrômio de Masson para avaliação da área glomerular e da expansão do compartimento túbulo-intersticial através da análise da área intersticial relativa (AIR).

A área glomerular foi avaliada por morfometria através do cálculo da média aritmética após análise de aproximadamente 80 glomérulos de cada animal. A área do tufo glomerular (μm^2) foi circulada manualmente e calculada automaticamente pelo software ZEN (Carl Zeiss, Munique, Alemanha). Para análise da AIR, as imagens obtidas pela microscopia óptica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens ZEN (Carl Zeiss, Munique, Alemanha). Foram analisados cerca de 30 campos de 0,09 mm^2 no córtex de cada rim. As áreas intersticiais foram demarcadas manualmente e em seguida medidas de forma percentual em relação ao campo óptico, excluindo-se os glomérulos [6].

3.9 Análise Imuno-histoquímica

Os cortes de 4 μm de espessura de tecido renal foram desparafinizados e incubados por um período de 18 horas à temperatura de 4° C (*overnight*) com os seguintes anticorpos: anti-CD68 (ED1; 1:100; AbD Serotec, Oxford, Reino Unido); anti-CD206 (receptor de manose; 1:2000; Abcam, MA, EUA); anti-CD3 (células T; 1:50; Dako, Glostrup, Dinamarca); anti-TGF- β (1:100; Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA); anti-fibronectina (1:400; Abcam, MA, EUA); anti- α -SMA (alfa-actina de músculo liso; 1:200; Millipore, Billerica, MA, EUA); anti-vimentina (1:100; Dako, Glostrup, Dinamarca); anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular; 1:50; Dako, Glostrup, Dinamarca) e anti-JG12 (aminopeptidase P; 1:100; Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA). O produto dessas reações foi detectado pelo Sistema EnVision HRP - anti-coelho ou anti-

camundongo + 3,3'-diaminobenzidina (Dako North America, Carpinteria, CA, EUA). A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris (Sigma Chemical, Saint Louis, MO, EUA). As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primários em solução de PBS contendo albumina bovina 1%. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz.

As avaliações das imunorreações determinadas pelo limite de cor foram feitas pelas proporções de volume de áreas positivas no tecido renal, as quais foram obtidas pela análise de imagem usando o software ZEN (Carl Zeiss, Munique, Alemanha). A proporção de volume foi expressa como a área positiva (μm^2) para os respectivos marcadores após a divisão pela área total do campo analisado (μm^2). Os resultados foram expressos como porcentagens [61].

3.10 Análise estatística

Os dados dos grupos estudados foram submetidos à análise de variância ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido pelo teste de *Newman-Keuls*. Todas as análises foram realizadas através do programa de estatística *GraphPad Prism*. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os dados antropométricos dos animais foram avaliados ao final dos 90 dias de protocolo experimental. Como esperado, observamos um aumento significativo ($p < 0,001$) do peso corpóreo (g) dos ratos alimentados com as dietas hiperlipídicas (H e HdVD) quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão (P) ou dieta livre de vitamina D (dVD), (Figura 1, Tabela e Anexo 1).

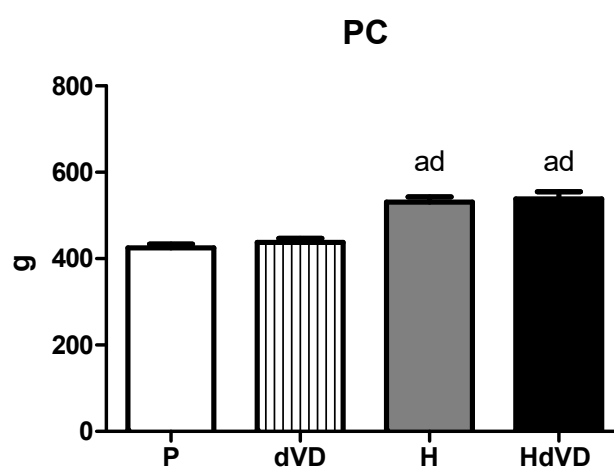


Figura 1 – Peso corpóreo (PC) avaliado ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^a $p < 0,001$ vs P; ^d $p < 0,001$ vs dVD.

O perfil de aumento de peso corpóreo observado nos grupos H e HdVD foi semelhante ao observado na avaliação do IMC (g/cm^2), da CA (cm) e da CT (cm), como demonstrado na Figura 2. Estes resultados demonstram que a dieta hiperlipídica foi efetiva no desenvolvimento experimental de obesidade (Tabela e Anexo 1). Não observamos diferença no comprimento (cm) aferido dos animais, caracterizando um crescimento homogêneo e adequado em relação à idade dos animais e ao período estudado (Figura 3, Tabela e Anexo 1).

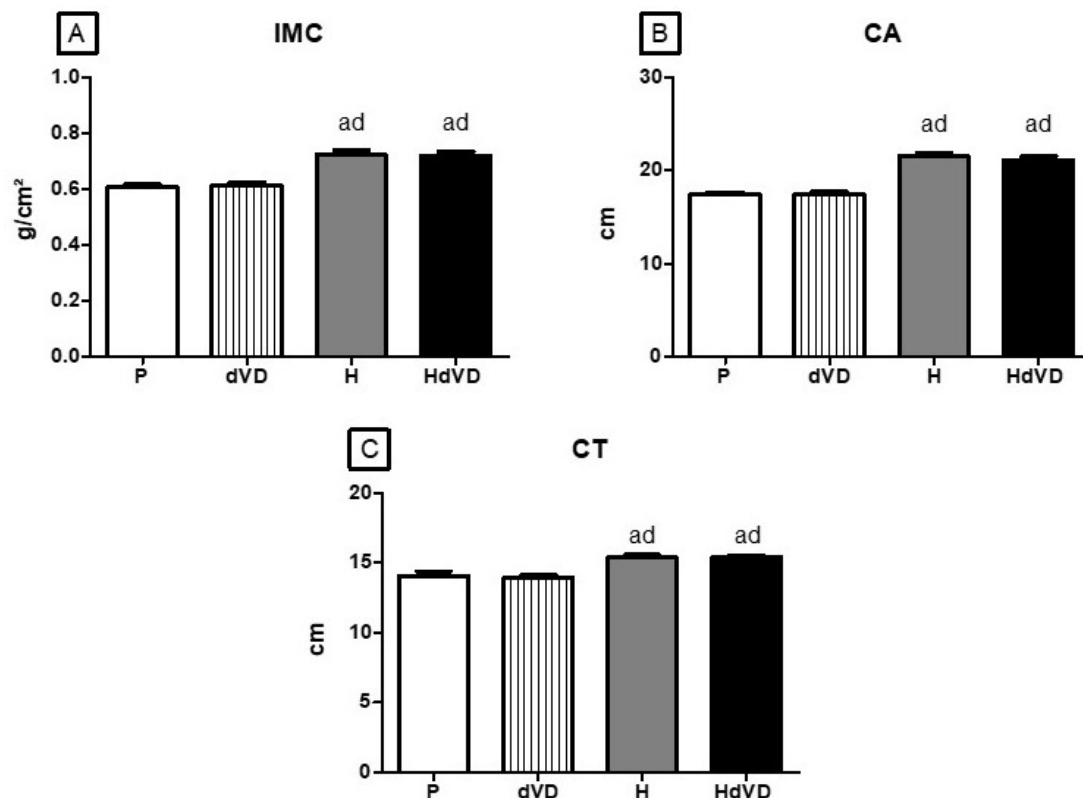


Figura 2 – (A) Índice de massa corporal (IMC), (B) circunferência abdominal (CA) e (C) circunferência torácica (CT) avaliados ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^ap<0,001 vs P; ^dp<0,001 vs dVD.

A relação peso renal/peso corpóreo (PR/PC) apresentou um aumento significativo no grupo dVD em relação aos demais grupos estudados, sugerindo o aparecimento de hipertrofia renal nos animais alimentados com dieta livre de vitamina D. Os grupos tratados com as dietas hiperlipídicas apresentaram uma queda acentuada da relação PR/PC em relação aos grupos P e dVD provavelmente devido ao evidente ganho de peso corpóreo (Tabela e Anexo 1).

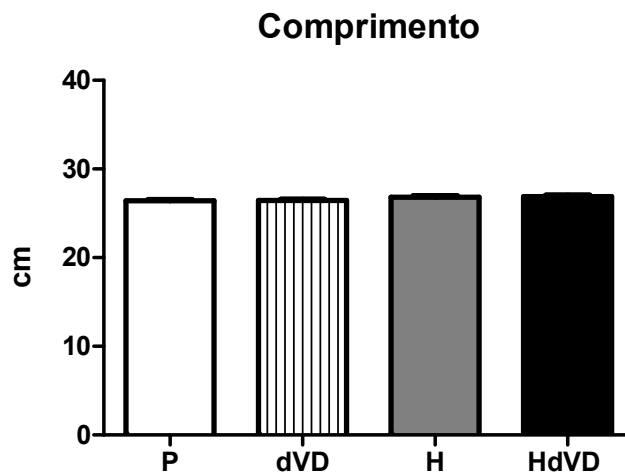


Figura 3 – Comprimento (nose-to-anus) avaliado ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM.

Tabela 1. Parâmetros antropométricos avaliados ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
Peso (g)	425±8	437±10	531±12 ^{ad}	538±16 ^{ad}
IMC (g/cm ²)	0,61±0,01	0,61±0,01	0,72±0,02 ^{ad}	0,72±0,01 ^{ad}
CA (cm)	17,4±0,2	17,4±0,3	21,5±0,4 ^{ad}	21,1±0,4 ^{ad}
CT (cm)	14,1±0,3	13,9±0,2	15,4±0,2 ^{ad}	15,4±0,1 ^{ad}
PR/PC	0,39±0,01	0,43±0,01 ^c	0,33±0,01 ^{bd}	0,33±0,01 ^{bd}
C (cm)	26,4±0,1	26,4±0,1	26,8±0,2	26,9±0,1

IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; CT, circunferência torácica; PR/PC, relação peso renal/peso corpóreo; C, comprimento (nose-to-anus). Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001 vs dVD.

Avaliamos a concentração plasmática de 25(OH)D aos 45 e 90 dias de protocolo experimental. Observamos uma queda significativa (p<0,001) aos 45 dias de protocolo nos animais que receberam dietas depletadas em vitamina D (dVD e HdVD) quando comparados aos grupos P e H, demonstrando um quadro de deficiência deste hormônio. Ao final dos 90 dias de protocolo experimental, encontramos níveis quase indetectáveis de vitamina D nos grupos dVD e HdVD. O grupo H apresentou níveis suficientes de vitamina D, entretanto, com valores

significativamente ($p < 0,001$) menores em relação ao grupo P (Figura 4, Tabela e Anexo 2).

Em suporte ao estudo da vitamina D, avaliamos a expressão proteica do VDR no tecido renal. Ao final do protocolo, a expressão renal do VDR (%) foi menor nos grupos de animais que receberam dietas depletadas em vitamina D (dVD e HdVD) quando comparados ao grupo P. Mesmo apresentando deficiência de vitamina D, observamos uma maior expressão do VDR no grupo de animais HdVD quando comparado aos animais do grupo dVD (Figura 5, Tabela e Anexo 3).

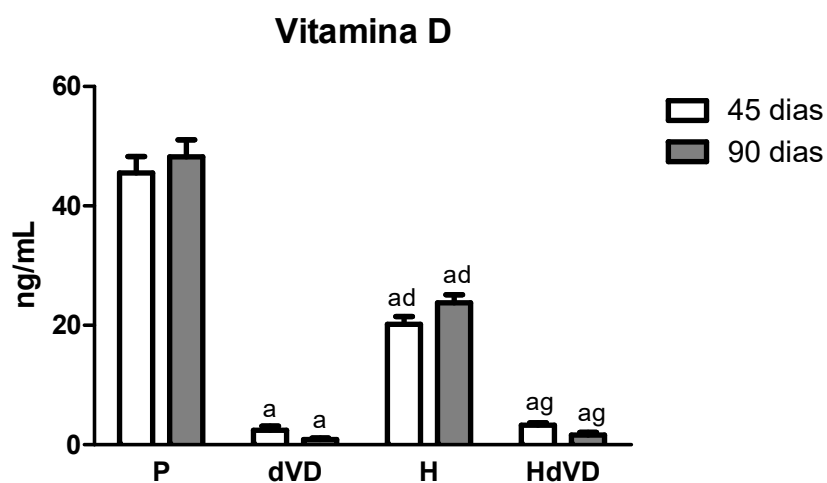


Figura 4 – Concentração plasmática de vitamina D [25(OH)D] avaliada aos 45 e 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^a $p < 0,001$ vs P; ^{ad} $p < 0,001$ vs dVD; ^{ag} $p < 0,001$ vs H.

Tabela 2. Análise da concentração plasmática de vitamina D aos 45 e 90 dias e avaliação dos parâmetros bioquímicos ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
P _{25(OH)D} 45 (ng/mL)	45,51±2,74	2,43±0,71 ^a	20,19±1,7 ^{ad}	3,27±0,39 ^{adg}
P _{25(OH)D} 90 (ng/mL)	48,22±2,87	0,86±0,28 ^a	23,76±1,35 ^{ad}	1,62±0,47 ^{adg}
P _{PTH} (pg/mL)	464±73	933±187	552±52	964±176
P _{Na} (mEq/L)	141±1	142±2	144±1	144±1
P _K (mEq/L)	3,5±0,2	3,7±0,2	3,9±0,1	3,9±0,1
P _{Ca} (mg/dL)	7,1±0,3	7,0±0,2	7,2±0,2	7,2±0,3
P _P (mg/dL)	5,7±0,5	5,6±0,5	5,2±0,2	5,1±0,3

P_{25(OH)D}, 25-hidroxivitamina D; P_{PTH}, paratormônio plasmático; P_{Na}, sódio plasmático; P_K, potássio plasmático; P_{Ca}, cálcio total plasmático; P_P, fósforo plasmático. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001 vs P; ^dp<0,001 vs dVD; ^gp<0,001 vs H.

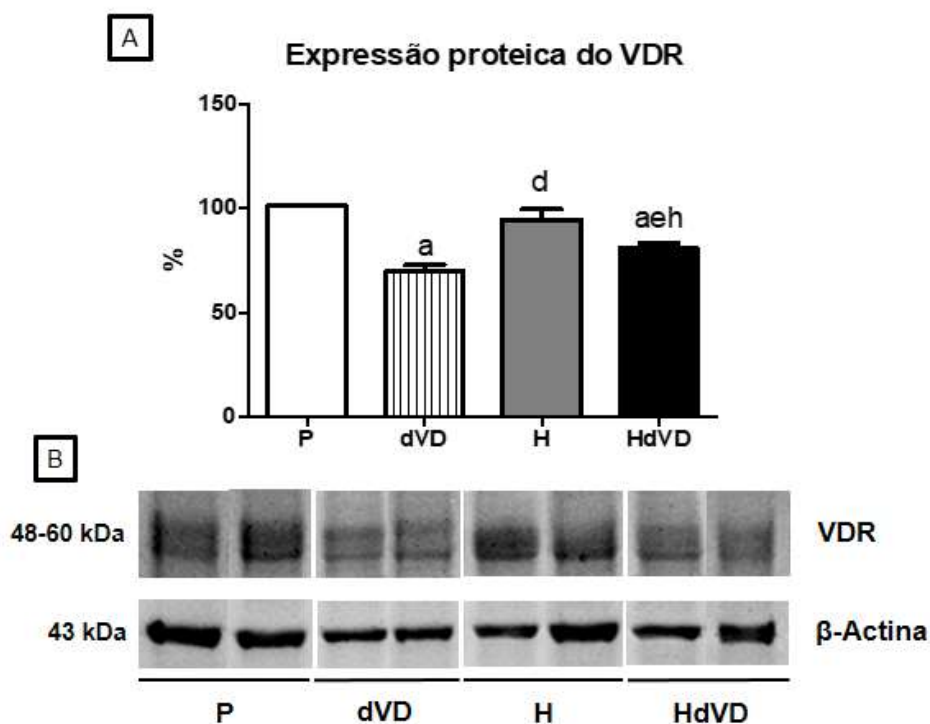


Figura 5 – Avaliação semiquantitativa da expressão da proteína VDR no tecido renal. (A) Gráfico de barras e (B) Foto ilustrativa da expressão proteica do VDR ao final dos 90 dias de protocolo experimental em tecidos renais de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^ap<0,001 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01 vs dVD; ^hp<0,01 vs H.

Além disso, avaliamos a expressão gênica do VDR no tecido adiposo dos animais ao final dos 90 dias de protocolo. Observamos uma tendência de queda da expressão do VDR no tecido adiposo dos animais dos grupos H e HdVD em relação ao grupo P. Além disso, notamos uma queda significativa ($p < 0,001$) da expressão gênica desse receptor no grupo dVD quando comparado ao grupo P (Figura 6, Tabela e Anexo 3).

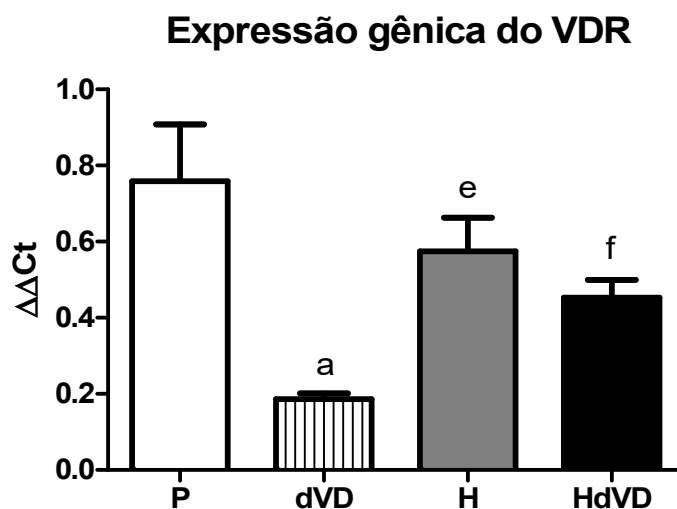


Figura 6 – Expressão gênica do VDR no tecido adiposo avaliada ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depleta em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depleta em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^a $p < 0,001$ vs P; ^e $p < 0,01$, ^f $p < 0,05$ vs dVD.

Apesar de não encontrarmos diferenças significativas entre os grupos estudados, observamos uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de PTH (pg/mL) nos grupos de animais deficientes em vitamina D (dVD e HdVD) em relação aos grupos P e H (Figura 7, Tabela e Anexo 2). Além disso, não observamos diferenças entre os grupos estudados em relação às concentrações plasmáticas de sódio e potássio (mEq/L) e de cálcio e fósforo (mg/dL) (Tabela e Anexo 2).

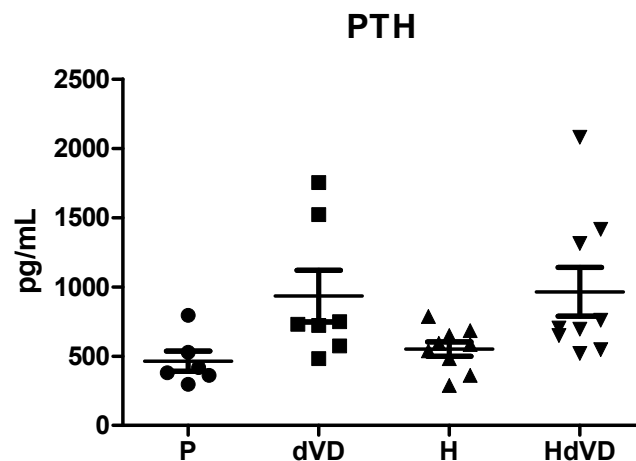


Figura 7 – Concentração plasmática de paratormônio (PTH) avaliada ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média.

Tabela 3. Avaliação da expressão proteica (tecido renal) e gênica (tecido adiposo) ao final dos 90 dias de protocolo em amostras de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), tratados com dieta depletada em vitamina D (dVD), tratados com dieta hiperlipídica (H) ou tratados com dieta hiperlipídica depletada de vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
VDR (%) WB	101,1±0,6	69,6±3,0 ^a	94,5±4,9 ^d	80,7±2,6 ^{aeh}
VDR ($\Delta\Delta Ct$) qPCR	0,76±0,14	0,19±0,01 ^a	0,57±0,08 ^e	0,45±0,04 ^f
Klotho (ng/ μ g) ELISA	0,21±0,01	0,17±0,01 ^b	0,18±0,01 ^c	0,15±0,01 ^b
MCP-1 (ng/ μ g) ELISA	0,248±0,012	0,321±0,010 ^a	0,354±0,019 ^a	0,417±0,016 ^{adh}
Col-3 (ng/ μ g) ELISA	31,44±1,05	36,28±1,82	42,18±2,81 ^b	46,41±2,10 ^{ae}

VDR, receptor de vitamina D; MCP-1, proteína quimiotática para monócitos 1; Col-3, colágeno do tipo III; WB, western blotting. Os dados são expressos como média±EPM. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,05$ vs P; ^d $p < 0,001$, ^e $p < 0,01$, ^f $p < 0,05$ vs dVD; ^h $p < 0,01$ vs H.

Avaliamos a expressão renal de Klotho, proteína indispensável na regulação de fósforo, cálcio, vitamina D e importante marcador precoce de DRC. Observamos uma redução significativa na expressão renal de Klotho (ng/ μ g) nos grupos dVD, H e HdVD quando comparados ao grupo P (Figura 8, Tabela e Anexo 3). Essa alteração foi mais evidente nos grupos de animais que receberam dietas depletadas em vitamina D (dVD e HdVD).

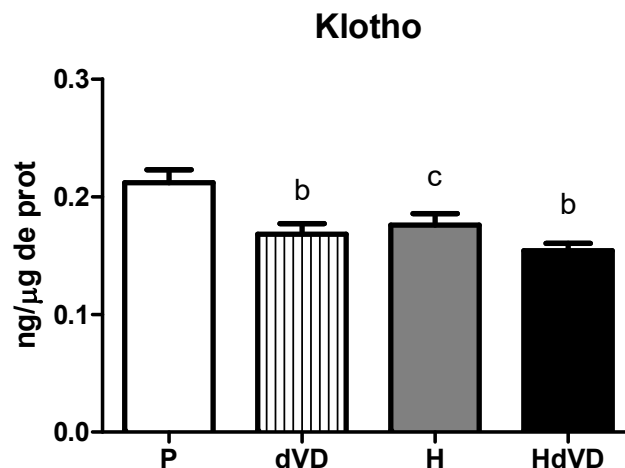


Figura 8 – Quantificação de Klotho avaliada ao final dos 90 dias de protocolo em tecidos renais de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P.

A análise do perfil lipídico deste protocolo experimental permitiu observar ações isoladas tanto das dietas hiperlipídicas (H e HdVD) quanto daquela livre de vitamina D (dVD) nos níveis de colesterol e triglicérides. A avaliação do colesterol (mg/dL) mostrou uma discreta tendência de aumento no grupo dVD e um aumento significativo desse parâmetro no grupo H em relação aos grupos P ($p<0,001$) e dVD ($p<0,05$). Esse aumento dos níveis de colesterol foi mais evidente e significativo ($p<0,001$) no grupo HdVD em relação aos demais grupos estudados (Figura 9A, Tabela e Anexo 4). Complementando o estudo do perfil lipídico, nossos resultados mostram que a dieta livre de vitamina D promoveu um aumento significativo ($p<0,05$) dos níveis de triglicérides (mg/dL) no grupo dVD em relação ao grupo P. Ademais, observamos níveis de triglicérides mais elevados e significativos no grupo H em comparação aos grupos P ($p<0,001$) e dVD ($p<0,01$). Mais notável ainda foi o resultado desse parâmetro no grupo HdVD, o qual apresentou níveis superiores de triglicérides em relação aos demais grupos estudados, demonstrando um desequilíbrio evidente do perfil lipídico na deficiência de vitamina D associada à obesidade (Figura 9B, Tabela e Anexo 4). Não observamos diferença nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, mg/dL) entre os grupos estudados (Tabela e Anexo 4). Em relação aos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL, mg/dL), houve uma

queda significativa deste parâmetro nos grupos alimentados com as dietas ricas em lipídeos (H e HdVD) quando comparados aos grupos P e dVD (Tabela e Anexo 4).

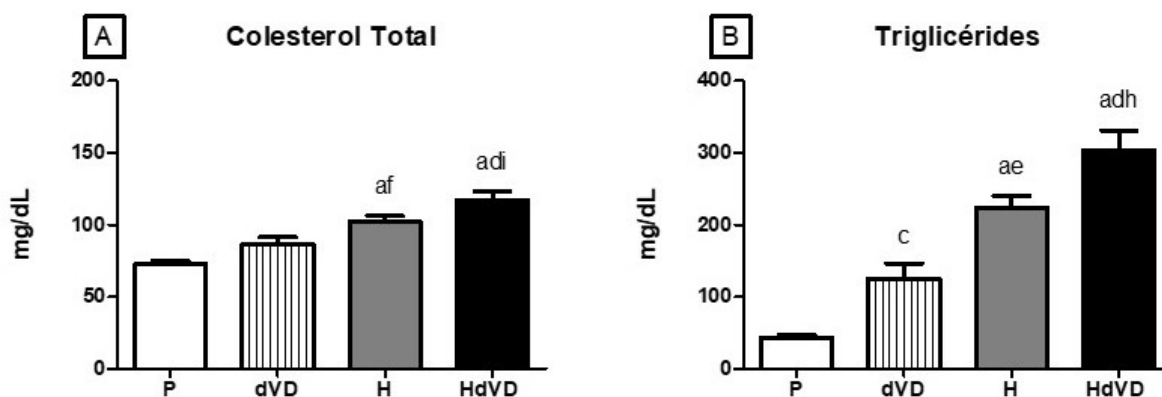


Figura 9 – Concentrações plasmáticas de (A) colesterol total e (B) triglicérides avaliadas ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^a $p < 0,001$, ^c $p < 0,05$ vs P; ^d $p < 0,001$, ^e $p < 0,01$, ^f $p < 0,05$ vs dVD; ^h $p < 0,01$, ⁱ $p < 0,05$ vs H.

Os resultados da glicemia de jejum (mg/dL) mostraram uma tendência de aumento desse parâmetro nos grupos dVD e H em relação ao grupo P (Figura 10, Tabela e Anexo 4). Os animais do grupo HdVD apresentaram um aumento significativo da glicemia de jejum em comparação aos demais grupos de animais (Figura 10, Tabela e Anexo 4).

Observamos um aumento significativo ($p < 0,001$) na concentração plasmática de leptina (ng/mL) nos grupos de animais que receberam dietas hiperlipídicas (H e HdVD) quando comparados aos grupos P e dVD (Figura 11, Tabela e Anexo 4). É importante destacar que essa alteração foi mais notável no grupo HdVD quando comparado aos demais grupos estudados.

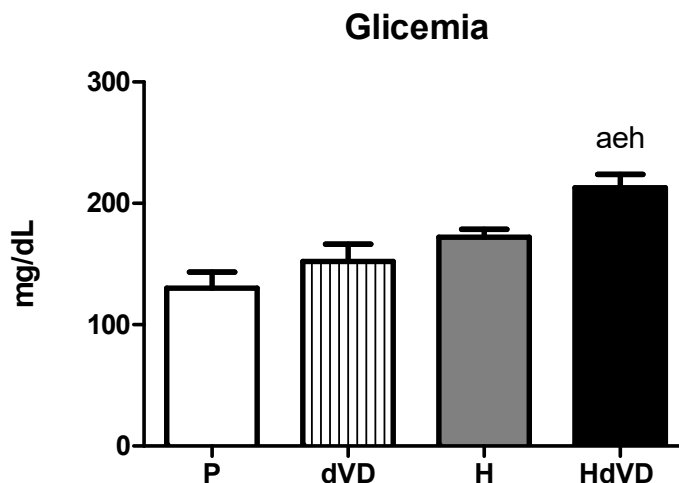


Figura 10 – Glicemia de jejum avaliada ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^ap<0,001 vs P; ^ep<0,01 vs dVD; ^hp<0,01 vs H.

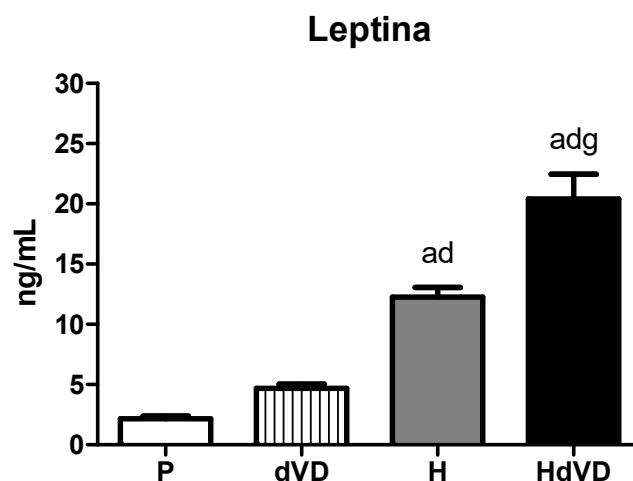


Figura 11 – Concentração plasmática de leptina avaliada ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^ap<0,001 vs P; ^dp<0,001 vs dVD; ^gp<0,001 vs H.

Os parâmetros funcionais e hemodinâmicos também foram avaliados neste estudo. Observamos uma queda significativa da TFG (mL/min/100g de peso corpóreo) nos grupos dVD e HdVD em relação ao grupo P. Além disso, o grupo HdVD apresentou uma queda significativa ($p<0,05$) da TFG em relação ao grupo H (Figura 12, Tabela e Anexo 5).

Tabela 4. Perfil lipídico, glicose e leptina avaliados ao final dos 90 dias de protocolo no plasma de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
Colesterol total (mg/dL)	73±3	86±5	102±4 ^{af}	117±6 ^{adi}
Triglicérides (mg/dL)	44±4	126±21 ^c	224±16 ^{ae}	303±28 ^{adh}
LDL (mg/dL)	11,62±2,30	12,50±1,30	9,56±1,23	10,24±0,94
HDL (mg/dL)	50,62±2,30	52,42±3,65	43,70±1,66 ^{cf}	42,53±1,40 ^{cf}
Glicose (mg/dL)	130±13	152±14	172±6	213±11 ^{ae}
Leptina (ng/mL)	2,17±0,20	4,69±0,35	12,26±0,81 ^{ad}	20,42±2,04 ^{adg}

LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05 vs dVD; ^gp<0,001, ^hp<0,01, ⁱp<0,05 vs H.

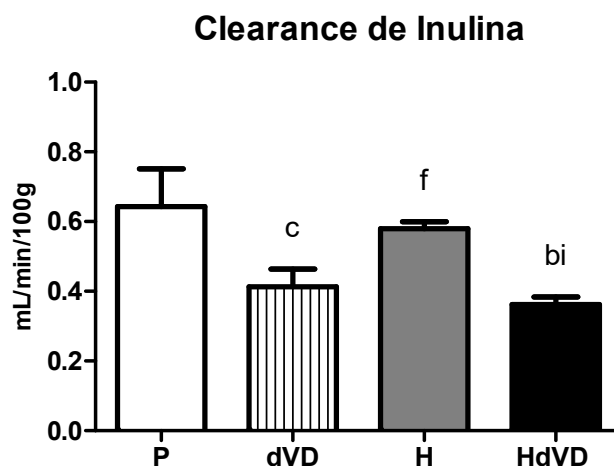


Figura 12 – Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada pelo clearance de inulina ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^fp<0,05 vs dVD; ⁱp<0,05 vs H.

Foi observada uma queda significativa ($p<0,05$) do volume urinário (mL/24h) nos grupos dVD, H e HdVD em relação ao grupo P (Figura 13A, Tabela e Anexo 5). Em relação à proteinúria (mg/24h), nossos resultados mostraram uma discreta tendência de aumento desse parâmetro no grupo dVD em relação aos grupos P e H e um aumento significativo ($p<0,05$) no grupo HdVD em relação ao grupo H (Figura 13B, Tabela e Anexo 5).

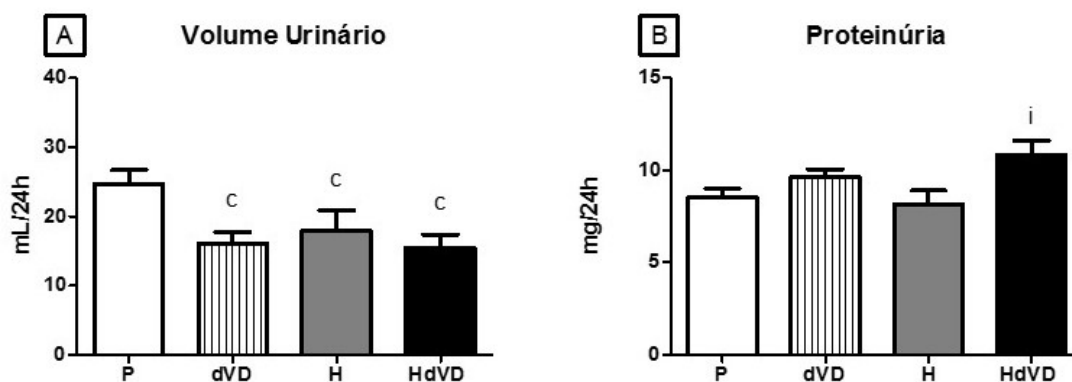


Figura 13 – (A) Volume urinário e (B) proteinúria avaliados ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^c $p < 0,05$ vs P, ⁱ $p < 0,05$ vs H.

Avaliamos a expressão glomerular da aminopeptidase P (JG12), um marcador específico para o endotélio vascular glomerular. Para isso, aferimos inicialmente a área glomerular (μm^2), na qual não observamos diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela e Anexo 6). Quanto a avaliação da expressão de JG12 (%) por área glomerular (μm^2), observamos uma redução significativa ($p < 0,001$) nos grupos dVD e H quando comparados ao grupo P. Essa redução foi mais evidente nos animais do grupo HdVD, com expressão de JG12 notavelmente diminuída em comparação aos demais grupos (Figura 14 Tabela e Anexo 6). Essas alterações no endotélio vascular glomerular estimadas pela expressão de JG12 possivelmente contribuíram para as modificações observadas na função renal dos animais do grupo HdVD.

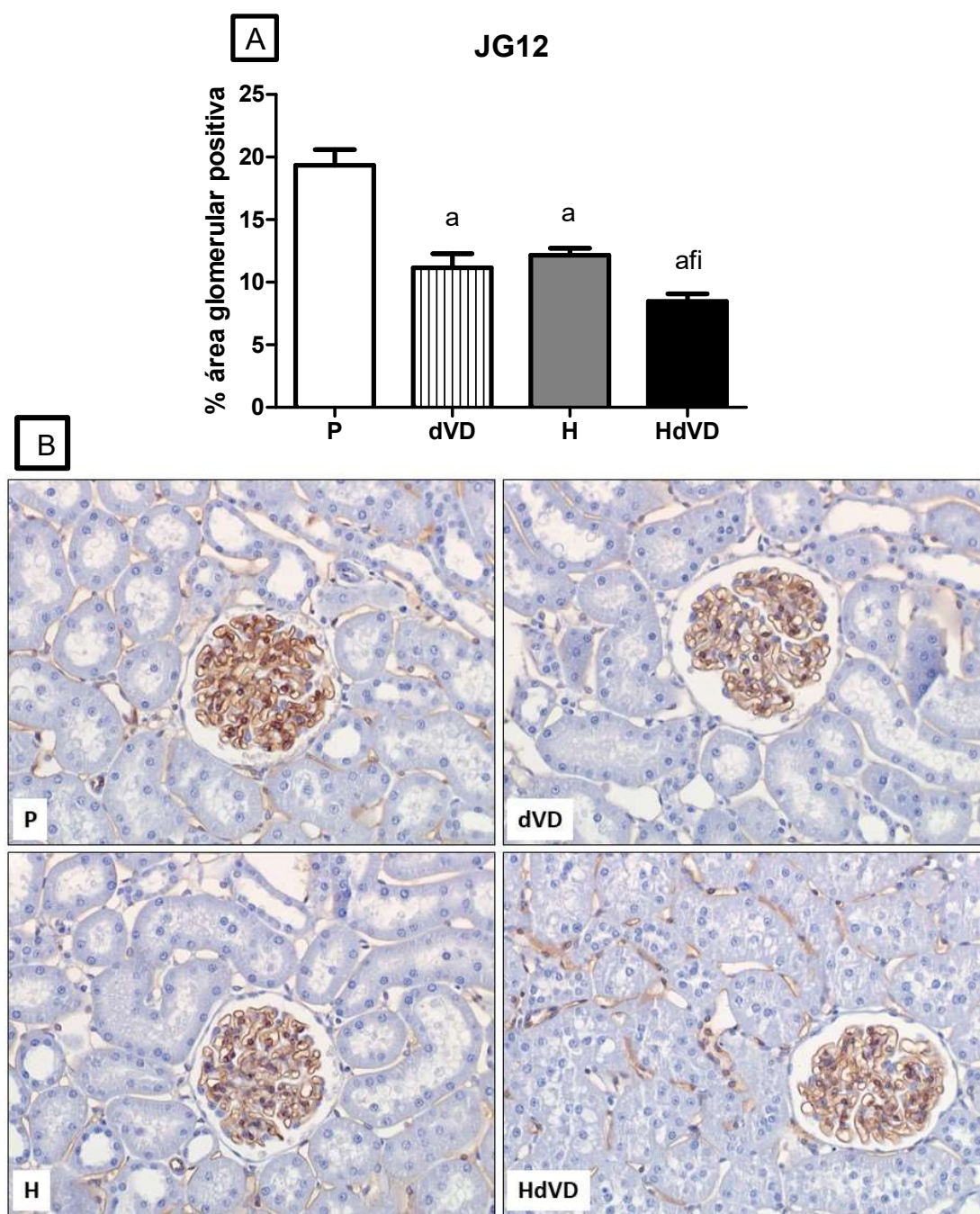


Figura 14 – Expressão da aminopeptidase P (JG12) por área glomerular no tecido renal. (A) Gráfico de barras da expressão de JG12 avaliada ao final dos 90 dias de protocolo de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para JG12 de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média±EPM. ^a $p < 0,001$ vs P; ^f $p < 0,05$ vs dVD; ⁱ $p < 0,05$ vs H.

Os grupos dVD, H e principalmente o HdVD apresentaram um aumento significativo da PAM (mmHg) em relação ao grupo P (Figura 15A, Tabela e Anexo 5). Corroborando os achados referentes à PAM, observamos um aumento significativo ($p < 0,001$) da concentração plasmática (pg/mL) de Ang II nos grupos dVD, H e HdVD em relação ao grupo P. Essa alteração foi mais evidente nos animais do grupo HdVD, o qual apresentou um aumento significativo quando comparado aos demais grupos estudados (Figura 15B, Tabela e Anexo 5). Nossos resultados referentes à avaliação da expressão tecidual (pg/ μ g) da Ang II mostram que, embora sem significância, houve uma tendência de aumento desse polipeptídeo nos grupos dVD, H e HdVD em relação ao grupo P (Figura 15C, Tabela e Anexo 5). Esses achados foram acompanhados pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de aldosterona (pg/mL) nos grupos dVD, H e HdVD em relação ao grupo P (Figura 15D, Tabela e Anexo 5).

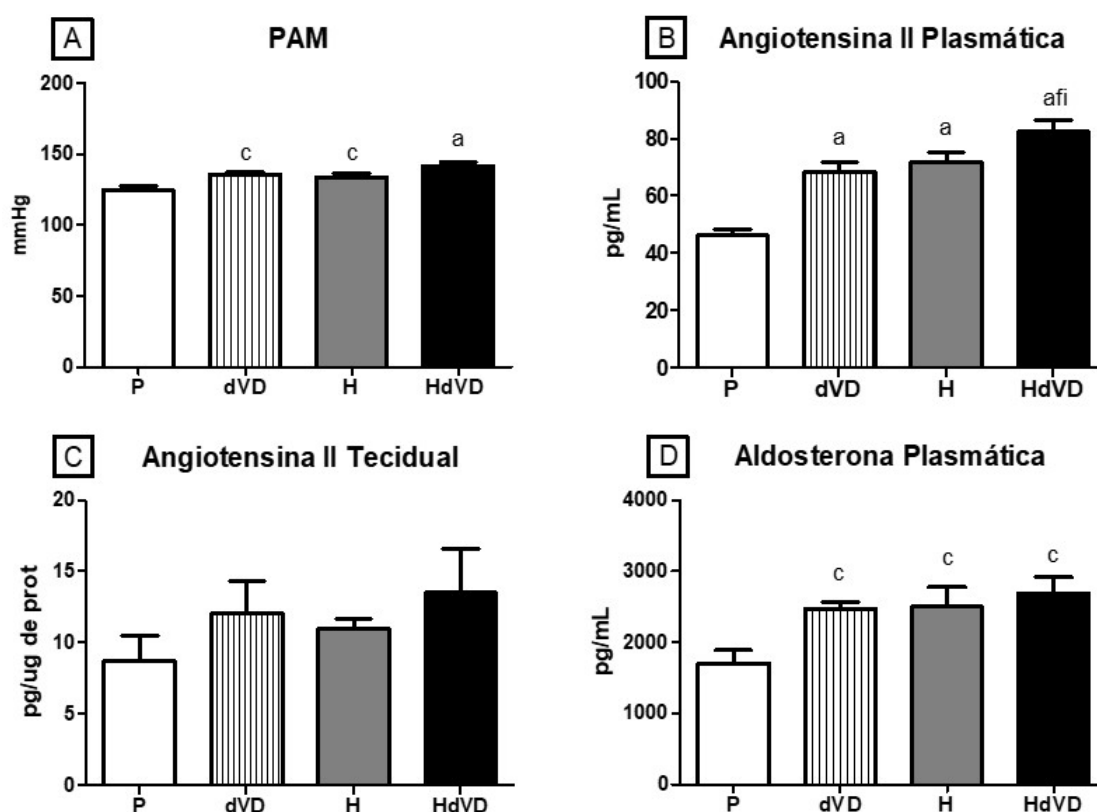


Figura 15 – (A) Pressão arterial média (PAM), (B) concentração plasmática de angiotensina II (Ang II), (C) quantificação de angiotensina II (Ang II) no tecido renal e (D) concentração plasmática de aldosterona avaliadas ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$, ^c $p < 0,05$ vs P; ^{fi} $p < 0,05$ vs dVD; ⁱ $p < 0,05$ vs H.

Tabela 5. Parâmetros funcionais e hemodinâmicos obtidos ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
C _{in} (mL/min/100g)	0,64±0,11	0,41±0,05 ^c	0,58±0,02 ^f	0,36±0,02 ^{bi}
VU (mL/24h)	25±2	16±2 ^c	18±3 ^c	15±2 ^c
Proteinúria (mg/24h)	8,51±0,50	9,65±0,41	8,18±0,71	10,83±0,77 ⁱ
PAM (mmHg)	124±3	135±2 ^c	134±3 ^c	142±2 ^a
P _{Ang II} (pg/mL)	139,6±9,2	150,2±6,1 ^a	152,0±6,0 ^a	148,0±3,0 ^{afi}
Ang II tecidual (pg/μg)	8,79±1,74	12,07±2,25	11,00±0,75	13,61±3,03
P _{Aldo} (pg/mL)	1705±182	2467±103 ^c	2500±274 ^c	2683±235 ^c
FSR (mL/min)	6,06±0,15	6,59±0,15	5,20±0,30 ^{ce}	4,82±0,22 ^{bd}
RVR (mmHg/mL/min)	21,26±1,20	21,80±0,95	23,67±1,43	26,68±0,88 ^{cf}

C_{in}, clearance de inulina; VU, volume urinário; PAM, pressão arterial média; P_{Ang II}, angiotensina II plasmática; Ang II tecidual; P_{Aldo}, aldosterona plasmática; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05 vs dVD; ⁱp<0,05 vs H.

Ainda em referência aos parâmetros hemodinâmicos, observamos uma queda significativa do fluxo sanguíneo renal (FSR, mL/min) nos grupos H e HdVD em relação aos grupos P e dVD (Figura 16A, Tabela e Anexo 5). Além disso, o grupo H apresentou uma discreta tendência de aumento da resistência vascular renal (RVR, mmHg/mL/min), enquanto o grupo HdVD mostrou um aumento significativo (p<0,05) desse parâmetro em relação aos grupos P e dVD (Figura 16B, Tabela e Anexo 5).

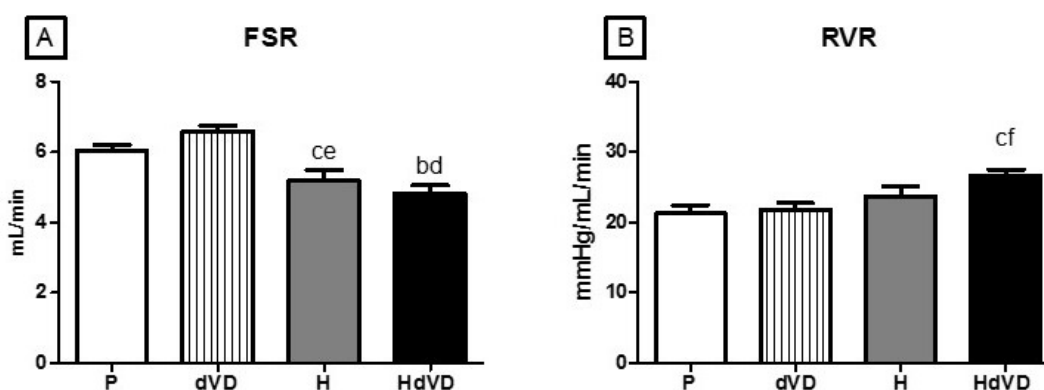


Figura 16 – (A) Fluxo sanguíneo renal (FSR) e (B) resistência vascular renal (RVR) avaliados ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05 vs dVD.

Alterações morfológicas e inflamatórias caracterizam o início da injúria renal e participam ativamente da progressão da doença renal. Começamos a investigação de parâmetros inflamatórios avaliando a expressão da proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1, ng/ μ g) no tecido renal. Nossos resultados mostraram um aumento significativo ($p < 0,001$) da expressão renal da MCP-1 nos grupos dVD e H em relação ao grupo P. Essa alteração foi mais evidente no grupo HdVD, o qual apresentou um aumento significativo quando comparado aos demais grupos estudados neste protocolo experimental (Figura 17, Tabela e Anexo 3).

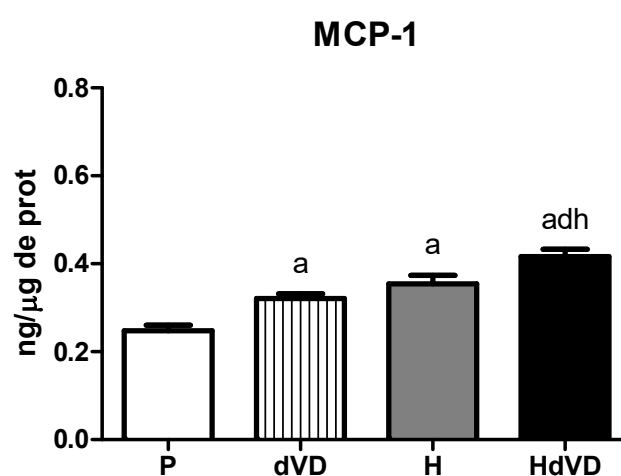


Figura 17 – Quantificação da proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no tecido renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$ vs P; ^d $p < 0,001$ vs dVD; ^h $p < 0,01$ vs H.

A fim de avaliar o infiltrado inflamatório no tecido renal, determinamos a expressão de células CD68+ [ou ED1+ (%)], que compreende o conjunto de macrófagos dos tipos M1 e M2. Foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão de células CD68+ nos grupos dVD, H e HdVD quando comparados ao grupo P (Figura 18, Tabela e Anexo 6). A título de conhecimento e diferenciação entre os subtipos de macrófagos, avaliamos a expressão de células CD206+ (receptor de manose; %), as quais se referem aos macrófagos do subtipo M2. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, observamos uma tendência de redução na expressão de células CD206+ nos grupos dVD, H e HdVD em relação ao grupo P (Figura 19, Tabela e Anexo 6).

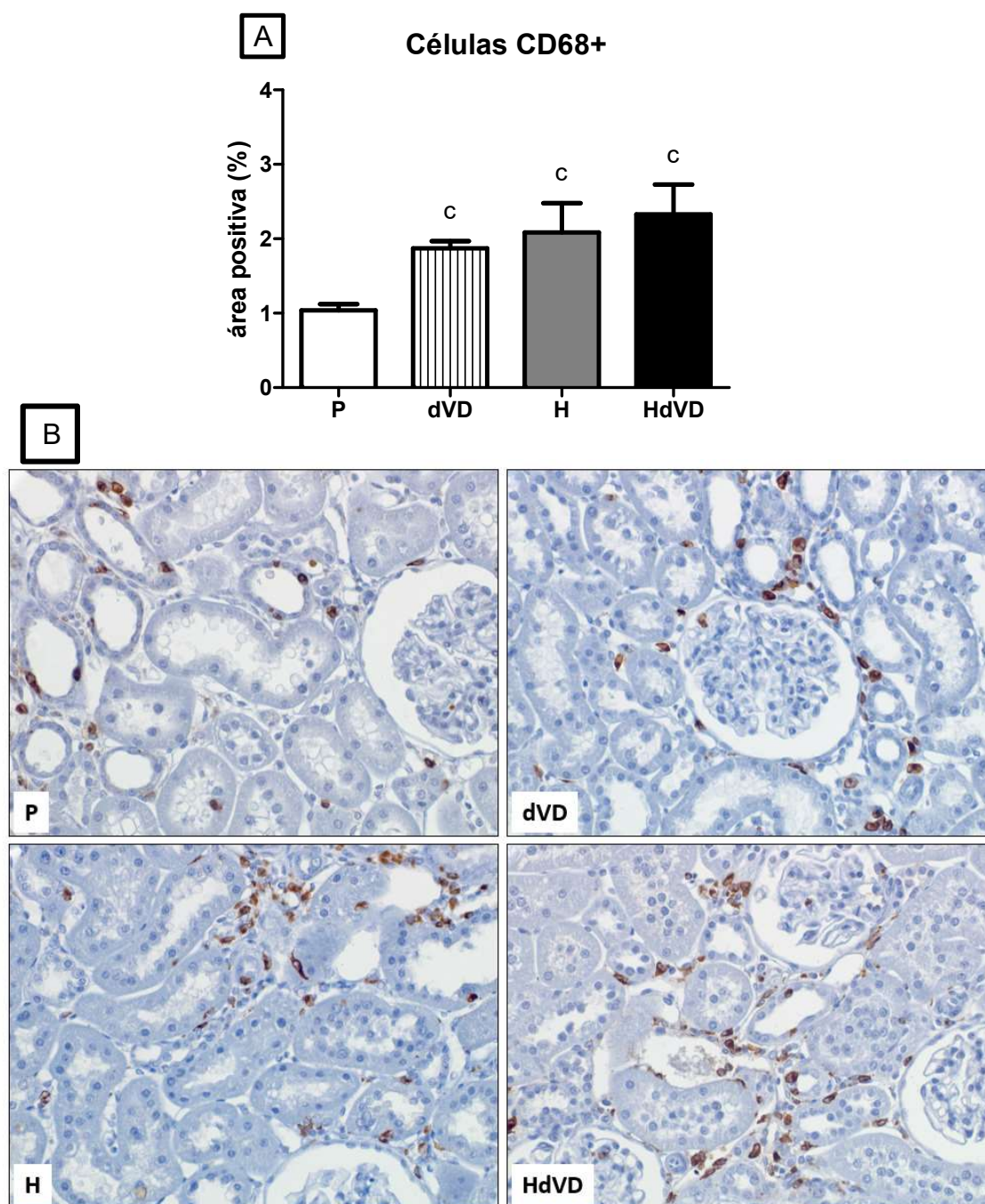


Figura 18 – Expressão de células CD68+ (macrófagos M1+M2) no córtex renal. (A) Gráfico de barras da quantificação de células CD68+ avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de e isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para CD68+ no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média±EPM. $^c p < 0,05$ vs P.

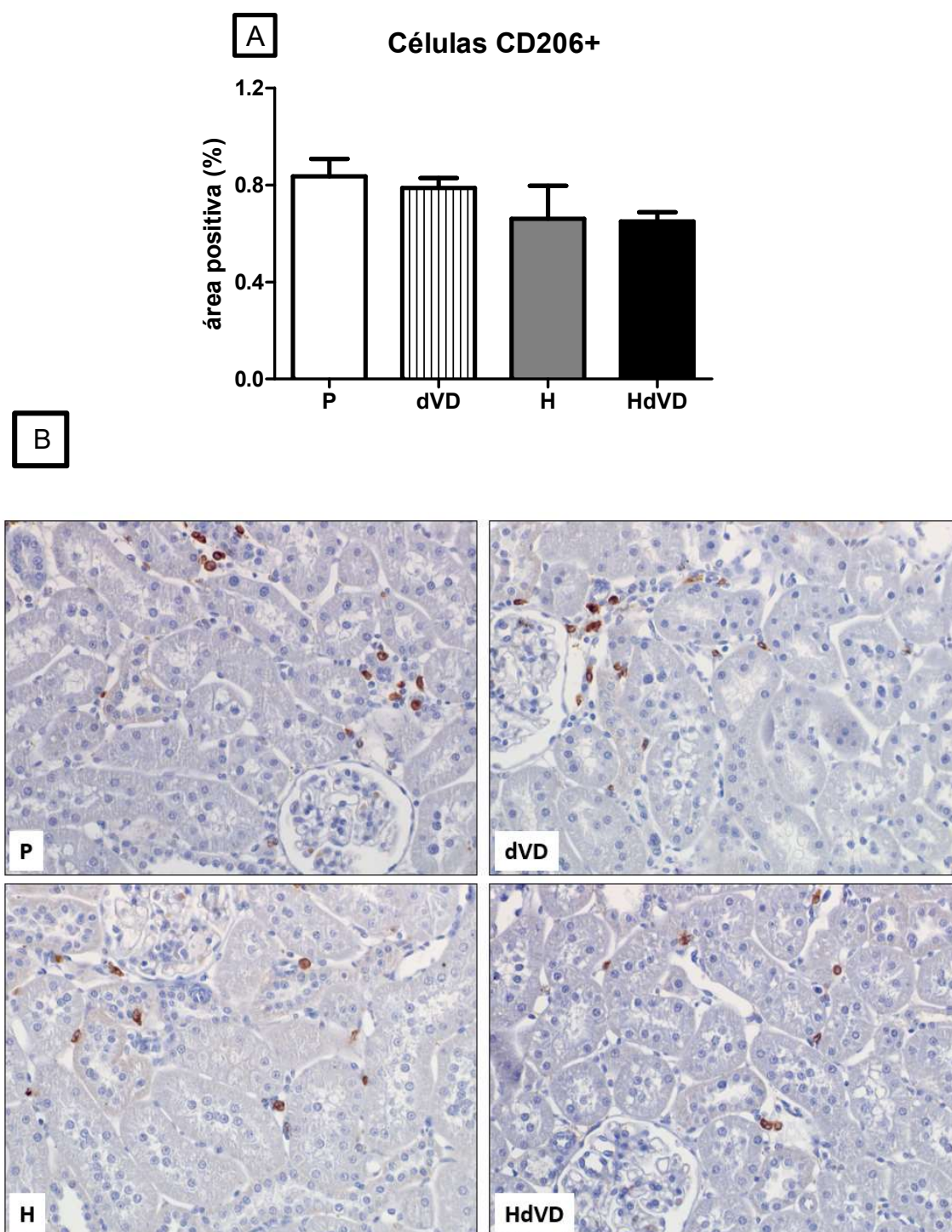


Figura 19 – Expressão de células CD206+ (macrófagos M2) no córtex renal. (A) Gráfico de barras e da quantificação de células CD206+ avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de e isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para CD206+ no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x).

Esse resultado é mais notável ao se observar o balanço da expressão entre células CD68+ (M1+M2) e células CD206+ (M2), havendo predomínio da expressão de macrófagos do tipo M2 no grupo P em relação aos demais grupos (Figura 20).

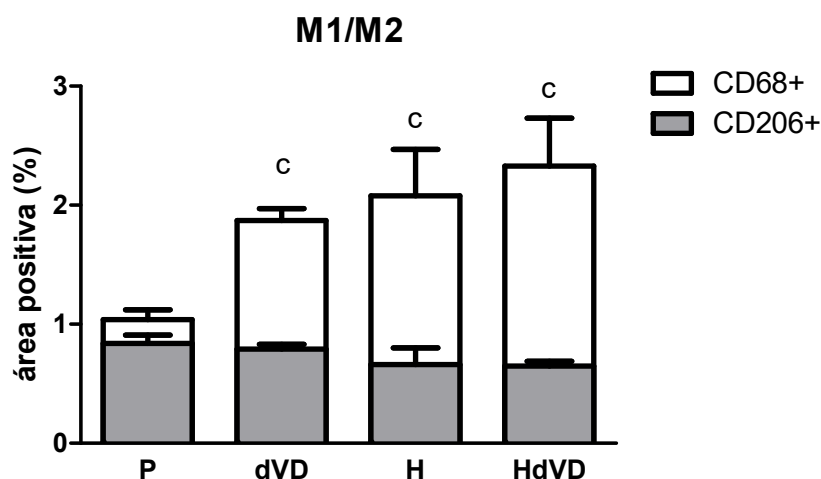


Figura 20 – Gráfico ilustrativo do balanço da expressão de macrófagos M1 e M2 avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média±EPM. ^cp<0,05 vs P.

Prosseguindo com a avaliação de células inflamatórias, os grupos de animais dVD e H apresentaram uma tendência de aumento na expressão de células T [CD3+ (%)] quando comparados ao grupo P. A associação da deficiência de vitamina D e obesidade no grupo HdVD resultou em um aumento importante e significativo (p<0,001) na expressão dessas células inflamatórias quando comparado aos demais grupos de animais estudados (Figura 21, Tabela e Anexo 6).

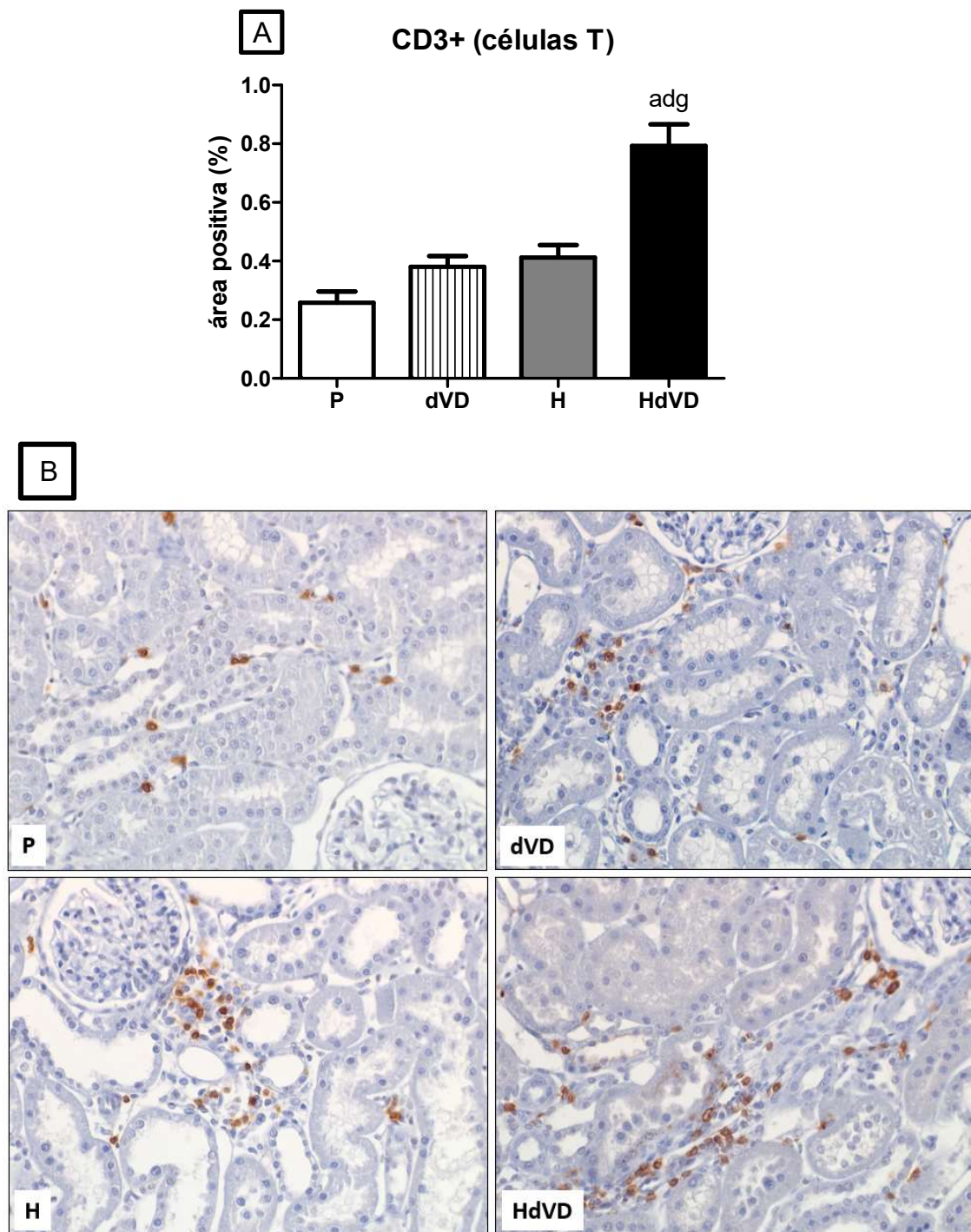


Figura 21 – Expressão de células CD3+ (células T) no córtex renal. (A) Gráfico de barras e da expressão de células CD3+ (B) Imunolocalização representativa de células CD3+ avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depleta em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depleta em vitamina D (HdVD) Fotomicrografias representativas da imunorreação para CD3+ no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média±EPM. ^ap<0,001 vs P; ^dp< 0,001 vs dVD; ^gp<0,001 vs H.

Tabela 6. Análise histomorfológica e avaliação imuno-histoquímica ao final dos 90 dias de protocolo em tecidos renais de ratos submetidos ao insulto isquêmico tratados com dieta padrão (P), tratados com dieta depletada em vitamina D (dVD), tratados com dieta hiperlipídica (H) ou tratados com dieta hiperlipídica depletada de vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
AG (μm^2)	8934 \pm 215	8927 \pm 128	9230 \pm 210	8670 \pm 166
JG12 (%)	19,34 \pm 1,26	11,16 \pm 1,12 ^a	12,15 \pm 0,58 ^a	8,46 \pm 0,61 ^{af}
CD68+ (%)	1,04 \pm 0,08	1,87 \pm 0,10 ^c	2,08 \pm 0,39 ^c	2,33 \pm 0,40 ^c
CD206+ (%)	0,83 \pm 0,07	0,79 \pm 0,04	0,66 \pm 0,14	0,65 \pm 0,04
CD3+ (%)	0,26 \pm 0,04	0,38 \pm 0,04	0,41 \pm 0,04	0,79 \pm 0,07 ^{adg}
TGF- β (%)	1,88 \pm 0,24	3,79 \pm 0,44 ^b	3,26 \pm 0,30 ^b	6,11 \pm 0,46 ^{adg}
Fibronectina (%)	3,60 \pm 0,10	7,05 \pm 0,88 ^c	6,20 \pm 0,62 ^c	8,98 \pm 1,14 ^{ai}
α -SMA (%)	2,98 \pm 0,21	3,99 \pm 0,54	6,18 \pm 0,63 ^{cf}	8,81 \pm 1,36 ^{adi}
Vimentina (%)	2,88 \pm 0,38	6,04 \pm 0,97 ^c	5,01 \pm 0,77	6,43 \pm 0,63 ^c
PCNA (%)	0,55 \pm 0,07	0,60 \pm 0,17	0,51 \pm 0,07	1,13 \pm 0,16 ^{cfi}
AIR (%)	16,07 \pm 0,63	19,19 \pm 1,23	21,05 \pm 0,74 ^c	29,11 \pm 1,58 ^{adg}

AG, área glomerular; JG12, aminopeptidase P; CD68+, células CD68 positivas (macrófagos M1+M2); CD206+, células CD206 positivas (macrófagos M2); CD3+, células T positivas; TGF- β , fator de crescimento transformante β ; α -SMA, α -actina de músculo liso; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; AIR, área intersticial relativa. Os dados são expressos como média \pm EPM. ^a p <0,001, ^b p <0,01, ^c p <0,05 vs P; ^d p <0,001, ^e p <0,01, ^f p <0,05 vs dVD; ^g p <0,001, ^h p <0,01, ⁱ p <0,05 vs H.

Por análise imuno-histoquímica avaliamos a expressão renal do TGF- β (%), considerado o principal mediador pró-fibrótico na progressão da doença renal. Observamos que a influência isolada tanto da deficiência de vitamina D quanto da obesidade contribuíram para o aumento significativo (p <0,001) da expressão renal dessa citocina nos grupos dVD e H quando comparados ao grupo P. Ainda mais evidente, a associação desses fatores de risco promoveu uma elevação significativa na expressão renal do TGF- β no grupo HdVD em relação aos demais grupos estudados (Figura 22, Tabela e Anexo 6).

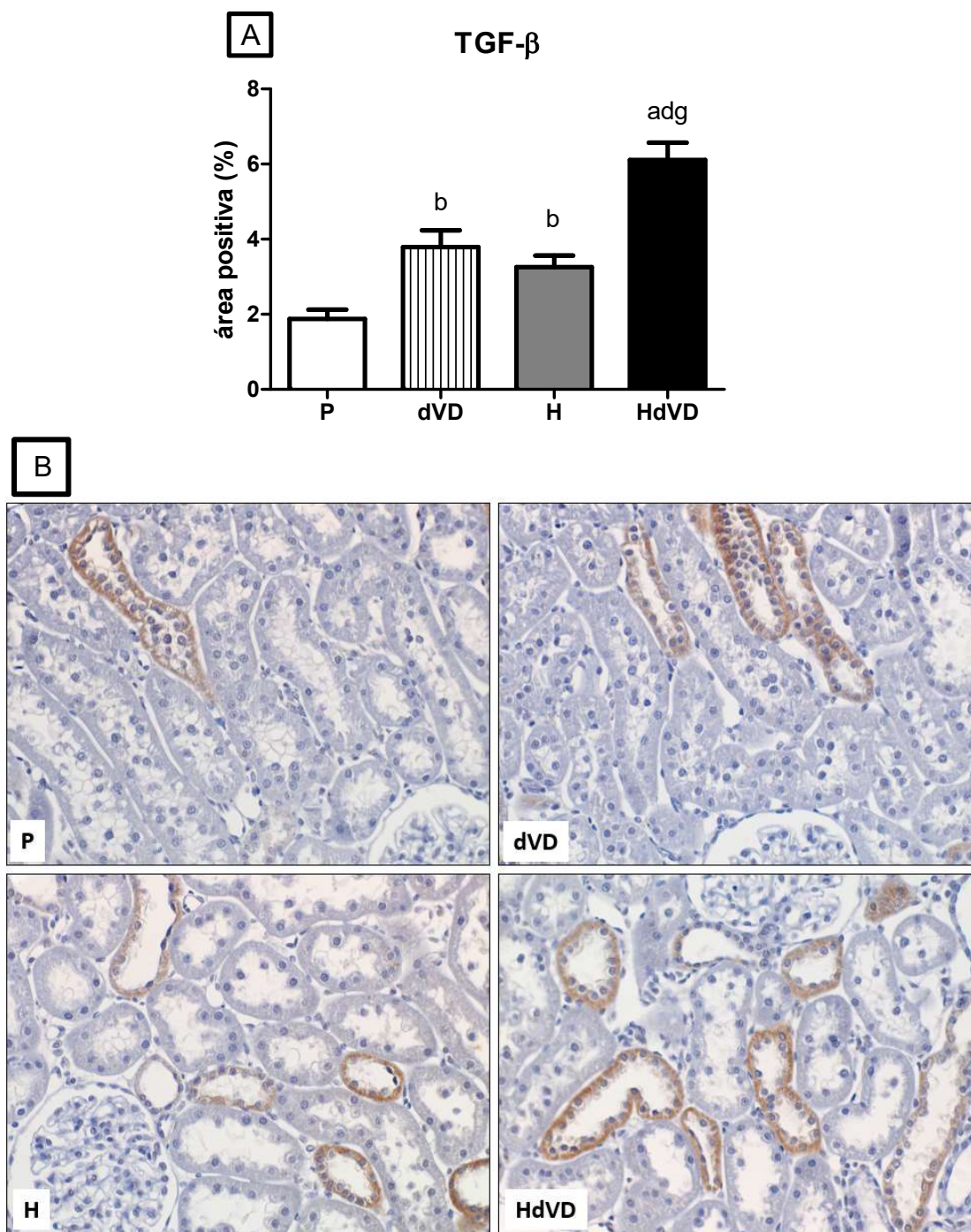


Figura 22 – Expressão do fator de crescimento transformante β (TGF- β) no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de TGF- β avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para TGF- β no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$ vs P; ^d $p < 0,001$ vs dVD; ^g $p < 0,001$ vs H.

Para avaliação da produção e secreção de componentes da MEC gerados a partir da ativação de fibroblastos, quantificamos o Col-3 (ng/ μ g) e a fibronectina (%) no tecido renal. Nossos resultados mostraram uma discreta tendência de aumento na quantificação de Col-3 no grupo dVD em relação ao grupo P. O grupo H apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) na quantificação de Col-3 em relação ao grupo P. Esse aumento foi mais acentuado no grupo HdVD em relação aos grupos P e dVD (Figura 23, Tabela e Anexo 3). Além disso, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão de fibronectina (%) nos grupos dVD e H quando comparados ao grupo P. O grupo HdVD apresentou um aumento ainda mais evidente e significativo na expressão renal de fibronectina quando comparado aos grupos P e H (Figura 24, Tabela e Anexo 6).

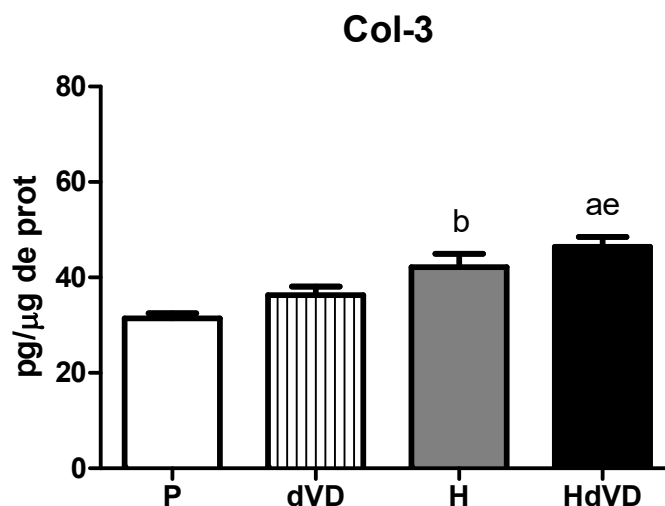


Figura 23 – Quantificação de colágeno do tipo 3 (Col-3) no tecido renal avaliado ao final dos 90 dias de protocolo de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$ vs P; ^e $p < 0,01$ vs dVD.

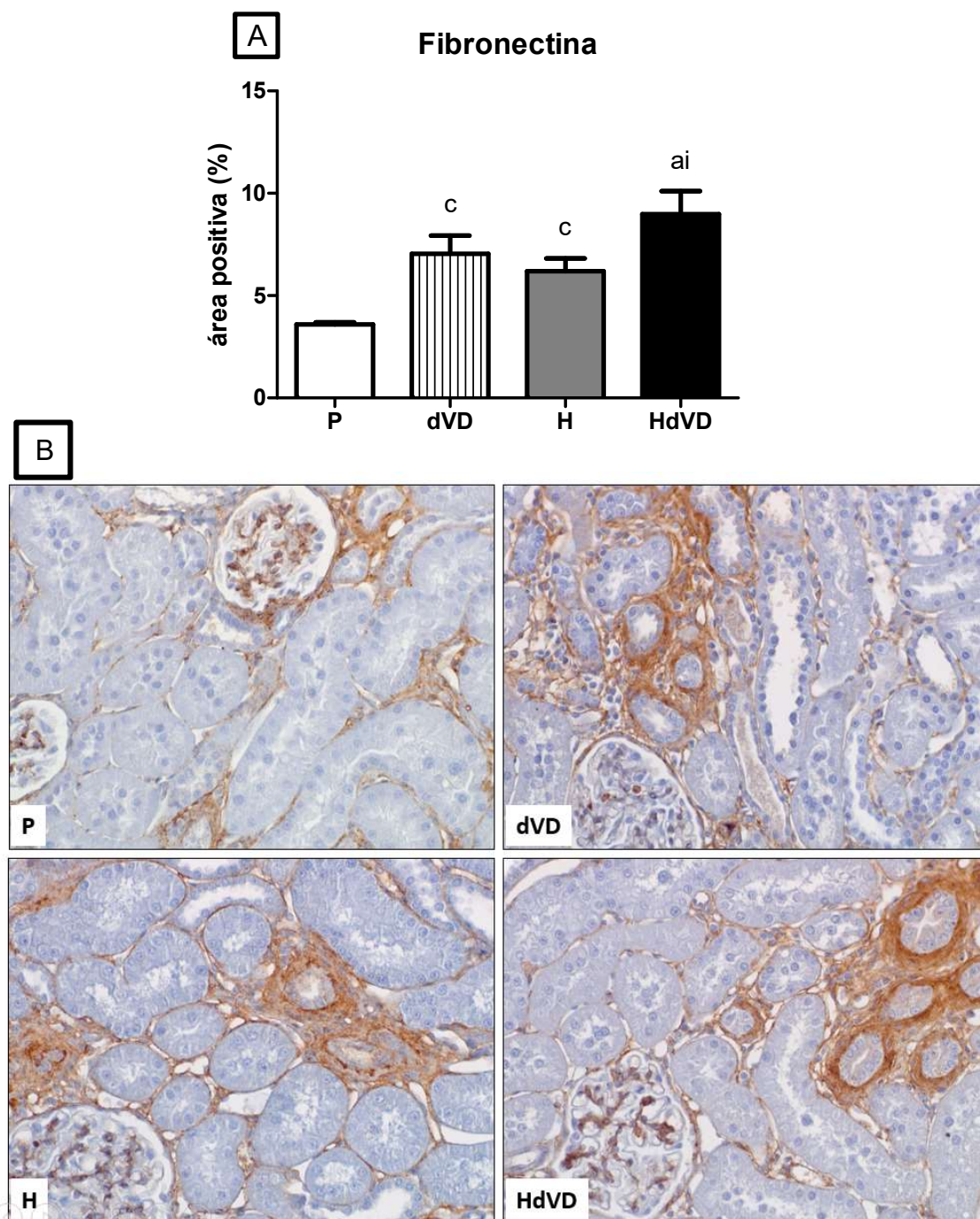


Figura 24 – Expressão de fibronectina no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de fibronectina avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para fibronectina no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^cp<0,05 vs P; ⁱp<0,05 vs H.

Complementando os achados anteriores, estudamos a presença de marcadores de alteração fenotípica no tecido renal dos animais deste protocolo. A avaliação da expressão α -SMA (%), revelou uma discreta tendência de aumento deste marcador no grupo dVD em relação ao grupo P. Além disso, foi observado um aumento significativo desse parâmetro no grupo H quando comparado aos grupos P e dVD. Ainda mais evidente, o grupo HdVD apresentou uma maior expressão de α -SMA no tecido renal quando comparado aos demais grupos estudados (Figura 25, Tabela e Anexo 6). Em seguida, avaliamos a expressão renal de vimentina (%), outro importante marcador de alteração fenotípica. Observamos uma tendência de aumento na expressão renal de vimentina no grupo H quando comparado ao grupo P e um aumento significativo ($p < 0,05$) nos grupos que receberam dietas depletadas em vitamina D (dVD e HdVD) quando comparados ao grupo P (Figura 26, Tabela e Anexo 6).

Foram também realizados estudos imuno-histoquímicos para a estimativa da proliferação celular no tecido renal (PCNA, %). Verificamos um aumento evidente e significativo ($p < 0,05$) da proliferação celular no grupo HdVD em relação aos demais grupos estudados neste protocolo experimental (Figura 27, Tabela e Anexo 6).

Por fim, mensuramos o comprometimento túbulo-intersticial levando em consideração a presença de infiltrado inflamatório e fibrose no tecido renal. Foram realizados estudos histomorfométricos para a análise da expansão da área intersticial relativa (AIR, %). Nossos resultados revelaram uma tendência de aumento da AIR no grupo dVD em relação ao grupo P. Além disso, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) da AIR no grupo H em relação ao grupo P. O grupo HdVD apresentou um aumento mais evidente e significativo ($p < 0,001$) da AIR em relação aos demais grupos estudados (Figura 28, Tabela e Anexo 6).

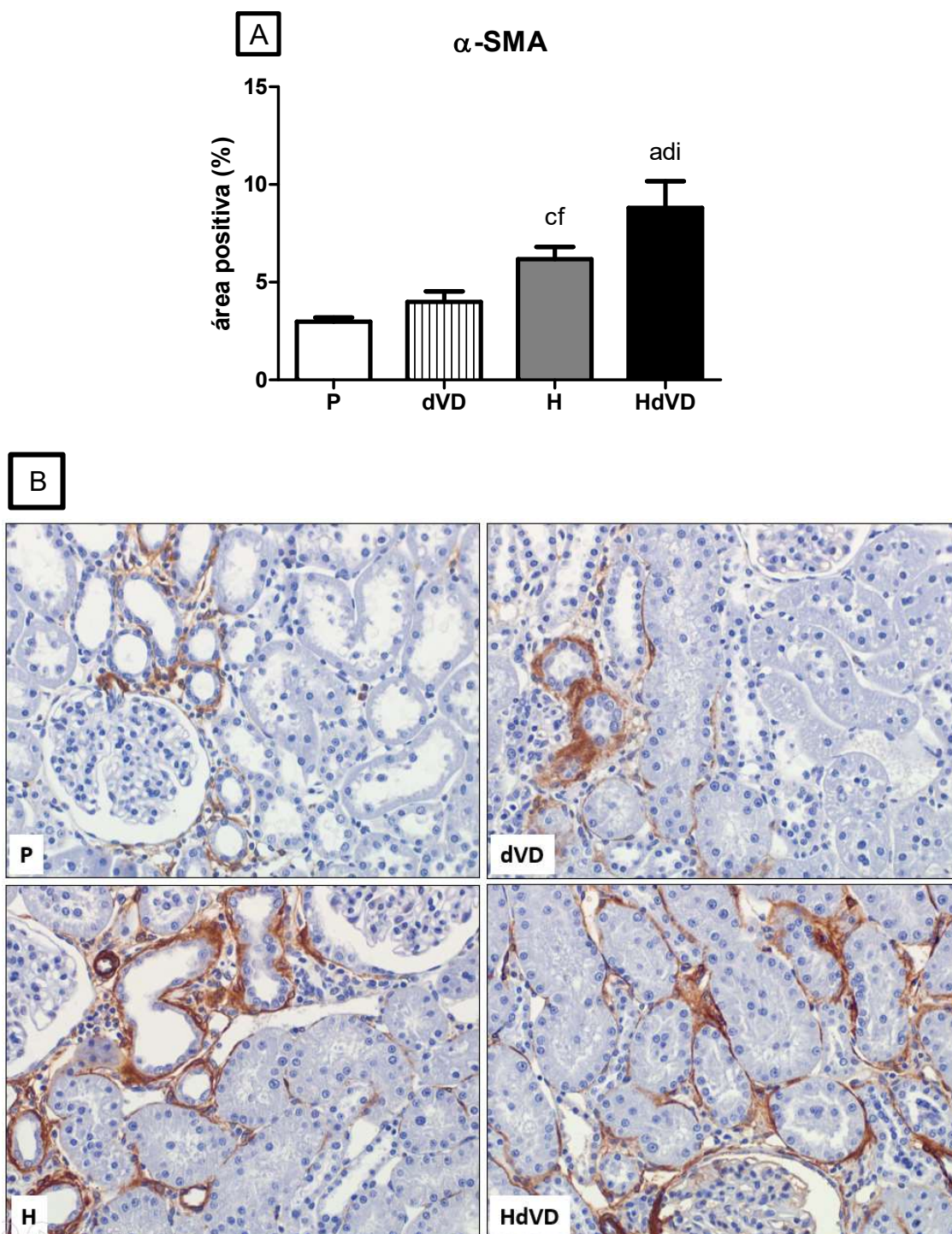


Figura 25 – Expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de α -SMA avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para α -SMA no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média \pm EPM. ^a $p < 0,001$, ^c $p < 0,05$ vs P; ^d $p < 0,001$, ^f $p < 0,05$ vs dVD; ⁱ $p < 0,05$ vs H.

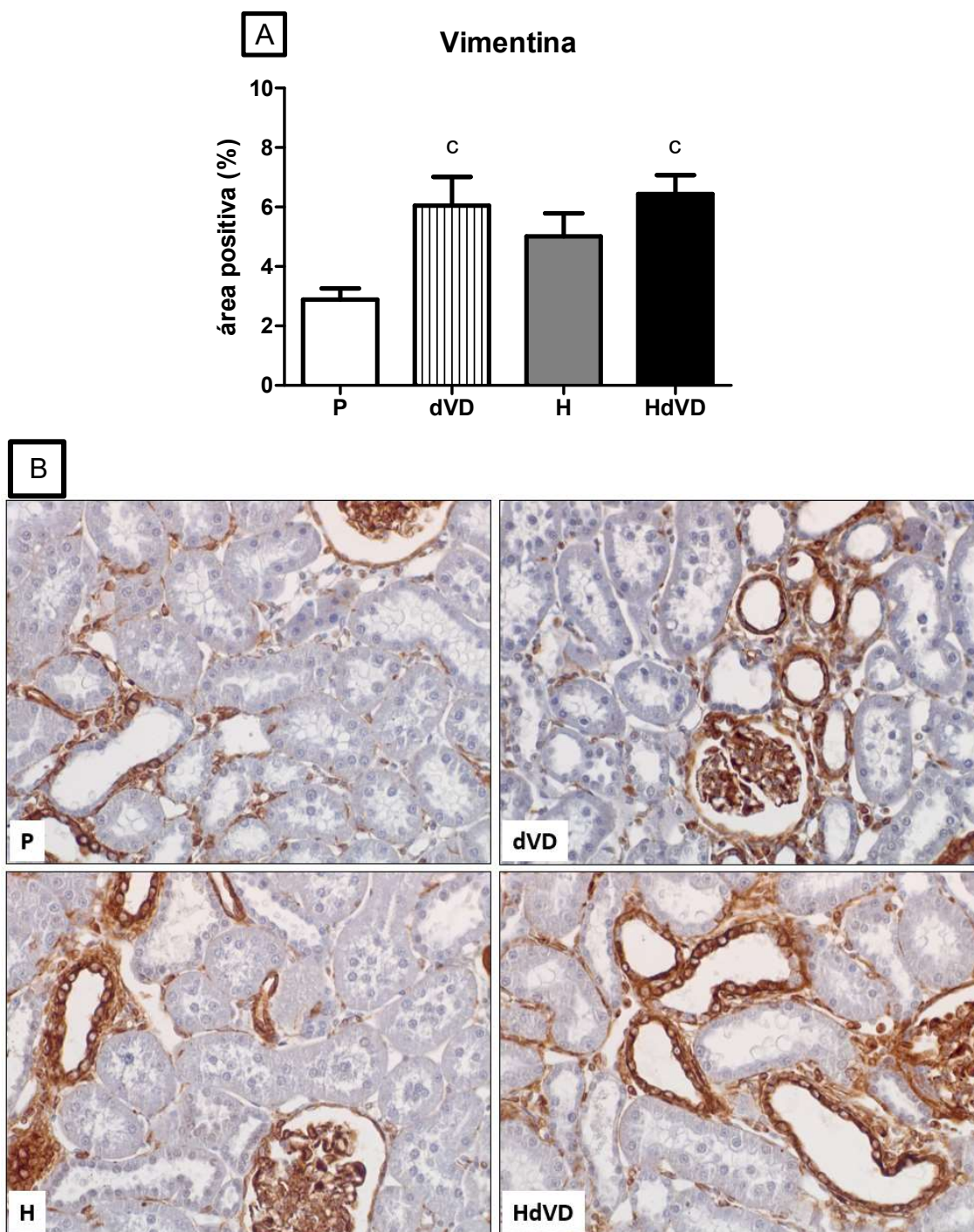


Figura 26 – Expressão de vimentina no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão de vimentina avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para vimentina no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média±EPM. ^cp<0,05 vs P.

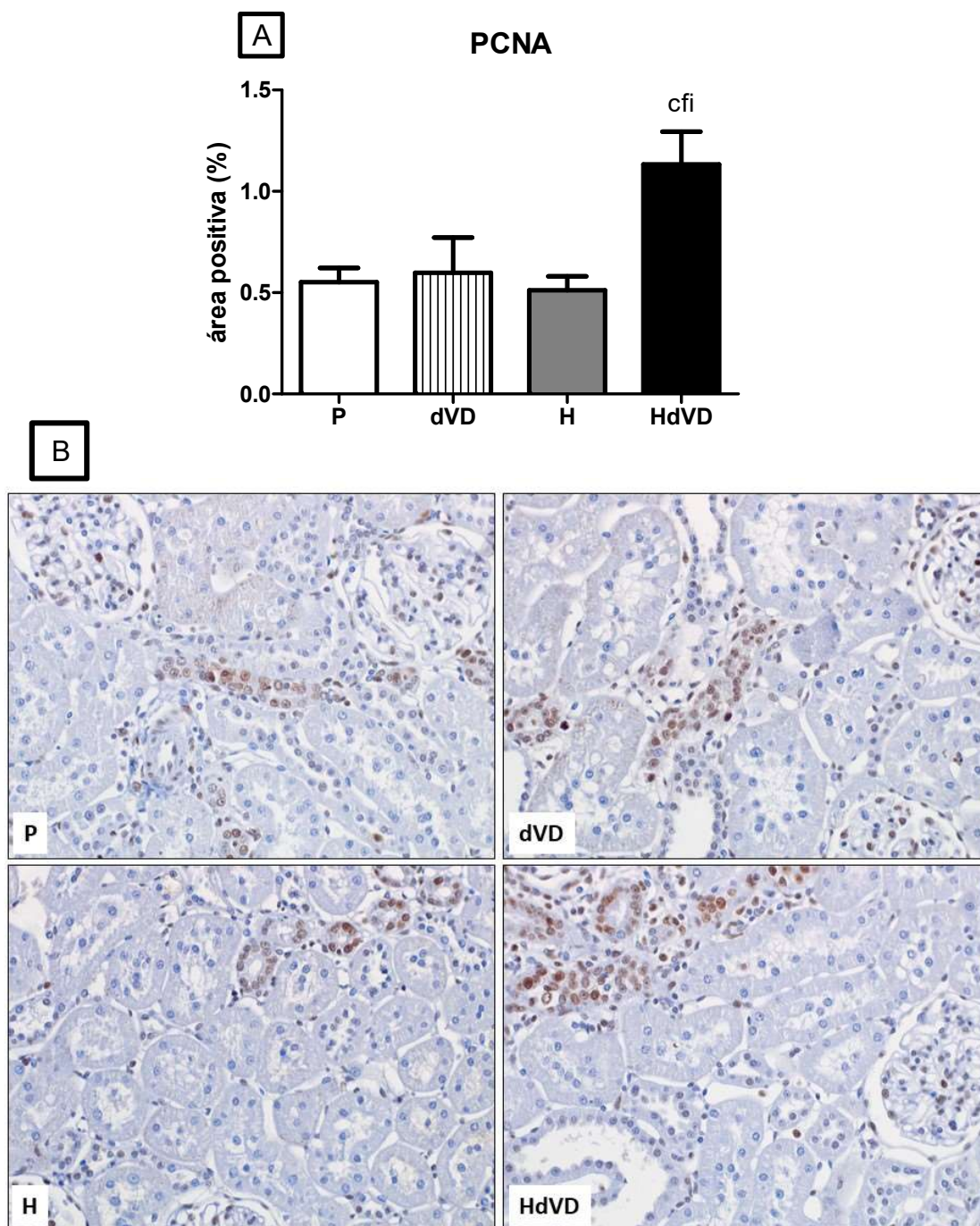


Figura 27 – Expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no córtex renal. (A) Gráfico de barras da expressão do PCNA avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da imunorreação para PCNA no córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média±EPM. ^c $p < 0,05$ vs P; ^f $p < 0,05$ vs dVD; ⁱ $p < 0,05$ vs H.

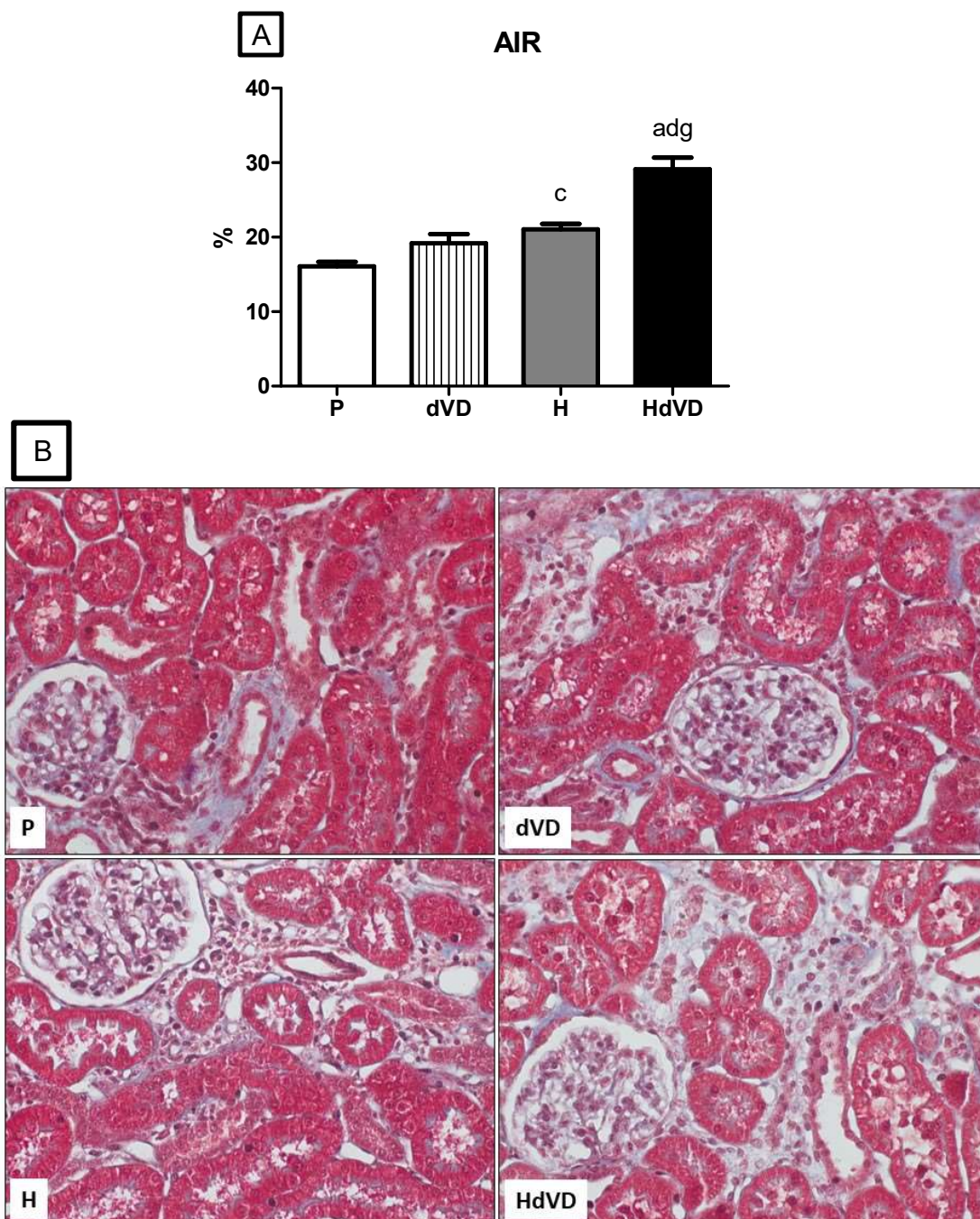


Figura 28 – Avaliação da área intersticial relativa (AIR) (%) no córtex renal. (A) Gráfico de barras da AIR avaliada ao final dos 90 dias de protocolo no córtex renal de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD). (B) Fotomicrografias representativas da AIR do córtex renal de um rato P, dVD, H e HdVD (400x). Valores expressos como média±EPM. ^a $p < 0,001$, ^c $p < 0,05$ vs P; ^d $p < 0,001$ vs dVD; ^g $p < 0,001$ vs H.

5. DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostram que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica livre de vitamina D e submetidos ao insulto de I/R renal apresentaram níveis indetectáveis de vitamina D e alterações no perfil antropométrico, tais como aumento de peso corpóreo, do índice de massa corporal e das circunferências abdominal e torácica ao final dos 90 dias de protocolo experimental. Além disso, foram verificadas mudanças no perfil metabólico incluindo aumento dos níveis de colesterol, triglicérides, glicemia, leptina e redução dos níveis de lipoproteínas de alta densidade. A combinação entre deficiência de vitamina D e obesidade contribuiu para uma queda significativa da função renal associada a um aumento da PAM e queda do FSR. Foi ainda observado nesses animais um aumento da proteinúria, da expressão renal da MCP-1, do infiltrado de células inflamatórias, das expressões renais de Col-3, fibronectina, vimentina, α -SMA, PCNA, JG12 e da expansão da área intersticial relativa. Além disso, essas alterações foram associadas ao aumento da expressão renal de TGF- β e menor expressão renal do VDR nos animais do grupo HdVD.

A concentração plasmática da vitamina D representa a soma da produção biológica tanto provinda da dieta quanto da exposição solar [24]. Nossos animais foram mantidos em condições de nula exposição solar direta e receberam dietas depletadas ou não em vitamina D. Os grupos alimentados com as dietas livres de vitamina D (dVD e HdVD) apresentaram níveis séricos quase indetectáveis deste hormônio ao final dos 90 dias de protocolo experimental. Esses resultados confirmam a eficiência do modelo experimental de deficiência de vitamina D nos grupos propostos [6, 8, 30].

A maioria das ações biológicas do calcitriol, sejam elas clássicas (envolvidas na homeostase mineral) ou não clássicas (inibição do crescimento celular, indução da diferenciação celular, imunomodulação, controle da secreção hormonal), são mediadas pelo VDR, membro da família de receptores de hormônios esteroides [20, 62, 63]. Além da dosagem plasmática de vitamina D, avaliamos a expressão proteica do VDR no tecido renal de nossos animais. Foi

observado que os grupos alimentados com dietas depletadas em vitamina D (dVD e HdVD) apresentaram uma redução significativa na expressão renal do VDR quando comparado ao grupo P. Em conformidade com nossos achados, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a deficiência de vitamina D promoveu uma redução na expressão proteica do VDR, intensificou modificações da estrutura renal e potencializou a inflamação e o processo fibrótico [6, 30].

Níveis plasmáticos de vitamina D vêm sendo inversamente associados com obesidade, resistência à insulina e diabetes do tipo 2 [64-68]. Em nosso protocolo, observamos níveis séricos mais baixos de vitamina D no grupo H bem como uma tendência de redução na expressão renal do VDR quando comparado ao grupo P. Esses resultados são consistentes com a hipótese de uma menor biodisponibilidade e inadequação de vitamina D na obesidade [65, 66, 68, 69]. Normalmente considerado como um órgão de armazenamento de vitamina D, o tecido adiposo também pode exercer influência nas ações endócrinas e parácrinas, modulando a expressão de enzimas responsáveis pela formação, ativação e degradação da vitamina D [65, 68-70]. A expressão gênica do VDR foi avaliada no tecido adiposo dos animais deste protocolo. Observamos uma redução significativa desse receptor no tecido adiposo dos animais do grupo dVD, acompanhando os níveis séricos de vitamina D. A associação entre esses parâmetros foi avaliada pela primeira vez por Nguyen e col. e diferente de nossos resultados, os autores não observaram uma relação entre níveis plasmáticos de vitamina D e expressão gênica de VDR no tecido adiposo [67]. Essa relação também não foi observada em nosso grupo HdVD, que mesmo recebendo uma dieta livre de vitamina D, apresentou uma maior expressão renal do VDR e uma expressão gênica acentuada desse receptor no tecido adiposo quando comparado ao grupo dVD. Além disso, os grupos que receberam dietas hiperlipídicas (H e HdVD) apresentaram apenas uma tendência de redução da expressão do VDR no tecido adiposo em relação ao grupo P. Em suporte a esses achados, Wamberg e col. observaram essa tendência de redução na expressão do VDR no tecido adiposo subcutâneo de mulheres obesas em relação a mulheres eutróficas [69]. Em contrapartida, nesse mesmo estudo foi observada uma expressão 33% maior do VDR no tecido adiposo visceral das mulheres

obesas quando comparada às eutróficas [69]. Entretanto, estudos anteriores do nosso laboratório em conjunto com os resultados desse protocolo não apontam claramente a ação e relação da vitamina D no tecido adiposo. Avaliações futuras são necessárias para o entendimento das ações fisiológicas da vitamina D no tecido adiposo associado ao grau de obesidade [65, 69].

Identificado como o gene supressor do envelhecimento, o Klotho é uma proteína transmembrana de passagem única expressa em diversos tecidos corpóreos, com predomínio nas células tubulares renais [71, 72]. Além da sua participação na homeostase mineral como co-receptor do FGF-23, a proteína Klotho é associada à resistência à insulina, estresse oxidativo, calcificação vascular, síntese de calcitriol e ao desenvolvimento e progressão da doença renal [71, 73]. No presente estudo, os grupos dVD, H e HdVD apresentaram redução na expressão da proteína Klotho em relação ao grupo P, principalmente aqueles com depleção de vitamina D na dieta. Estudos mostram que durante a progressão da doença renal há redução na expressão da proteína Klotho [6, 71, 73]. Corroborando nossos resultados, Garcia e col. demonstraram que a deficiência de vitamina D comprometeu a expressão gênica e proteica de Klotho em ratos isquêmicos deficientes em vitamina D [6]. Ademais, o comprometimento das concentrações plasmáticas da proteína α -Klotho vem sendo observado em pacientes obesos e diabéticos [74-76]. Nossos resultados sugerem um efeito sinérgico da obesidade associada à deficiência de vitamina D na discreta tendência de queda na expressão da proteína Klotho no grupo HdVD.

Dietas hipercalóricas e ricas em lipídeos são descritas na literatura como sendo efetivas para indução experimental de obesidade em roedores [77-79]. No presente estudo, nossos animais tratados com as dietas hiperlipídicas (H e HdVD), as quais fornecem maior aporte de calorias e lipídeos, apresentaram maior peso corpóreo e IMC quando comparados aos animais tratados com a dieta padrão (P) e a dieta livre de vitamina D (dVD). Além disso, para a completa validação de efetividade do modelo experimental, medidas antropométricas marcadoras de obesidade em ratos [56-58] foram aferidas ao final do protocolo de 90 dias. Observamos um aumento significativo das circunferências abdominal e torácica nos animais alimentados com as dietas hiperlipídicas (H e HdVD).

Estes resultados demonstram a efetividade na obtenção do modelo experimental proposto para indução de obesidade.

A hiperlipidemia, caracterizada pela elevação dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, é comumente relacionada à alta ingestão de dietas ricas em ácidos graxos e obesidade [80, 81]. Em conjunto, o depósito anormal de gordura no tecido adiposo e em outros órgãos como fígado e rins, é considerado um importante risco no seguimento de patologias como a DRC [80, 82, 83]. A presença de dislipidemia é relatada em todos os estágios da DRC, com prejuízo na barreira de filtração glomerular, dano tubular e proteinúria [83]. Nossos animais alimentados com as dietas hiperlipídicas (H e HdVD) apresentaram aumento significativo nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides além de uma redução nos níveis de HDL quando comparados aos grupos P e dVD. Corroborando nossos resultados, Bhandari e col. mostraram os efeitos adversos da obesidade induzida pela ingestão de dieta rica em gorduras no perfil lipídico de roedores, os quais apresentaram altos níveis de colesterol total, triglicérides e LDL, assim como redução nos níveis de HDL [77].

A relação entre perfil lipídico e vitamina D também é relatada na literatura uma vez que ambos compartilham a mesma via de biossíntese, pois possuem o 7-desidrocolesterol como precursor comum [81, 84, 85]. Essa relação foi demonstrada em estudos clínicos [86-88] e em um trabalho anterior do nosso laboratório, no qual foi evidenciado a elevação nos níveis de colesterol total e triglicérides na nefrotoxicidade induzida por Tenofovir associada à deficiência de vitamina D [31]. No presente estudo, nossos animais do grupo dVD apresentaram alterações nos níveis de colesterol e principalmente nos níveis de triglicérides em relação aos animais do grupo P. Essas alterações foram ainda mais evidentes no grupo HdVD. A vitamina D desempenha funções importantes na regulação e absorção do cálcio, reduzindo assim a absorção de ácidos graxos e exercendo influência nos níveis plasmáticos de colesterol [89]. Além disso, baixos níveis de vitamina D promovem a elevação plasmática do PTH, a qual parece ter influência no metabolismo lipídico. É descrito que níveis elevados de PTH aumentam a lipogênese, a remodelação óssea e reduzem a atividade lipolítica [81, 88, 89]. No presente estudo, os grupos dVD e HdVD apresentaram

níveis elevados de PTH em relação aos grupos P e H, demonstrando o clássico feedback negativo promovido pela deficiência de vitamina D.

Ainda em relação à influência da vitamina D sobre o perfil lipídico, Wang e col. sugeriram que a ativação do VDR também apresenta uma relação com a redução do acúmulo de colesterol e triglicérides no tecido renal [84]. Utilizando modelos experimentais de diabetes tipo 1 e 2, esses autores mostraram que a suplementação com um análogo de vitamina D reduziu o acúmulo renal de triglicérides através: (1) da diminuição da síntese de ácidos graxos por redução de mRNA da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1) e suas enzimas alvo; (2) do aumento da oxidação de ácidos graxos por elevação do *peroxisome proliferator activated receptor- α* (PPAR- α); e (3) da diminuição da captação de ácidos graxos por redução da translocase de ácidos graxos CD36 [84]. Em relação ao colesterol, esses autores descreveram que a suplementação de vitamina D modula o acúmulo renal deste ácido graxo pela redução de sua síntese por diminuição de SREBP-2 e 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A (HMGCoA) redutase e pela diminuição da captação do colesterol por redução do receptor de LDL [84].

Nossos animais do grupo HdVD apresentaram uma importante elevação da glicemia de jejum. Altas concentrações plasmáticas de glicose são sinais típicos da redução de gliconeogênese no fígado e de redução da captação de glicose no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, por início de instalação de resistência à insulina [85]. Além do excesso de peso, o aumento de tecido adiposo visceral representa uma importante associação com a resistência à insulina e alterações da funcionalidade do tecido adiposo [90]. Corroborando nossos resultados, Declèves e col. demonstraram uma elevação dos níveis da glicemia de jejum em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica [91]. A secreção inadequada de insulina, níveis alterados de glicemia e diabetes tipo 2 são também relacionados com a deficiência de vitamina D [22, 88, 92, 93]. Um dos mecanismos pelo qual a hipovitaminose D contribui para a instalação de resistência à insulina é via regulação de cálcio intracelular nas células β pancreáticas [85, 94]. Desta maneira, haveria o prejuízo na secreção de insulina e na atividade dos transportadores de glicose das células dos tecidos-alvo deste

hormônio, principalmente o adiposo e muscular esquelético [85, 88]. A mediação da vitamina D na sensibilidade à insulina é também descrita via ligação do calcitriol ao VDR, indução da expressão do receptor de insulina e ativação do PPAR- γ [85]. A análise conjunta dos parâmetros metabólicos dos nossos animais, os quais incluem os níveis de colesterol, triglicérides, HDL e glicemia de jejum, permitiu observar a influência da obesidade e da deficiência de vitamina D isoladas ou em associação na instalação da síndrome metabólica, principalmente nos animais do grupo HdVD.

A TFG avaliada pelo clearance de inulina apresentou diferenças significativas entre os grupos de animais estudados no presente protocolo experimental. A queda desse parâmetro funcional nos grupos dVD, H e principalmente HdVD quando comparados ao grupo P, destaca a influência da obesidade e da deficiência de vitamina D de forma isolada e associada na função renal. É bem definido que a DRC, mesmo em fases iniciais, é acompanhada por um progressivo declínio da TFG, por hipovitaminose D e pelo aumento dos níveis de FGF-23 [23, 95]. Além disso, a hipovitaminose D vem sendo referida na literatura como um fator de risco para a evolução da doença renal. De Boer e col. reportaram que a deficiência da vitamina D poderia ser um fator de risco para o declínio da TFG, principalmente quando associada ao diabetes e à hipertensão [29]. Em 2019, Liu e col. demonstraram a relação da hipovitaminose D e prejuízo na TFG em indivíduos com e sem DRC prévia, sugerindo que o status da vitamina D comporta-se como um possível indicador de risco para o comprometimento da filtração glomerular [96]. Além disso, estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a deficiência de vitamina D estava associada com o declínio da TFG e maior agravamento da injúria renal em diferentes modelos experimentais [8, 14, 30]. Esses trabalhos corroboram os resultados encontrados em nossos animais do grupo dVD, os quais mostraram um declínio da TFG quando comparado aos animais do grupo P.

A obesidade e a dislipidemia também são descritas como fatores agravantes na progressão da doença renal, promovendo prejuízos na barreira de filtração glomerular e subsequente presença de proteinúria [83]. Em uma meta-análise de onze estudos observacionais, Thomas e col. apontaram uma

associação entre síndrome metabólica, microalbuminúria e declínio da TFG [97]. Ademais, níveis elevados de IMC parecem também estar associados a uma progressão mais rápida da DRC em pacientes não dialisados [46, 98]. Nossos resultados mostraram a influência isolada da dieta hiperlipídica na TFG no grupo H, o qual apresentou alterações no perfil lipídico, glicêmico e antropométrico em relação ao grupo P. Mais evidente ainda foi a queda da TFG observada no grupo HdVD em relação aos grupos P e H. Embora relatos mostrem que a obesidade isoladamente pode agravar a função renal [41, 46, 98], nossos resultados mostraram que a deficiência de vitamina D *per se* exerceu uma influência ainda mais notável no declínio da TFG nos grupos dVD e HdVD. Apesar de não significativa, observamos uma tendência de queda de aproximadamente 13% da TFG no grupo HdVD em relação ao grupo dVD, demonstrando um possível efeito sinérgico da obesidade associada à deficiência de vitamina D na modulação da função renal.

A presença de proteinúria é bem definida como um marcador de disfunção renal e sua ocorrência associada à deficiência de vitamina D vem sendo reportada [6, 96]. Nossos animais dVD apresentaram uma tendência de aumento da proteinúria em relação aos grupos P e H. De forma direta, níveis baixos de vitamina D podem contribuir para perda de podócitos e formação de glomeruloesclerose com reflexos na integridade da membrana de filtração glomerular [99]. Além disso, estudos mostram que tanto a hipovitaminose D quanto a obesidade contribuem para o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) [100, 101]. Em 2008, Freundlich e col. demonstraram que níveis suficientes de vitamina D suprimiram a transcrição de renina, refletindo na redução da proteinúria através de efeitos hemodinâmicos [100]. Nossos resultados mostraram que a associação da obesidade com a deficiência de vitamina D promoveu um aumento significativo da proteinúria no grupo HdVD em relação ao grupo H. Martin e col. demonstraram que a obesidade é reconhecida por exacerbar a excreção urinária de proteínas em pacientes com DRC, sugerindo uma relação entre proteinúria, estágio da doença renal e IMC [102]. Além da ativação do SRAA por secreção de citocinas como leptina e Ang II pelos adipócitos [101], a associação da obesidade e proteinúria está relacionada principalmente aos baixos níveis de adiponectina e

subsequente prejuízo da funcionalidade dos podócitos [103]. Deji e col. também demonstraram essa relação a partir da indução da síndrome metabólica com dieta hiperlipídica em camundongos. Os autores observaram um aumento da área do tufo glomerular, aumento dos níveis de albuminúria e queda dos níveis de adiponectina [104]. Tais estudos corroboram a tendência de aumento da proteinúria em nosso grupo dVD, além da observação de níveis ainda maiores no grupo HdVD, demonstrando a participação sinérgica da obesidade e da deficiência de vitamina D na potencialização da excreção urinária de proteínas.

É bastante conhecido que o SRAA é um dos responsáveis pela manutenção da resistência vascular e da homeostase do fluido extracelular [105]. No presente estudo, os grupos dVD, H e HdVD apresentaram aumento significativo da PAM e dos níveis plasmáticos de Ang II e aldosterona, sugerindo uma maior ativação do SRAA. Além disso, observamos uma tendência de aumento da expressão de Ang II no tecido renal dos animais dVD, H e HdVD. A regulação endócrina negativa do SRAA por níveis suficientes da vitamina D é demonstrada na literatura principalmente pela associação inversa do status dos níveis desse hormônio e a expressão de renina [105, 106]. O comprometimento do controle da pressão arterial sistêmica gerado pela hipovitaminose D vem sendo descrito em trabalhos anteriores do nosso laboratório mostrando alterações na ativação do SRAA, no endotélio e na vasculatura renal [6-8, 14]. No presente estudo, observamos que nossos animais deficientes em vitamina D (dVD e HdVD) apresentaram aumento da PAM e dos níveis plasmáticos de Ang II e aldosterona, reforçando a participação da deficiência de vitamina D na modulação desses parâmetros. A associação entre obesidade e aumento da PAM também é descrita e vem sendo sugerida como um elo importante na injúria renal [107]. Os principais mecanismos envolvidos na elevação dos níveis de PAM no curso da obesidade envolvem: (1) ativação do sistema nervoso simpático (SNS) por aumento da pressão intra-abdominal e da leptina; (2) ativação do SRAA devido à elevada secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, resistina e leptina pelos adipócitos; (3) aumento dos níveis de aldosterona pelo estímulo da leptina à glândula adrenal ou por secreção pelos adipócitos, aumentando a retenção de Na⁺ e expansão do volume plasmático; e (4) redução da expressão de adiponectina, a qual parece ser uma das causas

de aumento da inflamação na obesidade [101, 107-109]. Nossos animais H e HdVD apresentaram, além de elevação dos níveis de PAM e aldosterona, uma redução significativa do FSR e consequente aumento da RVR. Assim como nos parâmetros funcionais, a associação entre obesidade e deficiência de vitamina D potencializou o comprometimento hemodinâmico dos animais HdVD. Essas modificações podem ser atribuídas principalmente ao aumento da PAM, dos níveis plasmáticos de Ang II e aldosterona, do FSR e da RVR observados no grupo HdVD.

Estudos anteriores do nosso laboratório sugeriram que o comprometimento do endotélio vascular glomerular em ratos deficientes em vitamina D pode estar associado a modificações na hemodinâmica e na função renal [14, 30]. No presente estudo avaliamos a expressão da JG12, um marcador específico da integridade capilar glomerular [110]. Nossos resultados mostraram uma redução significativa na expressão da JG12 nos grupos dVD, H e principalmente HdVD em relação ao grupo P. Esses dados demonstram que a interação entre o tecido adiposo e a deficiência de vitamina D pode comprometer a integridade do endotélio vascular glomerular, com reflexos na função e hemodinâmica renal.

O tecido adiposo não é somente reconhecido pela sua capacidade de armazenamento de energia e mobilização lipídica, mas também como um órgão endócrino secretor de adipocinas [90]. Essa mudança de perspectiva e reconhecimento da função secretora do tecido adiposo branco teve início em 1990 com a descoberta da síntese e expressão aumentada do fator de necrose tumoral α (TNF- α) na obesidade e, posteriormente, da ação secretora do hormônio leptina [90, 111]. Hoje sabe-se que o adipócito, um dos principais tipos celulares que compõe o tecido adiposo, secreta uma diversidade de fatores e hormônios, tais como: TNF- α , IL-6, PAI-1, MCP-1, adiponectina, leptina e resistina [42, 90, 111]. A expansão do tecido adiposo resulta em uma maior secreção dessas adipocinas inflamatórias, com exceção da adiponectina, demonstrando uma característica pró inflamatória desse tecido [40, 42, 111].

Identificada em 1994 por Zhang e col., a leptina é um hormônio sintetizado e secretado primordialmente por adipócitos do tecido adiposo branco, codificada pelo gene da obesidade (*o/b*) [112-114]. Fisiologicamente, a leptina desempenha ação importante no controle da homeostase energética e manutenção do peso corpóreo, com níveis circulantes proporcionais à ingesta alimentar e reserva de energia corpórea a partir da supressão ou ativação de neurotransmissores específicos [115, 116]. A relação entre os níveis plasmáticos de leptina e o peso corpóreo sugerem que esse hormônio pode ser considerado um indicador de reserva energética: quanto mais tecido adiposo, mais leptina. A condição denominada hiperleptinemia na obesidade induz resistência à leptina, demonstrada na literatura com ação similar à resistência insulínica no diabetes do tipo 2 [116]. No presente protocolo experimental, os grupos H e HdVD apresentaram um aumento significativo dos níveis plasmáticos de leptina em relação ao grupo P. Corroborando nossos resultados, estudos anteriores também mostraram um aumento dos níveis séricos de leptina em modelos experimentais de obesidade induzida a partir de dietas hiperlipídicas [116-119]. Além de ser diretamente relacionada à quantidade de tecido adiposo, a concentração de leptina parece ser regulada também pelos níveis séricos de vitamina D [120, 121]. No presente protocolo, observamos um aumento significativo dos níveis plasmáticos de leptina no grupo de animais HdVD em relação aos demais grupos estudados. Menendez e col. demonstraram uma menor secreção de leptina após administração de vitamina D₃ em células do tecido adiposo em meio de cultura [120]. Além disso, a leptina parece ter um efeito inibitório na conversão da 25(OH)D para a 1,25(OH)₂D₃, com inibição da enzima 1- α -hidroxilase no tecido renal e adiposo [121, 122]. Dessa forma, o efeito sinérgico da deficiência de vitamina D e obesidade justificam o desequilíbrio dos níveis de leptina plasmática observado no grupo de animais HdVD.

O reparo tecidual após um insulto de injúria renal envolve algumas etapas, incluindo a ativação celular. Esse processo abrange o estímulo para produção de quimiocinas para o recrutamento de células para o local da injúria, divisão e diferenciação celular [123]. A MCP-1 é uma importante quimiocina secretada em resposta à sinalização na condição inflamatória atuando na mobilização,

localização, recrutamento e diferenciação de monócitos e/ou macrófagos [124]. Nossos animais do grupo H apresentaram além de um aumento significativo da expressão renal da MCP-1 e de células CD68+, uma tendência de aumento na expressão de células CD3+ em relação ao grupo P, o que demonstra uma possível influência do tecido adiposo na resposta inflamatória. Corroborando nossos resultados, Declèves e col. observaram uma maior expressão renal e urinária da MCP-1 em camundongos que receberam dieta hiperlipídica [91]. No presente estudo, verificamos um aumento da expressão renal da MCP-1 em nossos animais do grupo dVD, além de uma tendência de aumento na expressão renal de células CD3+ e CD68+ em relação ao grupo P, confirmando o efeito imunomodulatório da vitamina D. Recentemente, Santos e col. demonstraram que a deficiência de vitamina D promoveu um aumento da expressão renal da MCP-1 e de células CD68+ e CD3+. Além disso, esses autores demonstraram que a reposição da vitamina D através da dieta restabeleceu a expressão renal desses fatores inflamatórios em modelo de I/R renal. [14]. Ademais, Farhangi e col. mostraram que a suplementação de vitamina D reduziu a expressão de fatores inflamatórios como TNF- α e MCP-1 no tecido adiposo [125]. Nossos resultados mostraram um aumento significativo da expressão renal da MCP-1 e de células CD3+ e CD68+ no grupo HdVD em relação aos demais grupos estudados, demonstrando o efeito sinérgico entre o tecido adiposo e a deficiência de vitamina D na modulação da inflamação.

A ativação e função dos macrófagos são heterogêneas e reguladas pelo microambiente e estágio da lesão tecidual, refletindo em diferentes fenótipos [14, 126, 127]. Em geral, os macrófagos são classificados em dois subtipos: macrófagos do tipo M1, classicamente ativados e considerados pró-inflamatórios devido a sua capacidade de produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α ; e macrófagos do tipo M2, os quais são conhecidos por apresentar função anti-inflamatória e imunomodulatória [127, 128]. É importante destacar que o balanço entre os macrófagos M1/M2 está relacionado ao microambiente renal e pode influenciar a progressão da doença renal [14, 126, 128]. No presente estudo foi observado um aumento significativo na expressão de células CD68+ (macrófagos M1+M2) nos grupos dVD, H e HdVD em relação ao grupo P, com uma tendência de maior expressão dessas

células no grupo HdVD. Mesmo sem significância, notamos uma menor expressão de células CD206+ (macrófagos M2) em relação à expressão total de macrófagos no grupo HdVD. É descrito na literatura que a infiltração de macrófagos é correlacionada ao grau de obesidade, principalmente com o fenótipo do tipo M1, associando a obesidade com inflamação e resistência à insulina [127]. Ademais, nosso grupo de pesquisa demonstrou em modelo de nefrectomia 5/6 que, além de um aumento na expressão de macrófagos em resposta à lesão renal, houve uma redução na proporção de expressão de macrófagos do tipo M2 em animais deficientes em vitamina D [30]. Dessa forma, nossos resultados mostram que o efeito sinérgico entre a obesidade e a deficiência de vitamina D contribuiu para a exacerbação do processo inflamatório observado nos animais do grupo HdVD, os quais apresentaram uma menor proporção de macrófagos M2 em relação à população total de macrófagos.

Dietas ricas em lipídeos parecem ter associação com a susceptibilidade de formação de fibrose renal por intermédio de uma maior expressão do TGF- β e de componentes da MEC [40]. Além disso, estudos têm demonstrado que a vitamina D pode suprimir a expressão do TGF- β e de seu respectivo receptor, bloquear a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e inibir a proliferação celular e a apoptose [6, 14, 129]. Além disso tem sido descrito que a IRA pode resultar em um reparo tecidual incompleto, caracterizado pela presença de inflamação túbulo-intersticial persistente, proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de componentes da MEC [130]. O TGF- β é uma das principais citocinas mediadoras do processo de formação e progressão da fibrose renal, por estimular a TEM e conseqüentemente a deposição e a expressão de componentes da MEC [14, 126, 131]. Por análise imuno-histoquímica, observamos um aumento significativo da expressão renal de TGF- β nos grupos dVD, H e principalmente HdVD. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a deficiência de vitamina D contribuiu para uma maior expressão renal de TGF- β e de componentes da MEC [6, 30, 126]. Além disso, Hennegar e col. mostraram um aumento da expressão renal de TGF- β no córtex renal de cães que foram alimentados com dietas hiperlipídicas [44].

Associadas à expressão renal de TGF- β , encontramos também alterações na expressão de componentes da MEC. Os animais do grupo dVD apresentaram uma tendência de aumento dos níveis renais de Col-3 e um aumento significativo na expressão de fibronectina. Ademais, observamos um aumento significativo da expressão destes componentes da MEC no grupo H em relação ao grupo P. Declèves e col. observaram resultados semelhantes ao descreverem um aumento da expressão de fibronectina e colágenos dos tipos I e IV no tecido renal de animais que receberam dieta rica em lipídeos [91]. Em 2021, Santos e col. demonstraram uma maior expressão renal de Col-3 e fibronectina em animais deficientes em vitamina D submetidos à I/R renal. Além disso, esses autores observaram que a reposição da vitamina D restabeleceu a expressão renal desses marcadores da MEC [14]. Essas evidências corroboram nossos resultados observados no grupo HdVD, o qual apresentou um aumento significativo na expressão renal de TGF- β e de componentes da MEC em relação aos demais grupos estudados. Sendo assim, nossos dados demonstraram o efeito sinérgico da obesidade e da deficiência de vitamina D na expressão de TGF-beta e deposição de componentes da MEC no tecido renal do grupo HdVD.

Em resposta à injúria renal, as células que normalmente são diferenciadas de forma estável para promover a homeostase podem se desdiferenciar em um novo fenótipo e redirecionar o reparo tecidual [123]. Esse processo, denominado TEM, promove maior divisão celular, permite que as células adquiram um fenótipo secretor e contribui para uma maior deposição de componentes da MEC [123, 132]. Em 2012, Xiong e col. descreveram que a baixa expressão do VDR na DRC estaria envolvida na relação entre inflamação e o processo de TEM [133]. No presente trabalho, além de constataremos uma exacerbação do processo inflamatório e maior expressão de proteínas da MEC, observamos um aumento significativo da expressão renal de PCNA, α -SMA e vimentina no córtex renal dos animais do grupo HdVD. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram a influência da deficiência de vitamina D no aumento da expressão de marcadores de alteração fenotípica [6] e proliferação celular [8]. Corroborando nossos resultados relacionados à obesidade, Coimbra e col. demonstraram uma maior expressão de vimentina no tecido renal de ratos Zucker obesos [134]. Ademais, Amaral e col. mostraram um aumento na

expressão de PCNA no córtex renal de ratas ovariectomizadas em modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica [135]. Desta maneira, nossos resultados permitem concluir que o efeito sinérgico da obesidade e da deficiência de vitamina D no grupo HdVD exacerbou a proliferação celular e a mudança de fenótipo das células dos túbulos renais.

Como relatado anteriormente, é descrita uma estreita relação entre os níveis de vitamina D, expressão do VDR e do TGF- β nos processos de inflamação e TEM, mostrando que a vitamina D exerce um efeito protetor na preservação da integridade celular [6, 129, 133]. Ao mesmo tempo, o tecido adiposo é reconhecido como um órgão endócrino envolvido na produção e ação de adipocinas incluindo a leptina, o TNF- α , a MCP-1 e o TGF- β . Desta maneira, o tecido adiposo está diretamente relacionado ao acúmulo irreversível da MEC juntamente com a formação de fibrose renal [41, 43, 45]. No presente estudo, aliado ao aumento da expressão do TGF- β , dos níveis de leptina e da queda da expressão do VDR, observamos um aumento do infiltrado inflamatório, ampla proliferação celular e maior presença de alteração fenotípica das células tubulares renais no grupo HdVD. Esse conjunto de alterações refletiu em uma expansão significativa da área intersticial nesse mesmo grupo de animais. Esses resultados demonstram um efeito sinérgico de uma maior produção e secreção de adipocinas pelo tecido adiposo e um comprometimento da ação imunomodulatória e renoprotetora atribuída à vitamina D, resultando em uma potencialização da expressão de fatores inflamatórios e pró-fibróticos importantes na progressão da doença renal.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que a associação entre a deficiência de vitamina D e a obesidade no modelo de isquemia/reperfusão renal agrava as alterações funcionais, hemodinâmicas e metabólicas e contribui para uma maior expressão de fatores relacionados à progressão da doença renal.

7. ANEXOS

Anexo 1. *Parâmetros antropométricos avaliados ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).*

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
Peso (g)	425±8	437±10	531±12 ^{ad}	538±16 ^{ad}
IMC (g/cm ²)	0,61±0,01	0,61±0,01	0,72±0,02 ^{ad}	0,72±0,01 ^{ad}
CA (cm)	17,4±0,2	17,4±0,3	21,5±0,4 ^{ad}	21,1±0,4 ^{ad}
CT (cm)	14,1±0,3	13,9±0,2	15,4±0,2 ^{ad}	15,4±0,1 ^{ad}
PR/PC	0,39±0,01	0,43±0,01 ^c	0,33±0,01 ^{bd}	0,33±0,01 ^{bd}
C (cm)	26,4±0,1	26,4±0,1	26,8±0,2	26,9±0,1

IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; CT, circunferência torácica; PR/PC, relação peso renal/peso corpóreo; C, comprimento (nose-to-anus). Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001 vs dVD.

Anexo 2. *Análise da concentração plasmática de vitamina D aos 45 e 90 dias e avaliação dos parâmetros bioquímicos ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).*

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
P _{25(OH)D 45} (ng/mL)	45,51±2,74	2,43±0,71 ^a	20,19±1,7 ^{ad}	3,27±0,39 ^{adg}
P _{25(OH)D 90} (ng/mL)	48,22±2,87	0,86±0,28 ^a	23,76±1,35 ^{ad}	1,62±0,47 ^{adg}
P _{PTH} (pg/mL)	464±73	933±187	552±52	964±176
P _{Na} (mEq/L)	141±1	142±2	144±1	144±1
P _K (mEq/L)	3,5±0,2	3,7±0,2	3,9±0,1	3,9±0,1
P _{Ca} (mg/dL)	7,1±0,3	7,0±0,2	7,2±0,2	7,2±0,3
P _P (mg/dL)	5,7±0,5	5,6±0,5	5,2±0,2	5,1±0,3

P_{25(OH)D}, 25-hidroxivitamina D; P_{PTH}, paratormônio plasmático; P_{Na}, sódio plasmático; P_K, potássio plasmático; P_{Ca}, cálcio total plasmático; P_P, fósforo plasmático. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001 vs P; ^dp<0,001 vs dVD; ^gp<0,001 vs H.

Anexo 3. Avaliação da expressão proteica (tecido renal) e gênica (tecido adiposo) ao final dos 90 dias de protocolo em amostras de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), tratados com dieta depletada em vitamina D (dVD), tratados com dieta hiperlipídica (H) ou tratados com dieta hiperlipídica depletada de vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
VDR (%) ^{WB}	101,1±0,6	69,6±3,0 ^a	94,5±4,9 ^d	80,7±2,6 ^{aeh}
VDR ($\Delta\Delta$ Ct) ^{qPCR}	0,76±0,14	0,19±0,01 ^a	0,57±0,08 ^e	0,45±0,04 ^f
Klotho (ng/ μ g) ^{ELISA}	0,21±0,01	0,17±0,01 ^b	0,18±0,01 ^c	0,15±0,01 ^b
MCP-1 (ng/ μ g) ^{ELISA}	0,248±0,012	0,321±0,010 ^a	0,354±0,019 ^a	0,417±0,016 ^{adh}
Col-3 (ng/ μ g) ^{ELISA}	31,44±1,05	36,28±1,82	42,18±2,81 ^b	46,41±2,10 ^{ae}

VDR, receptor de vitamina D; MCP-1, proteína quimiotática para monócitos 1; Col-3, colágeno do tipo III; WB, western blotting. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05 vs dVD; ^hp<0,01 vs H.

Anexo 4. Perfil lipídico, glicose e leptina avaliados ao final dos 90 dias de protocolo no plasma de ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
Colesterol total (mg/dL)	73±3	86±5	102±4 ^{af}	117±6 ^{adi}
Triglicérides (mg/dL)	44±4	126±21 ^c	224±16 ^{ae}	303±28 ^{adh}
LDL (mg/dL)	11,62±2,30	12,50±1,30	9,56±1,23	10,24±0,94
HDL (mg/dL)	50,62±2,30	52,42±3,65	43,70±1,66 ^{cf}	42,53±1,40 ^{cf}
Glicose (mg/dL)	130±13	152±14	172±6	213±11 ^{ae}
Leptina (ng/mL)	2,17±0,20	4,69±0,35	12,26±0,81 ^{ad}	20,42±2,04 ^{adg}

LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05 vs dVD; ^gp<0,001, ^hp<0,01, ⁱp<0,05 vs H.

Anexo 5. Parâmetros funcionais e hemodinâmicos obtidos ao final dos 90 dias de protocolo em ratos submetidos ao insulto de isquemia/reperfusão renal tratados com dieta padrão (P), com dieta depletada em vitamina D (dVD), com dieta hiperlipídica (H) ou com dieta hiperlipídica depletada em vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
C _{in} (mL/min/100g)	0,64±0,11	0,41±0,05 ^c	0,58±0,02 ^f	0,36±0,02 ^{bi}
VU (mL/24h)	25±2	16±2 ^c	18±3 ^c	15±2 ^c
Proteinúria (mg/24h)	8,51±0,50	9,65±0,41	8,18±0,71	10,83±0,77 ⁱ
PAM (mmHg)	124±3	135±2 ^c	134±3 ^c	142±2 ^a
P _{Ang II} (pg/mL)	139,6±9,2	150,2±6,1 ^a	152,0±6,0 ^a	148,0±3,0 ^{aif}
Ang II tecidual (pg/μg)	8,79±1,74	12,07±2,25	11,00±0,75	13,61±3,03
P _{Aldo} (pg/mL)	1705±182	2467±103 ^c	2500±274 ^c	2683±235 ^c
FSR (mL/min)	6,06±0,15	6,59±0,15	5,20±0,30 ^{ce}	4,82±0,22 ^{bd}
RVR (mmHg/mL/min)	21,26±1,20	21,80±0,95	23,67±1,43	26,68±0,88 ^{cf}

C_{in}, clearance de inulina; VU, volume urinário; PAM, pressão arterial média; P_{Ang II}, angiotensina II plasmática; Ang II tecidual, angiotensina tecidual; P_{Aldo}, aldosterona plasmática; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05 vs dVD; ⁱp<0,05 vs H.

Anexo 6. Análise histomorfológica e avaliação imuno-histoquímica ao final dos 90 dias de protocolo em tecidos renais de ratos submetidos ao insulto isquêmico tratados com dieta padrão (P), tratados com dieta depletada em vitamina D (dVD), tratados com dieta hiperlipídica (H) ou tratados com dieta hiperlipídica depletada de vitamina D (HdVD).

Parâmetros	P	dVD	H	HdVD
AG (μm ²)	8934±215	8927±128	9230±210	8670±166
JG12 (%)	19,34±1,26	11,16±1,12 ^a	12,15±0,58 ^a	8,46±0,61 ^{aif}
CD68+ (%)	1,04±0,08	1,87±0,10 ^c	2,08±0,39 ^c	2,33±0,40 ^c
CD206+ (%)	0,83±0,07	0,79±0,04	0,66±0,14	0,65±0,04
CD3+ (%)	0,26±0,04	0,38±0,04	0,41±0,04	0,79±0,07 ^{adg}
TGF-β (%)	1,88±0,24	3,79±0,44 ^b	3,26±0,30 ^b	6,11±0,46 ^{adg}
Fibronectina (%)	3,60±0,10	7,05±0,88 ^c	6,20±0,62 ^c	8,98±1,14 ^{ai}
α-SMA (%)	2,98±0,21	3,99±0,54	6,18±0,63 ^{cf}	8,81±1,36 ^{adi}
Vimentina (%)	2,88±0,38	6,04±0,97 ^c	5,01±0,77	6,43±0,63 ^c
PCNA (%)	0,55±0,07	0,60±0,17	0,51±0,07	1,13±0,16 ^{cfi}
AIR (%)	16,07±0,63	19,19±1,23	21,05±0,74 ^c	29,11±1,58 ^{adg}

AG, área glomerular; JG12, aminopeptidase P; CD68+, células CD68 positivas (macrófagos M1+M2); CD206+, células CD206 positivas (macrófagos M2); CD3+, células T positivas; TGF-β, fator de crescimento transformante β; α-SMA, α-actina de músculo liso; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; AIR, área intersticial relativa. Os dados são expressos como média±EPM. ^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp<0,05 vs P; ^dp<0,001, ^ep<0,01, ^fp<0,05 vs dVD; ^gp<0,001, ^hp<0,01, ⁱp<0,05 vs H.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Susantitaphong, P., et al., *World incidence of AKI: a meta-analysis*. Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(9): p. 1482-93.
2. Rifkin, D.E., S.G. Coca, and K. Kalantar-Zadeh, *Does AKI truly lead to CKD?* J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(6): p. 979-84.
3. Ullah, M.M. and D.P. Basile, *Role of Renal Hypoxia in the Progression From Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease*. Semin Nephrol, 2019. **39**(6): p. 567-580.
4. Bonventre, J.V., *Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair*. Contrib Nephrol, 2010. **165**: p. 9-17.
5. Basile, D.P., et al., *Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(3): p. F721-33.
6. Goncalves, J.G., et al., *Vitamin D deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107228.
7. de Braganca, A.C., et al., *Vitamin D deficiency contributes to vascular damage in sustained ischemic acute kidney injury*. Physiol Rep, 2016. **4**(13).
8. de Braganca, A.C., et al., *Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats*. Physiol Rep, 2015. **3**(3).
9. Moe, S.M., *Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium*. Prim Care, 2008. **35**(2): p. 215-37, v-vi.
10. Megyesi, J., et al., *The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 2): p. F1211-6.
11. Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton, *Pathophysiology of acute kidney injury*. Compr Physiol, 2012. **2**(2): p. 1303-53.
12. Sutton, T.A. and B.A. Molitoris, *Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure*. Semin Nephrol, 1998. **18**(5): p. 490-7.
13. Basile, D.P., *The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function*. Kidney Int, 2007. **72**(2): p. 151-6.
14. dos Santos, M.S.C., Canale, D; Bernardo, D.R.D.; Shimizu, M.H.M.; Seguro, A.C.; Volpini, R.A.; de Braganca, A.C., *The Restoration of Vitamin D Levels Slows the Progression of Renal Ischemic Injury in Rats Previously Deficient in Vitamin D*. Front Med 2021. **8**(625647).
15. Yuste, C., et al., *Factors related with the progression of chronic kidney disease*. Nefrologia, 2013. **33**(5): p. 685-91.
16. Dusso, A.S., *Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation*. Kidney Int Suppl (2011), 2011. **1**(4): p. 136-141.
17. Lanske, B. and M.S. Razzaque, *Vitamin D and aging: old concepts and new insights*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(12): p. 771-7.
18. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency*. N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 266-81.
19. Tsiaras, W.G. and M.A. Weinstock, *Factors influencing vitamin D status*. Acta Derm Venereol, 2011. **91**(2): p. 115-24.
20. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F8-28.
21. Holick, M.F. and T.C. Chen, *Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(4): p. 1080S-6S.
22. Hossein-nezhad, A. and M.F. Holick, *Vitamin D for health: a global perspective*. Mayo Clin Proc, 2013. **88**(7): p. 720-55.
23. Dusso, A., E.A. Gonzalez, and K.J. Martin, *Vitamin D in chronic kidney disease*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(4): p. 647-55.

24. Holick, M.F., *Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application*. Ann Epidemiol, 2009. **19**(2): p. 73-8.
25. Holick, M.F., et al., *Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. 1911-30.
26. Ikizler, T.A., et al., *KDOQI Clinical Practice Guideline for Nutrition in CKD: 2020 Update*. Am J Kidney Dis, 2020. **76**(3 Suppl 1): p. S1-S107.
27. Moreira, C.A., et al., *Reference values of 25-hydroxyvitamin D revisited: a position statement from the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) and the Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine (SBPC)*. Arch Endocrinol Metab, 2020. **64**(4): p. 462-478.
28. Charoenngam, N. and M.F. Holick, *Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease*. Nutrients, 2020. **12**(7).
29. de Boer, I.H., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D and change in estimated glomerular filtration rate*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(9): p. 2141-9.
30. de Braganca, A.C., et al., *Vitamin D Deficiency Aggravates the Renal Features of Moderate Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Rats*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 282.
31. Canale, D., et al., *Vitamin D deficiency aggravates nephrotoxicity, hypertension and dyslipidemia caused by tenofovir: role of oxidative stress and renin-angiotensin system*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103055.
32. Dias, P.C., et al., *Obesity and public policies: the Brazilian government's definitions and strategies*. Cad Saude Publica, 2017. **33**(7): p. e00006016.
33. Jastreboff, A.M., et al., *Obesity as a Disease: The Obesity Society 2018 Position Statement*. Obesity (Silver Spring), 2019. **27**(1): p. 7-9.
34. Kelly, T., et al., *Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(9): p. 1431-7.
35. (WHO), W.H.O. *Taking Action on Childhood Obesity*. 2018 [cited 2019 October 8,2019]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274792/WHO-NMH-PND-ECHO-18.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
36. da Silva, L.E.S., et al., *Data Resource Profile: Surveillance System of Risk and Protective Factors for Chronic Diseases by Telephone Survey for adults in Brazil (Vigitel)*. Int J Epidemiol, 2021. **50**(4): p. 1058-1063.
37. Koch, V.H., *The effects of obesity on kidney function: a challenge for nephrologists*. J Bras Nefrol, 2019. **41**(2): p. 162-165.
38. Savica, V., G. Bellinghieri, and J.D. Kopple, *The effect of nutrition on blood pressure*. Annu Rev Nutr, 2010. **30**: p. 365-401.
39. Neves, P., et al., *Brazilian Dialysis Census: analysis of data from the 2009-2018 decade*. J Bras Nefrol, 2020. **42**(2): p. 191-200.
40. Decleves, A.E. and K. Sharma, *Obesity and kidney disease: differential effects of obesity on adipose tissue and kidney inflammation and fibrosis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2015. **24**(1): p. 28-36.
41. Kopple, J.D. and U. Feroze, *The effect of obesity on chronic kidney disease*. J Ren Nutr, 2011. **21**(1): p. 66-71.
42. Miricescu, D., et al., *Impact of adipose tissue in chronic kidney disease development (Review)*. Exp Ther Med, 2021. **21**(5): p. 539.
43. Kopple, J.D., *Obesity and chronic kidney disease*. J Ren Nutr, 2010. **20**(5 Suppl): p. S29-30.
44. Henegar, J.R., et al., *Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(6): p. 1211-7.
45. Silva Junior, G.B., et al., *Obesity and kidney disease*. J Bras Nefrol, 2017. **39**(1): p. 65-69.

46. Kovesdy, C.P., et al., *Obesity and Kidney Disease: Hidden Consequences of the Epidemic*. *Blood Purif*, 2017. **43**(4): p. 346-354.
47. Cipriani, C., et al., *Vitamin d and its relationship with obesity and muscle*. *Int J Endocrinol*, 2014. **2014**: p. 841248.
48. Khan, A.H., et al., *Prevalence of vitamin D deficiency and its correlates: results of a community-based study conducted in Karachi, Pakistan*. *Arch Osteoporos*, 2012. **7**: p. 275-82.
49. Minambres, I., et al., *The association of hypovitaminosis d with the metabolic syndrome is independent of the degree of obesity*. *ISRN Endocrinol*, 2012. **2012**: p. 691803.
50. Pereira-Santos, M., et al., *Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis*. *Obes Rev*, 2015. **16**(4): p. 341-9.
51. Unger, M.D., et al., *Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone?* *Clin Nutr*, 2010. **29**(6): p. 784-8.
52. Bolland, M.J., et al., *The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(4): p. 959-64.
53. Saneei, P., A. Salehi-Abargouei, and A. Esmailzadeh, *Serum 25-hydroxy vitamin D levels in relation to body mass index: a systematic review and meta-analysis*. *Obes Rev*, 2013. **14**(5): p. 393-404.
54. Rosenstreich, S.J., C. Rich, and W. Volwiler, *Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: evidence for a storage site in the rat*. *J Clin Invest*, 1971. **50**(3): p. 679-87.
55. Wortsman, J., et al., *Decreased bioavailability of vitamin D in obesity*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **72**(3): p. 690-3.
56. Gerbaix, M., et al., *Visceral fat mass determination in rodent: validation of dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric techniques in fat and lean rats*. *Lipids Health Dis*, 2010. **9**: p. 140.
57. Angeloco, L.R.N.D., R.; Leme, I.A.; Lataro, R.C.; Jordao, A.A., *Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: effects of high-fat and high-sucrose diets*. *Revista de Nutrição*, 2012. **25**(3): p. 331-339.
58. Novelli, E.L., et al., *Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats*. *Lab Anim*, 2007. **41**(1): p. 111-9.
59. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Anal Biochem*, 1981. **112**(2): p. 195-203.
60. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
61. Lancas, T., et al., *Cholinergic hyperresponsiveness of peripheral lung parenchyma in chronic obstructive pulmonary disease*. *Respiration*, 2011. **82**(2): p. 177-84.
62. Dusso, A.S. and A.J. Brown, *Mechanism of vitamin D action and its regulation*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(2 Suppl 2): p. S13-24.
63. Nagpal, S., S. Na, and R. Rathnachalam, *Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands*. *Endocr Rev*, 2005. **26**(5): p. 662-87.
64. Snijder, M.B., et al., *Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(7): p. 4119-23.
65. Clemente-Postigo, M., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D and adipose tissue vitamin D receptor gene expression: relationship with obesity and type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(4): p. E591-5.
66. Cordeiro, A., et al., *Vitamin D metabolism in human adipose tissue: could it explain low vitamin D status in obesity?* *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2017. **33**(2).

67. Nguyen, V.T., et al., *Vitamin D, inflammation, and relations to insulin resistance in premenopausal women with morbid obesity*. Obesity (Silver Spring), 2015. **23**(8): p. 1591-7.
68. Nimitphong, H., et al., *Vitamin D Inhibits Adipokine Production and Inflammatory Signaling Through the Vitamin D Receptor in Human Adipocytes*. Obesity (Silver Spring), 2021. **29**(3): p. 562-568.
69. Wamberg, L., et al., *Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue -- the effect of obesity and diet-induced weight loss*. Int J Obes (Lond), 2013. **37**(5): p. 651-7.
70. Schuster, I., *Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1814**(1): p. 186-99.
71. Hu, M.C., M. Kuro-o, and O.W. Moe, *Renal and extrarenal actions of Klotho*. Semin Nephrol, 2013. **33**(2): p. 118-29.
72. Kuro-o, M., *Overview of the FGF23-Klotho axis*. Pediatr Nephrol, 2010. **25**(4): p. 583-90.
73. Donate-Correa, J., et al., *FGF23/Klotho axis: phosphorus, mineral metabolism and beyond*. Cytokine Growth Factor Rev, 2012. **23**(1-2): p. 37-46.
74. Kim, H.J., et al., *Serum klotho is inversely associated with metabolic syndrome in chronic kidney disease: results from the KNOW-CKD study*. BMC Nephrol, 2019. **20**(1): p. 119.
75. Landry, T., et al., *Centrally circulating alpha-klotho inversely correlates with human obesity and modulates arcuate cell populations in mice*. Mol Metab, 2021. **44**: p. 101136.
76. Nie, F., et al., *Serum klotho protein levels and their correlations with the progression of type 2 diabetes mellitus*. J Diabetes Complications, 2017. **31**(3): p. 594-598.
77. Bhandari, U., et al., *The effect of high-fat diet-induced obesity on cardiovascular toxicity in Wistar albino rats*. Hum Exp Toxicol, 2011. **30**(9): p. 1313-21.
78. Woods, S.C., et al., *A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats*. J Nutr, 2003. **133**(4): p. 1081-7.
79. Akiyama, T., et al., *High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat*. Diabetes Res Clin Pract, 1996. **31**(1-3): p. 27-35.
80. Gai, Z., et al., *Lipid Accumulation and Chronic Kidney Disease*. Nutrients, 2019. **11**(4).
81. Vekic, J., et al., *Obesity and dyslipidemia*. Metabolism, 2019. **92**: p. 71-81.
82. Yang, P., et al., *Inflammatory stress promotes the development of obesity-related chronic kidney disease via CD36 in mice*. J Lipid Res, 2017. **58**(7): p. 1417-1427.
83. Pei, K., et al., *Recent Progress on Lipid Intake and Chronic Kidney Disease*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 3680397.
84. Wang, X.X., et al., *Vitamin D receptor agonist doxercalciferol modulates dietary fat-induced renal disease and renal lipid metabolism*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(3): p. F801-10.
85. Szymczak-Pajor, I., J. Drzewoski, and A. Sliwinska, *The Molecular Mechanisms by Which Vitamin D Prevents Insulin Resistance and Associated Disorders*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(18).
86. Lupton, J.R., et al., *Deficient serum 25-hydroxyvitamin D is associated with an atherogenic lipid profile: The Very Large Database of Lipids (VLDL-3) study*. J Clin Lipidol, 2016. **10**(1): p. 72-81 e1.
87. Saheb Sharif-Askari, F., et al., *Low Vitamin D Serum Level Is Associated with HDL-C Dyslipidemia and Increased Serum Thrombomodulin Levels of Insulin-Resistant Individuals*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020. **13**: p. 1599-1607.
88. Yang, K., et al., *Vitamin D Status and Correlation with Glucose and Lipid Metabolism in Gansu Province, China*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020. **13**: p. 1555-1563.
89. Kim, M.R. and S.J. Jeong, *Relationship between Vitamin D Level and Lipid Profile in Non-Obese Children*. Metabolites, 2019. **9**(7).

90. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
91. Declèves, A.E., et al., *AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(10): p. 1846-55.
92. Devaraj, S., et al., *Low vitamin D levels in Northern American adults with the metabolic syndrome*. Horm Metab Res, 2011. **43**(1): p. 72-4.
93. Park, S., D.S. Kim, and S. Kang, *Vitamin D deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR-gamma expression in nonobese Type 2 diabetic rats*. J Nutr Biochem, 2016. **27**: p. 257-65.
94. Yaribeygi, H., et al., *The molecular mechanisms by which vitamin D improve glucose homeostasis: A mechanistic review*. Life Sci, 2020. **244**: p. 117305.
95. Urena-Torres, P., et al., *Association of kidney function, vitamin D deficiency, and circulating markers of mineral and bone disorders in CKD*. Am J Kidney Dis, 2011. **58**(4): p. 544-53.
96. Liu, M., J. Wang, and Y. He, *Serum 25-Hydroxyvitamin D were associated with higher risk of both albuminuria and impaired GFR incidence: a cohort study based on CLHLS study*. BMC Nephrol, 2019. **20**(1): p. 20.
97. Thomas, G., et al., *Metabolic syndrome and kidney disease: a systematic review and meta-analysis*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(10): p. 2364-73.
98. Lu, J.L., et al., *Association of body mass index with outcomes in patients with CKD*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(9): p. 2088-96.
99. Kuhlmann, A., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(3): p. F526-33.
100. Freundlich, M., et al., *Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol*. Kidney Int, 2008. **74**(11): p. 1394-402.
101. Lakkis, J.I. and M.R. Weir, *Obesity and Kidney Disease*. Prog Cardiovasc Dis, 2018. **61**(2): p. 157-167.
102. Martin, W.P., et al., *Obesity is common in chronic kidney disease and associates with greater antihypertensive usage and proteinuria: evidence from a cross-sectional study in a tertiary nephrology centre*. Clin Obes, 2020. **10**(6): p. e12402.
103. Sharma, K., *The link between obesity and albuminuria: adiponectin and podocyte dysfunction*. Kidney Int, 2009. **76**(2): p. 145-8.
104. Deji, N., et al., *Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(1): p. F118-26.
105. Li, Y.C., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system*. J Clin Invest, 2002. **110**(2): p. 229-38.
106. Petchey, W.G., D.W. Johnson, and N.M. Isbel, *Shining D' light on chronic kidney disease: mechanisms that may underpin the cardiovascular benefit of vitamin D*. Nephrology (Carlton), 2011. **16**(4): p. 351-67.
107. Ruster, C. and G. Wolf, *The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in obesity-related renal diseases*. Semin Nephrol, 2013. **33**(1): p. 44-53.
108. Thethi, T., M. Kamiyama, and H. Kobori, *The link between the renin-angiotensin-aldosterone system and renal injury in obesity and the metabolic syndrome*. Curr Hypertens Rep, 2012. **14**(2): p. 160-9.
109. Packer, M., *Leptin-Aldosterone-Nepriylsin Axis: Identification of Its Distinctive Role in the Pathogenesis of the Three Phenotypes of Heart Failure in People With Obesity*. Circulation, 2018. **137**(15): p. 1614-1631.
110. Li, P., et al., *Treatment of 5/6 nephrectomy rats with sulodexide: a novel therapy for chronic renal failure*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(5): p. 644-51.
111. Trayhurn, P., C. Bing, and I.S. Wood, *Adipose tissue and adipokines--energy regulation from the human perspective*. J Nutr, 2006. **136**(7 Suppl): p. 1935S-1939S.

112. Houseknecht, K.L., et al., *The biology of leptin: a review*. J Anim Sci, 1998. **76**(5): p. 1405-20.
113. Obradovic, M., et al., *Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 585887.
114. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
115. Adamczak, M. and A. Wiecek, *The adipose tissue as an endocrine organ*. Semin Nephrol, 2013. **33**(1): p. 2-13.
116. Mendoza-Herrera, K., et al., *The Leptin System and Diet: A Mini Review of the Current Evidence*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 749050.
117. Wong, K.E., et al., *Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice*. J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 33804-10.
118. de Git, K.C. and R.A. Adan, *Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation*. Obes Rev, 2015. **16**(3): p. 207-24.
119. Lin, L., et al., *Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(2): p. R504-9.
120. Menendez, C., et al., *Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue*. J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 425-31.
121. Nobre, J.L., et al., *Leptin blocks the inhibitory effect of vitamin D on adipogenesis and cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes*. Gen Comp Endocrinol, 2018. **266**: p. 1-8.
122. Tsuji, K., et al., *Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(8): p. 1711-23.
123. Schnaper, H.W., *The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease*. Adv Chronic Kidney Dis, 2017. **24**(2): p. 107-116.
124. Haller, H., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016. **25**(1): p. 42-9.
125. Farhangi, M.A., et al., *Adipose Tissue Inflammation and Oxidative Stress: the Ameliorative Effects of Vitamin D*. Inflammation, 2017. **40**(5): p. 1688-1697.
126. Goncalves, J.G., et al., *The Blockade of TACE-Dependent EGF Receptor Activation by Losartan-Erlotinib Combination Attenuates Renal Fibrosis Formation in 5/6-Nephrectomized Rats Under Vitamin D Deficiency*. Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 609158.
127. Shapouri-Moghaddam, A., et al., *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6425-6440.
128. Guiteras, R., M. Flaquer, and J.M. Cruzado, *Macrophage in chronic kidney disease*. Clin Kidney J, 2016. **9**(6): p. 765-771.
129. Tan, X., Y. Li, and Y. Liu, *Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(12): p. 3382-93.
130. Bonventre, J.V. and L. Yang, *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4210-21.
131. Sureshbabu, A., S.A. Muhsin, and M.E. Choi, *TGF-beta signaling in the kidney: profibrotic and protective effects*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **310**(7): p. F596-F606.
132. Ferenbach, D.A. and J.V. Bonventre, *Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(5): p. 264-76.
133. Xiong, M., et al., *Loss of vitamin D receptor in chronic kidney disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(7): p. F1107-15.
134. Coimbra, T.M., et al., *Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes*. Kidney Int, 2000. **57**(1): p. 167-82.

135. Amaral, L.S., et al., *Renal changes in the early stages of diet-induced obesity in ovariectomized rats*. *Physiol Res*, 2014. **63**(6): p. 723-32.