

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

KÉSIA ZANUZO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM VITAMINA D
ASSOCIADO À NATAÇÃO REGULAR SOBRE ASPECTOS
HISTOMORFOMÉTRICOS RENAIIS EM ROEDORES OBESOS**

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2019)

KÉSIA ZANUZO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM VITAMINA D ASSOCIADO À
NATAÇÃO REGULAR SOBRE ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS RENAIIS
EM ROEDORES OBESOS**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. João Paulo de Arruda Amorim

Coorientadora: Dra. Sabrina Grassioli

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2019)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Zanuzo, Késia

Efeitos da suplementação crônica com vitamina D associado à natação regular sobre aspectos histomorfométricos renais em roedores obesos / Késia Zanuzo; orientador(a), João Paulo de Arruda Amorim; coorientador(a), Sabrina Grassioli, 2019.

88 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2019.

1. obesidade. 2. exercício físico. 3. vitamina D. 4. rim.
I. Amorim, João Paulo de Arruda. II. Grassioli, Sabrina.
III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

KÉSIA ZANUZO

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM VITAMINA D ASSOCIADO À NATAÇÃO REGULAR SOBRE ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS RENAIS EM ROEDORES OBESOS

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE

Membro da banca: Prof. Dr. Eduardo Alexandre Loth
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE

Membro da banca: Profa. Dra. Márcia Fernandes Nishiyama
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS

FRANCISCO BELTRÃO, PR
Março/2019

BIOGRAFIA

Késia Zanuzo nasceu em Iporã do Oeste/SC em 15/07/1985. Possui graduação em Nutrição pela Universidade do Vale do Itajaí (2007) e Especialização em Nutrição Humana com ênfase em Nutrição Clínica e Alimentação Escolar pela Universidade Paranaense (2010). Atualmente atua como nutricionista supervisora de estágios na Clínica-Escola de Nutrição da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus de Realeza-PR. Tem experiência na área de Alimentação Escolar, atuando como responsável técnica, e na área de Saúde Pública.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom ponto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim, por toda a paciência, empenho e confiança com que sempre me orientou neste trabalho. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar e por ter confiado no meu potencial.

Desejo igualmente agradecer a Profa. Dra. Sabrina Grassioli, que me coorientou neste trabalho, agradeço imensamente pelos conhecimentos repassados, direcionamentos e correções realizadas, além de transmitir todo amor e dedicação com que tem pela sua profissão.

Agradeço também aos demais professores deste programa de mestrado, que através das disciplinas, seminários e redação de artigos foram fundamentais para que eu pudesse chegar até este ponto com mais segurança.

Agradeço igualmente aos meus colegas do mestrado cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Agradeço aos alunos de iniciação científica - PIBIC, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-CCBS, Campus Cascavel, que foram fundamentais para que o trabalho fosse desenvolvido. A nutricionista Zoé que me auxiliou na organização dos dados no software de estatística. As minhas colegas de trabalho, as nutricionistas e professoras Márcia e Eloá, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, dando conselhos, dividindo minhas angústias e por serem exemplos de profissionais e também ao meu colega de trabalho, o médico veterinário Leonardo, que se disponibilizou a me auxiliar com o uso do micrótomo.

Por último, quero agradecer e em especial à minha família e amigas (Sílvia, Cláudia, Eliandra, Tatiana), pelo apoio e amor incondicional que me deram, e por sempre acreditarem em minha capacidade. Saibam que vocês fazem a diferença na minha vida, sempre estando ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais do que imagino.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais presentes em minha vida:

Meu pai, Jandir, meu mestre, meu exemplo e o mais generoso de todos os pais.

À Minha mãe, Jaci, pela fé e alegria de vida que é.

Minhas irmãs, Jussiara e Patrícia, pelo incentivo de sempre.

Meu afilhado, Pedro Henrique, pelos momentos de alegria, carinho e descontração.

AMO MUITO VOCÊS!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH)₂D – 1,25 dihidroxivitamina D
7-DHC – 7-deidrocolesterol
ANSR – Atividade do Nervo Simpático Renal
ARQ – Núcleo Arqueado
AT1 – Proteína Receptora de Angiotensina 1
CYP – Citocromo P
DBP – Proteína de Ligação à Vitamina D
DCV – Doença Cardiovascular
DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DLP – Dislipidemia
DM2 – Diabetes Mellitus Tipo 2
DMO – Densidade Mineral Óssea
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DR – Doença Renal
DRC – Doença Renal Crônica
EFR – Exercício Físico Regular
GESF – Glomeruloesclerose Segmentar Focal
Glu-Rs – Receptores Glutamatérgicos
GPX – Glutaciona Peroxidase
GRO – Glomerulopatia Relacionada à Obesidade
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
HPA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL – Índice de Lee
IL-6 – Interleucina 6
IMC – Índice de Massa Corporal
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos
MRs – Receptores Mineralocorticóides
MSG – Glutamato Monossódico
Na⁺ – Sódio
ND – Nefropatia Diabética

NF-Kb – Fator Nuclear Kappa B
NMDA – N-Metil-D-Aspartato
NO – Óxido Nítrico
PA – Pressão Arterial
PCR – Proteína-C-Reativa
PTH – Hormônio Paratireóide
RI – Resistência à Insulina
SM – Síndrome Metabólica
SNAR – Sistema Nervoso Autônomo Renal
SNS – Sistema Nervoso Simpático
SOD – Superóxido Dismutase
SRAA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
STZ – Estreptozotocina
TAB – Tecido Adiposo Branco
TFG – Taxa de Filtração Glomerular
TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento β
TGF- β 1 – Fator de Transformação do Crescimento- β 1
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α
UI – Unidades Internacionais
VD – Vitamina D
VDR – Receptor da Vitamina D

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema demonstrando a indução da obesidade e protocolos de exercício e de suplementação com VD.....	37
Figura 2 – Fotomicrografia representativa do grupo CON mostrando a medida de diâmetro do tufo glomerular (a), área do tufo glomerular (b), área da cápsula de Bowman (c) e espaço de Bowman (*)......	40
Figura 3 – Fotomicrografia representativa do grupo CON mostrando a medida da espessura do córtex renal (d)......	41

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM VITAMINA D ASSOCIADO À NATAÇÃO REGULAR SOBRE ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS RENAIS EM ROEDORES OBESOS

Resumo

A administração neonatal de glutamato monossódico (MSG) em roedores induz obesidade associada a alterações histopatológicas renais. A vitamina D (VD) parece modular a inflamação renal, enquanto o exercício físico melhora a proteinúria e glomeruloesclerose. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação crônica com VD associada à natação regular sobre aspectos histomorfométricos renais em ratos obesos - MSG. Para tal, ratos Wistar machos (n=24) receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de Glutamato monossódico (MSG; 4g/Kg) enquanto ratos Controles (CON;n=6) receberam salina equimolar. Aos 21 dias de vida os ratos MSG-tratados foram randomicamente distribuídos entre animais sedentários (S) e exercitados (E; natação; 3x/semana), os quais foram subdivididos em suplementados oralmente com VD (12µg/Kg; 3x/semana) ou não suplementados (NS) formando 5 grupos experimentais (n=6 ratos/grupo): MSG; MSG-S_{VD}; MSG-E_{NS}; MSG-E_{VD} e o grupo CON. Após os 90 dias de vida realizou-se eutanásia, e a obesidade foi avaliada pelo peso dos depósitos de tecido adiposo branco (TAB) e cálculo do Índice de Lee (IL). O rim direito foi retirado, pesado e submetido a técnicas histológicas para análise histomorfométrica. Dados foram expressos como média±erro padrão com análise de variância Anova Two-way (p<0,05). No presente estudo, os animais do grupo MSG apresentaram menor peso corporal e comprimento naso-anal, porém elevada adiposidade quando comparados com o grupo CON (p<0,05). Marcantes alterações na morfologia renal foram encontradas em ratos do grupo MSG, tais como, menor diâmetro do tufo glomerular, área do tufo glomerular, área da cápsula de Bowman, área do espaço de Bowman e espessura do córtex renal quando comparado aos mesmos parâmetros renais no grupo CON (p<0,05). Assim, o rim de ratos do grupo MSG foi significativamente menor que o grupo CON (p<0,05), além de apresentar intensa degeneração tubular renal. Em animais MSG-E_{VD} o peso do rim foi reduzido em relação em

relação ao grupo MSG-E_{NS} ($p < 0,05$). Em animais MSG-S_{VD}; MSG-E_{NS} e MSG-E_{VD} houve aumento da espessura do córtex renal em relação ao grupo MSG ($p < 0,05$). Em animais MSG-E_{NS} e MSG-E_{VD} houve redução da degeneração tubular em relação aos ratos MSG e o grupo MSG-E_{VD} também apresentou redução da degeneração tubular renal em comparação com o grupo MSG-S_{VD} ($p < 0,05$). Em conjunto, nossos dados mostraram que ratos MSG-obesos tiveram intensa degeneração glomerular e tubular, similar aquela observada na progressão da doença renal crônica. O exercício e a VD foram efetivos em elevar a espessura do córtex renal, e quando associados, protegeram da degeneração tubular tendo, portanto, importante papel na prevenção de lesão renal.

Palavras-chave: glutamato monossódico, obesidade, vitamina D, exercício físico, rim.

EFFECTS OF CHRONIC SUPPLEMENTATION WITH VITAMIN D ASSOCIATED WITH REGULAR SWIMMING ON HISTOMORPHOMETRIC ASPECTS RENAL IN OBESE RODENTS

Abstract

The neonatal administration of monosodium glutamate (MSG) in rats induces obesity associated histopathological renal alteration. Vitamin D (VD) seems to modulate the renal inflammation, while physical exercise enhances proteinuria and glomerulosclerosis. The objective of this study was to evaluate the effects of chronic supplementation with VD associated to regular swimming over renal histomorphometric aspects in MSG-obese rats. To this end, Wistar male rats (n=24), in their first 5 days of life, were given subcutaneous injections of monosodium glutamate (MSG; 4g/kg) while Control rats (CON;n=6) were given equimolar salt. On the 21st day of live the MSG-treated rats were randomly distributed among sedentary animals (S) and were exercised (E, swimming; 3x/week), which were subdivided in orally supplemented with VD (12µg/Kg; 3x/semana) or not supplemented (NS), forming 5 experimental groups (n=6 rats/group): MSG; MSG-S_{VD}; MSG-E_{NS}; MSG-E_{VD} and the group CON. On the 90th day of life the animals were euthanized and the obesity was evaluated by the weight of the white adipose tissue deposits (WAT) and the Lee Index calculus. The kidney was removed, weighted and submitted to histological techniques for histomorphometric analysis. The data was expressed as mean±SEM with Anova Two-way (p<0.05) variance analysis. In this study, the animals from the groups MSG present lower corporal weight and smaller nasal-anal length, but they presented high adiposity when compared to group CON (p<0.05). Notable alterations in the renal morphology were found in group MSG, such as, smaller diameter of the glomerular tuft, area of the glomerular tuft, area of Bowman's capsule, area of Bowman's space and renal cortical thickness, when compared to the same renal parameters in the group CON (p<0.05). Thus, the kidney of the group MSG was significantly smaller than the group CON (p<0.05), besides presenting intense renal tubular degeneration. In MSG-E_{VD} animals, the weight of the kidney was reduced in relation to group MSG-E_{NS} (p <0.05). In MSG-S_{VD},

MSG-E_{NS} and MSG-E_{VD} animals there was an increase in the cortical thickness in relation to group MSG ($p < 0.05$). In MSG-E_{NS} and MSG-E_{VD} animals there was a reduction of the tubular degeneration in relation to group MSG and the MSG-E_{VD} group also presented reduction of renal tubular degeneration when compared to group MSG-S_{VD} ($p < 0.05$). Jointly, our data showed that MSG-obese rats had intense glomerular and tubular degeneration, similar to the degeneration observed in the progression of chronic renal disease. The exercise and the VD were effective in increasing the thickness of the renal cortex, and when associated, they protected from tubular degeneration having, this way, an important role in the prevention of renal injury.

Key words: monosodium glutamate, obesity, vitamin D, physical exercise, kidney.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Sistema Renal e Doença Renal Crônica.....	16
1.2 Obesidade e o Sistema Renal.....	18
1.3 Vitamina D.....	23
1.4 Exercício Físico.....	29
1.5 Modelo MSG.....	32
2. OBJETIVOS	35
2.1 Geral	35
2.2 Específicos.....	35
3. METODOLOGIA	36
3.1 Animais.....	36
3.2 Treinamento físico	37
3.3 Suplementação com VD.....	38
3.4 Delineamento experimental.....	38
3.5 Eutanásia, peso de órgãos e adiposidade.....	38
3.6 Análise morfológica e morfométrica do rim	39
3.7 Análise estatística	41
4. REFERÊNCIAS	42
5. O exercício físico e a suplementação crônica com vitamina D elevam a espessura cortical renal e diminuem a degeneração tubular renal induzida pelo glutamato monossódico em ratos.	58
6. ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da prevalência de obesidade e sobrepeso tem sido descrito como uma epidemia global que atinge adultos e crianças em países economicamente desenvolvidos e em países que continuam a enfrentar desafios econômicos (NG *et al.*, 2014; COMINATO *et al.*, 2018). A obesidade e o excesso de peso são causados por um desequilíbrio na homeostase energética entre as calorias consumidas e aquelas gastas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Um aumento na ingestão de alimentos de alto teor calórico e diminuição da atividade física devido ao estilo de vida cada vez mais sedentário são os principais fatores que causam desequilíbrio energético (TADA; MIURA, 2018).

Disfunções renais são eventos frequentes em indivíduos obesos e podem ser agravadas pela presença de Síndrome Metabólica (SM) e do Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2). Portanto, compreender a fisiopatologia renal em indivíduos obesos é fundamental para evitar ou atenuar efeitos deletérios sobre a saúde (MCCULLOUGH, 2011).

A obesidade pode ser induzida experimentalmente em roedores pela administração neonatal de glutamato monossódico – o denominado modelo MSG. Dentre as regiões hipotalâmicas destruídas pelo MSG está o núcleo arqueado (ARQ), considerada a mais importante região para o controle hipotalâmico do metabolismo energético (LOBATO *et al.*, 2011), visto que, o ARQ é sede para diferentes sinais periféricos que controlam ingestão alimentar e gasto energético (ROUTH *et al.*, 2014; KOHNO *et al.*, 2016; MORSELLI *et al.*, 2018). Deste modo, roedores MSG desenvolvem uma série de anormalidades neuroendócrinas ao longo do crescimento, que resultam em obesidade com perfil metabólico similar a SM encontrada em humanos obesos (GRASSIOLLI *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2010).

Estudos sugerem que o estilo de vida sedentário e a deficiência de vitamina D (VD) aceleram a ocorrência de SM e que níveis plasmáticos adequados de VD são necessários para os efeitos metabólicos do exercício físico regular (EFR), como o aumento das adipocinas antiinflamatórias, o que interferiria positivamente na regulação da homeostase energética, lipídica e no metabolismo da glicose (HOSEINI; DAMIRCHI; BABAEI, 2017).

Diante do exposto, torna-se de grande importância científica, pesquisar os efeitos da suplementação da VD e a prática EFR nos parâmetros histomorfométricos renais de roedores obesos-MSG, a fim de conhecer possíveis mecanismos de ação, principalmente na prevenção e/ou tratamento de alterações renais induzidas pela obesidade.

1.1 Sistema Renal e Doença Renal Crônica

A função básica dos rins é filtrar o sangue, removendo as toxinas da corrente sanguínea, mas conservando também sais, glicose, proteínas e água, assim como substâncias adicionais essenciais à saúde. Os rins possuem um papel vital na regulação de eletrólitos, manutenção do equilíbrio ácido-básico, regulação da PA e produção de vários hormônios, incluindo calcitriol (metabólito ativo da VD), eritropoietina (envolvidos na produção de glóbulos vermelhos) e renina (controle da PA) (WANG; GARRET, 2017).

O rim é dividido em duas estruturas principais, córtex renal e medula renal, ambos contendo segmentos de néfrons, a principal unidade funcional do rim. Dois tipos de néfrons são encontrados no rim de animais: néfrons corticais, que são mais curtos, e os néfrons justamedulares, mais longos, cujo corpúsculo renal está situado no córtex e as partes tubulares localizadas na medula. Cada néfron contém um tufo de capilares glomerulares (o glomérulo), o qual está invaginado dentro da cápsula de Bowman, uma extremidade proximal dilatada do néfron e semelhante a uma bolsa (GARTNER; HAIATT, 1999).

A região da cápsula de Bowman onde entram os vasos que suprem e saem os que drenam o glomérulo é conhecida como pólo vascular. O glomérulo é suprido pela curta e retilínea arteríola glomerular aferente e drenado pela arteríola glomerular eferente. A região de continuação entre o corpúsculo renal e o túbulo proximal, o qual drena o espaço de Bowman, é chamada pólo urinário. O túbulo proximal formado por epitélio cúbico simples tem como principais funções a reabsorção de 80% de água, sódio (Na⁺) e cloreto (reduzindo o volume do ultrafiltrado) e de 100% de proteína, aminoácidos, glicose e bicarbonato (GARTNER; HAIATT, 1999).

O filtrado que sai do glomérulo entra no espaço de Bowman através de uma barreira de filtração composta por três estruturas: parede endotelial do

capilar, lâmina basal e camada visceral da cápsula de Bowman (os podócitos). O fluído filtrado passa por um túbulo longo (composto por seções distintas dos túbulos- túbulo contorcido proximal, alça de henle, túbulo contorcido distal, túbulo coletor) onde é convertido em urina a caminho do rim, ureteres e, posteriormente, para a bexiga (armazenamento) e uretra (que libera a urina para fora do corpo) (WANG; GARRET, 2017). Próximo à região vascular, localiza-se o túbulo distal, formado por epitélio cúbico simples, que está subdividido em parte reta, o qual, sendo a continuação do ramo delgado ascendente da alça de Henle, é também conhecido como ramo ascendente espesso da alça de Henle e parte contorcida (túbulo contorcido distal). A principal função do túbulo contorcido distal é a sua resposta à aldosterona reabsorvendo o Na^+ e cloreto da luz. Interposta entre o ramo ascendente espesso e o túbulo contorcido distal está uma região modificada do túbulo distal conhecida como mácula densa, cuja principal função é monitorar o nível de Na^+ e o volume do ultrafiltrado na luz do túbulo distal. A mácula densa contata e se comunica com as células justaglomerulares, que são células musculares lisas modificadas localizadas na túnica média das arteríolas glomerulares aferentes (e menos frequentes nas eferentes), que contém grânulos específicos que contêm a enzima proteolítica renina. Dessa forma, a principal função das células justaglomerulares é sintetizar e liberar renina na corrente sanguínea, responsável por iniciar a formação eventual da angiotensina II (GARTNER; HAIATT, 1999).

A lesão traumática no rim pode comprometer a função renal e levar a lesão renal aguda ou mais danos sutis às estruturas do néfron que ao longo do tempo pode levar a doença renal crônica (DRC) ou outras complicações cardiovasculares (por exemplo, Hipertensão Arterial Sistêmica - HAS, hipertrofia cardíaca, etc.) (WANG; GARRET, 2017). Até o momento, vários mecanismos hipotéticos, incluindo estresse oxidativo, alterações do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e transportadores de Na^+ , atividade simpática renal, efeito de glucocorticóide, regulação epigenética, e as diferenças entre os sexos foram relatadas como estando associadas ao desenvolvimento alterado da estrutura ou função renal (SHARMA, 2015; TAIN; HSU, 2017).

A DRC é caracterizada por perda progressiva de néfrons causados pelo aumento da pressão intraglomerular e hiperfiltração. A DRC está associada a uma alta prevalência de várias outras doenças, e se tornou um problema de saúde

mundial devido a altos custos econômicos envolvidos no diagnóstico e tratamento da DRC (YAMASHITA *et al.*, 2008).

Os mecanismos patogênicos que levam à DRC convergem em uma via comum que resulta em fibrose intersticial progressiva, perda capilar peritubular com hipóxia e destruição de néfrons funcionais devido à atrofia tubular. O recrutamento intersticial de leucócitos inflamatórios e miofibroblastos ocorrem precocemente nos rins destinados a desenvolver fibrose. Monócitos circulantes são recrutados por moléculas quimioatrativas secretadas localmente, facilitadas por moléculas de adesão leucocitária. Macrófagos funcionalmente heterogêneos secretam muitas moléculas promotoras de fibrose, mas sob algumas circunstâncias elas também podem servir como um papel protetor de eliminação. Túbulos, células inflamatórias e miofibroblastos sintetizam as moléculas que ativam as cascatas fibrogênicas, sendo a mais importante delas o fator de transformação do crescimento β (TGF- β). O TGF- β pode direcionar as células a assumirem um fenótipo profibrótico ou pode fazê-lo indiretamente após estimular a síntese de outras moléculas fibrogênicas, como o fator de crescimento do tecido conjuntivo e o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (EDDY, 2005).

Dessa forma, aprofundar o conhecimento e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a DRC parecem promissores, principalmente agindo na interferência dos componentes da cascata fibrogênica e inflamatória.

1.2 Obesidade e o Sistema Renal

Pesquisas conduzidas sobre a obesidade e suas complicações nas duas últimas décadas transformaram o conceito ultrapassado de Tecido Adiposo Branco (TAB), que era visto apenas como um depósito de energia. O TAB é agora reconhecido como um órgão ativo e inflamatório capaz de produzir uma ampla variedade de fatores conhecidos como adipocinas que participam através de mecanismos endócrinos, parácrinos, autócrinos ou justacrinos em uma grande variedade de processos fisiológicos ou fisiopatológicos, regulando a ingestão de alimentos, sensibilidade à insulina, imunidade e inflamação (FRANCISCO *et al.*, 2018).

A obesidade causa vários problemas de saúde aumentando o risco de desenvolver DM2, dislipidemias (DLP), HAS, doença cardiovascular (DCV),

doença hepática gordurosa, certos tipos de câncer, demência, apnéia obstrutiva do sono, entre outros. O aumento do excesso de peso e obesidade reduz a expectativa de vida em 5 a 13 anos, aumenta os gastos com a saúde em 50 a 200% e altera dramaticamente a qualidade de vida (PETEERS *et al.*, 2003; TADA; MIURA, 2018).

A SM é definida por um conjunto de fatores fisiológicos, bioquímicos, clínicos e metabólicos interconectados que aumentam diretamente o risco de DCV, DM2 e mortalidade por todas as causas. Sabe-se que a inflamação crônica está associada à obesidade visceral e à resistência à insulina (RI), que é caracterizada pela produção de adipocitocinas anormais, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, leptina e adiponectina. A interação entre componentes do fenótipo clínico da síndrome com seu fenótipo biológico (RI, DLP, etc.) contribui para o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório e uma inflamação vascular crônica subclínica que modula e resulta em processos ateroscleróticos (KAUR, 2014).

A Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2006) e as Diretrizes Brasileiras de Obesidade (ABESO, 2016) tem proposto que os critérios de SM incluam pelo menos três dos quatro principais componentes da doença - obesidade abdominal, RI, DLP e HAS.

Estudos mostram um aumento da incidência de DRC em pacientes com SM (BRATOEVA *et al.*, 2017). Uma associação positiva entre HAS, DM e hiperlipidemia com incidência e progressão da DRC foi estabelecida com a obesidade como um fator de risco independente para o seu desenvolvimento (DAI *et al.*, 2016; ZAMMIT *et al.*, 2016). Supõe-se que os principais componentes da SM - obesidade, RI, DLP e HAS - estejam ligados ao dano renal através da liberação sistêmica de vários mediadores pró-inflamatórios, como ácido úrico, proteína C-reativa (PCR) e estresse oxidativo generalizado, que causam um desequilíbrio nos principais fatores vasoativos e, portanto, disfunção endotelial, deteriorando a função renal (AGRAWAL *et al.*, 2009; BRATOEVA *et al.*, 2017). Pacientes com SM apresentam doença microvascular caracterizada por microalbuminúria, diminuição da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), atrofia tubular, fibrose intersticial e glomeruloesclerose (JOYCE *et al.*, 2018).

A HAS é uma das duas principais causas de DRC e a prevalência é ainda maior se estiver associada ao sobrepeso ou a obesidade (JONES *et al.*,

2012). A obesidade é um fator que promove maior reabsorção de Na⁺, deterioração da natriurese e expansão do volume extracelular, alterações associadas ao aumento da pressão arterial (PA) e hiperfiltração glomerular, além da ativação do SRAA e do Sistema Nervoso Simpático (SNS), exacerbação da HAS e desenvolvimento de dano renal (RAHMOUNI *et al.* 2005; JOYCE *et al.*, 2018

O aumento da reabsorção renal de Na⁺ desempenha um papel importante no início do aumento da PA associada ao excessivo ganho de peso, sendo que a obesidade requer uma PA mais alta que o normal para manter o equilíbrio de Na⁺, indicando natriurese com pressão renal prejudicada. Pelo menos três fatores principais parecem prejudicar a natriurese da pressão renal e aumentar a PA durante o ganho de peso rápido e excessivo: (1) compressão física dos rins devido ao aumento da gordura visceral, retroperitoneal e do seio renal; (2) ativação do SRAA, incluindo ativação de receptores mineralocorticóides (MRs) independentes de aldosterona; e (3) ativação do SNS, especialmente aumento da ANSR. Além disso, a DRC pode, por um período muito mais longo, ampliar os efeitos da pressão desses mecanismos, tornando a HAS associada à obesidade mais difícil de controlar e menos facilmente revertida pela perda de peso (HALL *et al.*, 2015).

A RI, por sua vez, é capaz de induzir vasoconstrição do endotélio por antinatriurese e retenção de Na⁺, e também aumenta a ativação e acúmulo de lipídios que estão associados com lesão renal na SM. Outros fatores que têm associados à RI e ao dano renal são: a proteína de ligação a elemento regulador de esteroide 1, o fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1), o depósito de gotículas lipídicas em células tubulares e o acúmulo de matriz extracelular intersticial por insulina (HAO *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2016). O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e a diferenciação da vascularização das células musculares induzem o fator de crescimento do tecido conjuntivo com ações pró-fibróticas em células tubulares renais (KINASHI *et al.*, 2017; XI *et al.*, 2017).

O endotélio, uma monocamada de células que reveste a parede luminal dos vasos sanguíneos, regula a interação celular e a circulação de proteínas com células que residem na parede vascular, a homeostase vascular e o controle das funções vasculares renais. A disfunção endotelial é considerada

uma manifestação de doença vascular e participa ativamente do desenvolvimento da aterosclerose, um fator importante na patogênese DM, HAS e nefropatia diabética (ND), juntamente com microalbuminúria (GARG; BAKRIS, 2002).

A insulina causa vasodilatação do endotélio através da ação do óxido nítrico (NO), sendo que a insulina intervém em vários pontos na via de sinalização do NO, pois favorece o transporte do precursor do NO e L-arginina, aumenta a atividade das sintases do NO e, portanto, infere a produção deste vasodilatador. Em condições de RI, SM, DM e HAS, a vasodilatação do endotélio é claramente danificada (JOYCE *et al.*, 2018). Essa disfunção e o aumento do NO contribuem para a hiperfiltração renal, um processo inicial característico de dano renal. Na nefropatia avançada associada à HAS e proteinúria, há uma perda progressiva na biodisponibilidade do NO, causada por vários fatores (PRABHAKAR, 2004). Estudos em animais experimentais forneceram informações sobre os mecanismos ligados às alterações cardiovasculares e renais associadas à obesidade. As alterações metabólicas, endócrinas, cardiovasculares e renais causadas pela obesidade induzida pela dieta nesses animais experimentais são similares às mudanças observadas em humanos obesos. Por exemplo, a hiperfiltração glomerular observada no início da obesidade pode ser substituída por um declínio gradual na TFG, porque a lesão renal e a perda do néfron ocorrem em associação com HAS prolongada, DM e DLP (HALL *et al.*, 2014).

A obesidade causa várias alterações estruturais, hemodinâmicas e metabólicas no rim. A maioria destas é provável que sejam respostas compensatórias ao aumento sistêmico da demanda metabólica que se observa com a obesidade. Em alguns casos, no entanto, a lesão renal torna-se clinicamente aparente como resultado da falha compensatória. A glomerulopatia relacionada à obesidade (GRO) é o mais conhecido de tais estados de doença. Fatores que podem sensibilizar indivíduos obesos para insuficiência compensatória renal e lesão associada incluem a gravidade e o número de condições ou complicações associadas à obesidade, incluindo componentes da SM e o desajuste do tamanho corporal em relação à massa de néfrons, devido a reduções de néfrons de origem congênitas ou adquiridas (TSUBOI *et al.*, 2017).

Características típicas da histopatologia renal para a GRO incluem glomerulomegalia e glomerulosclerose segmentar focal (GESF). A

glomerulomegalia é muito provável como resultado de anormalidades na hemodinâmica renal associada à obesidade, incluindo aumento do fluxo de sangue renal e TFG (CHAGNAC *et al.*, 2000; CHAGNAC *et al.*, 2003). Os capilares glomerulares de pacientes com GRO parecem aumentar em número, sugerindo uma nova formação de microvasos. A expressão de fatores de promoção do crescimento capilar, como o fator de crescimento endotelial vascular é aumentada nos tecidos glomerulares de pacientes GRO, apoiando essa idéia (WU, 2006).

Chen *et al.* (2017) avaliaram a relação entre adiposidade visceral e função renal e estimou o risco de DRC em uma população adulta relativamente saudável em Taiwan. Este estudo envolveu 23.570 indivíduos com idade ≥ 18 anos. Conforme apontam os resultados, os indivíduos com maior adiposidade visceral apresentaram riscos aumentados de DRC. Segundo estes autores, uma avaliação da adiposidade visceral poderia ser uma ferramenta aplicável para a detecção precoce de DRC em adultos relativamente saudáveis, especialmente em homens.

Há poucos estudos sobre alterações estruturais nos túbulos renais associados à obesidade. A análise morfométrica pode ser dificultada pela complexidade estrutural dos túbulos renais. Um estudo de amostras de biópsia de pacientes proteinúricos encontrou que a área de seção transversal das células epiteliais tubulares proximais era 33% maior e o lúmen tubular proximal 54% maior do que nos pacientes não obesos proteinúricos (TOBAR *et al.*, 2013).

Segundo Wisse (2004) a obesidade é uma condição inflamatória crônica de baixo grau, na qual o tecido adiposo serve como fonte de citocinas inflamatórias. O tecido adiposo visceral produz menos adiponectina e mais citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α e a IL-6, que podem induzir RI e promover a disfunção endotelial. Os adipócitos podem facilitar a vasculogênese localmente e nos órgãos distais secretando fatores angiogênicos (HAMDY; PORRAMATIKUL; AL-OZAIRI, 2006).

Assim, é provável que muitos efeitos deletérios da obesidade sobre a estrutura e função renal possam ser resultantes da ação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) que são segregadas pelos componentes da infiltração de macrófagos no tecido adiposo para induzir alterações no fenótipo celular gerando uma amplificação do processo inflamatório (GUZIK; MANGALAT; KORBUT, 2006). Os níveis de TNF- α ,

abundantemente produzidos pelos adipócitos, é positivamente correlacionada com o grau de obesidade e de concentração de insulina no plasma, diminuindo quando melhora a sensibilidade insulina. O TNF- α induz a RI através da redução da atividade de GLUT4 em tecido adiposo, sendo capaz de produzir a disfunção endotelial mediada por indução da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e do músculo liso. A IL-6 é outra citocina pró-inflamatória que se correlaciona com o peso corporal e a RI. Estudos experimentais têm demonstrado que o bloqueio da IL-6 evita a progressão da proteinúria e deposição de lípidos renal e a proliferação de células mesangiais, na presença de hiperlipoproteinemia grave. A MCP-1, cuja expressão em condições normais é indetectável, pode ser induzida por outras quimiocinas sendo um mediador chave na aterogênese. É interessante notar que a redução de peso em pacientes obesos é acompanhada por uma diminuição concomitante nos seus níveis (NAVARRO; ARDILES, 2015).

A via final comum da DRC é caracterizada pela progressiva fibrose glomerular e/ou túbulo-intersticial, lesão capilar peritubular por hipóxia e perda de funcionamento dos néfrons por esclerose glomerular e atrofia tubular, independentemente do mecanismo primário que desencadeou a lesão renal. Nesse processo fisiopatológico de progressão da lesão renal tem sido cada vez mais detectada a participação dos mecanismos inflamatórios (EDY, 2005; VIANNA *et al.*, 2011).

Segundo James, Hemmelgar e Tinelli (2010) existem estratégias eficazes para retardar a progressão da DRC e reduzir o risco cardiovascular. O tratamento da PA elevada é recomendado para todos os indivíduos já diagnosticados com DRC ou para indivíduos que estão com risco de desenvolvê-la. O uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores dos receptores da angiotensina é usado de preferência para pacientes com DRC diabética ou aqueles com o distúrbio não-diabético proteinúrico. O controle glicêmico pode ajudar a prevenir o início dos estágios iniciais da DRC em indivíduos com diabetes.

1.3 Vitamina D

No início dos anos 1970, a 1,25-di-hidroxitamina D3 [1,25 (OH) 2D3] foi identificada como a forma exclusiva e metabolicamente ativa da VD e um

componente chave do que provou ser um sistema endócrino requintado que regula numerosos processos biológicos em vertebrados superiores (PIKE; CHRISTAKOS, 2017).

O metabolismo da VD é um processo complexo que ocorre dentro de múltiplos órgãos do corpo humano e uma de suas funções mais reconhecidas é manter a homeostase do cálcio e controlar o metabolismo ósseo. Tudo começa com o 7-DHC que, quando exposto à luz UVB na pele humana, se transforma em vitamina D3 (colecalfiferol) através do isômero intermediário pré-vitamina D3. Alternativamente, uma pequena porção de vitamina D3 pode ser ingerida diretamente pelo consumo de produtos de origem animal (especialmente óleo de peixes). Outra forma isomérica, a vitamina D2 (ergocalciferol), não é sintetizada pelo nosso próprio corpo, mas pode ser extraída de algumas plantas e fungos. A vitamina D2 e uma pequena quantidade de vitamina D3 são absorvidas no intestino delgado por meio de difusão passiva e transportadores de colesterol (REBOUL *et al.*, 2011). Ambas as formas se comportam de maneira semelhante e passam pelo mesmo processo metabólico e quando ativadas se ligam ao receptor da VD (VDR), embora o metabólito ativo da vitamina D3 tenha provado ser mais potente (HEANEY *et al.*, 2011).

A VD sintetizada por via cutânea ou ingerida é subsequentemente transportada para o fígado, normalmente ligada a uma proteína de ligação à vitamina D (DBP), onde a hidroxilação na posição 25 pela enzima CYP2R1 hepática (25-hidroxilase) produz 25-hidroxivitamina D (25(OH)D). A VD ingerida é absorvida pelas células intestinais e transportada por quilomicrons na linfa antes de ser entregue a corrente sanguínea (SCHUSTER, 2011; QUESADA-GOMEZ; BOUILLON, 2018).

A 1,25(OH)₂D hormonalmente ativa é produzida no túbulo renal proximal pela enzima citocromo p450, família 27, subfamília B, polipéptido 1 (CYP27B1 mitocondrial-1 α -hidroxilase), após uma segunda hidroxilação na posição 1. Esta é a única enzima do citocromo p450 capaz de realizar esta reação como foi claramente demonstrado pela ausência total de 1 α , 25 (OH) 2D em camundongos ou humanos com deleção bi-alélica do gene para CYP27B1 (QUESADA-GOMEZ; BOUILLON, 2018).

De acordo com Quesada-Gomez e Bouillon (2018), há condições específicas em que a atividade das enzimas do citocromo pode ser anormal,

como por exemplo, em indivíduos que fazem uso de anticonvulsivantes, corticosteróides, alguns antiretrovirais e drogas antituberculose, e em outras doenças que apresentam anormalidades nas concentrações de VD como na insuficiência hepática avançada, obesidade, má absorção intestinal, síndrome nefrótica ou DRC.

O VDR foi descoberto inicialmente em tecidos envolvidos na regulação da homeostase do cálcio e fósforo, como, intestino, ossos, rins e paratireóides. Sendo que estes tecidos possuem os mais altos níveis de expressão do VDR, sendo que este achado não foi surpreendente. No entanto, como a expressão do VDR emergiu em outros tecidos, ficou claro que a ação da VD em muitos alvos celulares não estava relacionada à regulação mineral, sugerindo a probabilidade de funções adicionais de hormônio da VD (PIKE *et al.*, 2017).

Atualmente, sabe-se que o VDR é expresso em muitos tipos de células que não regulam o cálcio, incluindo fibroblastos dérmicos e queratinócitos da pele, células imunes, tipos celulares cardiovasculares selecionados e componentes celulares de vários outros tecidos (WANG; ZHU; DELUCA, 2012). A literatura moderna mostra que a VD regula a expressão gênica associada à autoimunidade, tumores e infecções e o faz controlando a ativação do VDR, que é um receptor nuclear tipo 1 e um fator de transcrição de ácido desoxirribonucleico (DNA) (MANUCHA; JUNCOS, 2017).

A insuficiência de VD é comum em indivíduos com obesidade, e a relação exata ainda não foi identificada. O tecido adiposo é um local de armazenamento para VD lipossolúvel, e altos níveis de VD foram encontrados no tecido adiposo de pessoas obesas, apesar destas pessoas serem consideradas deficientes em VD (DIX; BARCLEY; WRIGHT, 2018). Acredita-se que a VD, que é solúvel em gordura, é sequestrada no tecido adiposo, o que resulta em níveis mais baixos em obesos. Isso significaria que a obesidade causa deficiência de VD e não o contrário (SKAABY; THUESEN; LINNEBERG, 2017).

Há evidências experimentais de que concentração de VD na gordura subcutânea aumenta com a suplementação de VD, e um estudo *in vitro* sugere que adipócitos de pessoas obesas com RI podem ter comprometimento da liberação de VD (DIDRIKSEN *et al.*, 2015; DI NISIO *et al.*, 2017). Os adipócitos expressam 1-hidroxilase que ativa 25(OH)D, mas também 24-hidroxilase, que inativa 25(OH)D. A atividade das enzimas pode ser alterada na obesidade, que

poderia afetar a quantidade de 25(OH)D disponível para liberação no soro. No entanto, a distribuição e concentração de 25(OH)D na gordura subcutânea e omental não diferem entre pessoas obesas e com peso normal, e a correlação entre 25(OH)D na gordura subcutânea e soro é semelhante em obesos e indivíduos com peso normal (WAMBERG *et al.*, 2013; CARRELLI *et al.*, 2017);

Outras possibilidades de deficiência de VD em obesos incluem diminuição de atividades ao ar livre, síntese prejudicada na pele da VD, maus hábitos alimentares, alterações na síntese no fígado a partir de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), degradação aumentada de 25(OH)D causado pelo aumento da atividade do citocromo P (CYP) 24A1, diminuição da síntese de 1,25(OH)2D causada por alteração da atividade 1- α hidroxilase e *feedback* negativo causado pelo aumento dos níveis de hormônio paratireoide (PTH) e calcitriol (CHAKHTOURA; RAHME; EL-HAJJ FULEIHAN, 2017). Uma explicação alternativa da deficiência de VD é que a produção de 1,25(OH)2D está aumentada em indivíduos obesos exercendo também um *feedback* negativo sobre a síntese hepática de 25(OH)D (BORGES *et al.*, 2018).

Outro mecanismo da deficiência de VD em obesos é provavelmente a diluição volumétrica de 25(OH)D em maior volume tecidual. A implicação clínica deste efeito de diluição volumétrica é que pessoas obesas precisarão de doses maiores de VD do que pessoas com peso normal para atingir o mesmo nível sérico de VD, mas a cessação da suplementação pode ter uma diminuição mais lenta da VD sérica por causa da redistribuição de outras reservas de tecido. Por outro lado, pessoas com baixo peso corporal teriam um grande aumento na VD sérica após a dosagem (por causa do menor volume de distribuição), mas se tornariam deficitárias rapidamente novamente se a suplementação fosse interrompida (devido ao menor armazenamento de tecido) (WALSH; BOWLES; EVANS, 2017).

Existem estudos avaliando os efeitos renais da VD, sendo essa área de pesquisa particularmente importante, pois, independentemente de sua natureza, a DRC aumenta o risco cardiovascular (HOLICK, 2007). Assim, a proteção renal induzida pela VD pode indiretamente reduzir o risco cardiovascular, reduzindo a progressão da doença renal (DR). Proteger o dano renal com VD pode se tornar uma meta terapêutica não apenas para prevenir a progressão de DCV ou renais, mas também para satisfazer as múltiplas necessidades da VD, pois o rim, embora

não seja o único regulador da 1,25(OH)₂D, continua a ser o principal produtor desse metabólito de VD mais ativo e, como resultado, a lesão renal avançada pode ter consequências significativas não apenas no metabolismo ósseo (raquitismo, osteomalácia, hiperparatireoidismo secundário), mas também em outros sistemas orgânicos, incluindo proliferação celular, diferenciação e angiogênese (MANUCHA; JUNCOS, 2017).

Vários estudos indicam que a VD também parece desempenhar um papel protetor contra o desenvolvimento da HAS (GELEJINSE, 2011). Estudos em animais demonstraram que a deficiência de VD está associada à HAS por mecanismos que revelam um efeito direto sobre o eixo SRAA. Uma sinalização alterada de VD em diferentes modelos animais pode estar envolvida nas doenças como HAS, hipertrofia cardíaca e aterosclerose (SCRAGG; SOWERS; BELL, 2007). O SRAA intrarrenal é um fator chave para danos renais e a deficiência de VD ativa o SRAA local no rim e, portanto, causa lesão renal. Sabe-se que a VD é um regulador negativo do SRAA suprimindo a expressão da renina (LI *et al.*, 2002).

Além disso, modelos humanos e experimentais de DRC bem como ensaios clínicos sugerem que a VD ativa e/ou seus análogos são renoprotetores, resultando em uma atenuação de proteinúria, inflamação, glomeruloesclerose e fibrose intersticial, melhorando assim as funções renais (LUCISANO *et al.*, 2013). A suplementação farmacológica de VD pode ser uma estratégia racional para deter o ciclo vicioso entre sua deficiência e declínio na função renal em pacientes com DRC (SANTORO *et al.*, 2015).

O factor nuclear kappa B (NF-κB) regula uma ampla gama de genes envolvidos na inflamação proliferação e fibrogênese que são conhecidas por desempenhar papéis importantes na doença renal. O NF-κB é uma família de fatores de transcrição que funcionam como um regulador da resposta imune. A VD suprime a ativação do NF-κB, parcialmente bloqueando sua translocação nuclear e interromper sua ligação ao DNA. Investigações recentes mostraram que o paricalcitol protege contra danos nos rins bloqueando a atividade do NF-κB e reduzindo a inflamação em modelos experimentais de DR (LI, 2013).

Estresse oxidativo, HAS, e citocinas inflamatórias estão associadas a alterações renais e cardiovasculares e a VD melhora o perfil hemodinâmico,

lipídico, assim como possui efeitos antioxidantes, que poderiam explicar seus efeitos protetores tanto a nível cardíaco quanto renal (SHAMARDL *et al.*, 2017).

Esses efeitos benéficos do tratamento em áreas além da função óssea podem ter provocado o aumento acentuado do uso de terapias com VD. Da mesma forma, diretrizes e conselhos de diretores médicos apoiaram ainda mais o uso disseminado da suplementação de VD, com uma ingestão recomendada de 400 Unidades Internacionais (UI) por dia para aqueles com 4 anos ou mais no Reino Unido (SCIENTIFIC ADVISORY COMMITTEE ON NUTRITION, 2016; PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2015).

Os efeitos adversos da suplementação de VD parecem ser raros (RAZZAQUE, 2017). A toxicidade da VD está associada ao aumento da absorção de cálcio do intestino e hipercalcemia. Além disso, o excesso de VD pode aumentar a reabsorção óssea, aumentando ainda mais os níveis de cálcio. A recomendação de concentração sérica ideal de 25OHD é de 50 a 150nM (20 a 60 ng/ml) para crianças e adolescentes e 75 a 200 nM (30 a 80 ng/dL) para adultos (HOLICK *et al.*, 2011; LEGARTH *et al.*, 2018). Além de hipercalcemia, os sinais iniciais de intoxicação por VD são hipercalciúria e hiperfosfatemia. Em caso de overdose, hipercalcemia e/ou sintomas associados à hiperfosfatemia podem ocorrer, tendo como exemplos: fraqueza, fadiga, dor de cabeça, perda de apetite, boca seca, náuseas, vômitos, sintomas cardiovasculares e outros (LEGARTH *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por Gaspar *et al.* (2017), com altas doses de VD (3000 UI/kg/dia (75 µg/kg/dia) em ratos, observaram benefícios metabólicos, como aumento da sensibilidade à insulina e diminuição da massa corporal, porém também encontraram danos significativos nos rins, como congestão intersticial acentuada e calcificação dos vasos, bem como danos intersticiais graves.

Para a suplementação geralmente recomenda-se ergocalciferol oral (vitamina D2) ou colecalciferol (vitamina D3), sendo este último o mais popular. Preparações intramusculares podem ser usadas, embora isso raramente seja necessário, tendendo a ser reservado para casos de má absorção (NATIONAL OSTEOPOROSIS SOCIETY, 2013). Há relatos crescentes de toxicidade de VD na literatura que parecem relacionar-se com erros de fabricação, erros de prescrição e uso crescente de alta dose na suplementação de produtos (DAVIES; POOLE; FELDSCHREIBER, 2014; TAYLOR; DAVIES, 2018).

Portanto, é necessário realizar mais estudos que investiguem o uso da VD em pessoas com obesidade, risco de HAS, aterosclerose, DCV, DRC, entre outras doenças, para que além de estudar seus efeitos benéficos na prevenção e/ou tratamento das mesmas, também investigar o envolvimento dessas patologias no metabolismo da VD e o uso de doses que não causem toxicidade.

1.4 Exercício Físico

As evidências mostram que uma das mais importantes mudanças no estilo de vida para a prevenção de muitas doenças crônicas é o exercício físico, e como consequência, o exercício é agora reconhecido como um tratamento médico (CARDINAL *et al.*, 2015).

Programas regulares e consistentes de exercícios reduzem significativamente os depósitos de gordura abdominal, independentemente da perda de peso. É reconhecido que mudanças na composição corporal - particularmente uma redução nos depósitos de gordura abdominal - são mais importantes do que reduções no peso corporal total, ou Índice de Massa Corporal (IMC¹), no tratamento da SM. Reduções nos depósitos de gordura abdominal são importantes porque a obesidade abdominal é um marcador de tecido adiposo disfuncional, o qual secreta biomarcadores pró-inflamatórios, incluindo prostaglandinas, PCR e citocinas, como IL-6, TNF- α e leptina (LEE *et al.*, 2005; DESPRÉS, 2008).

Como já relatado anteriormente, a obesidade abdominal ou visceral tem um papel central no desenvolvimento de um estado pró-inflamatório que está associado à SM e tem-se sugerido que o exercício, como uma intervenção médica, deve ser prescrito de acordo com o modo, intensidade, frequência e duração (SWISHER, 2010). A prescrição para o exercício também deve ser especificamente baseada nas capacidades e necessidades do indivíduo (PALEY; JOHNSON, 2018).

O acúmulo de gordura ectópica no tecido ao redor das vísceras está diretamente relacionado ao desenvolvimento de RI. Acredita-se que a RI seja o denominador comum no desenvolvimento da SM. Além disso, evidências

¹ IMC = peso (kg)/altura (m)².

sugerem que a inflamação sistêmica é um fator importante em seu desenvolvimento, através do desenvolvimento de RI (BROOKS; BLAHA; BLUMENTHAL, 2010).

A hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é evidente na obesidade abdominal e também está associada a RI devido a um aumento nos níveis de cortisol. O cortisol, secretado pelas glândulas suprarrenais, está envolvido na gliconeogênese, que aumenta o açúcar no sangue em resposta ao estresse. Dados epidemiológicos fornecem evidências de uma associação positiva significativa entre o aumento dos níveis de cortisol e o risco de desenvolver DM2 e aterosclerose devido à falha em suprimir a inflamação (NIJM; JONASSON, 2009; KYROU, TSIGOS, 2008).

Outra característica da SM, a HAS, que é o risco evitável mais comum de fator de risco para DCV, incluindo insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, fibrilação atrial, doença arterial periférica, DRC e comprometimento cognitivo, sendo uma das principais contribuintes individuais para todas as causas de mortalidade e incapacidade em todo o mundo, também tem efeitos positivos em seu controle com o exercício físico (OPARIL *et al.*, 2018).

Existem múltiplos mecanismos no desenvolvimento da HAS em pacientes com DRC, incluindo ativação inapropriada do SRAA e o SNS, expansão de volume devido ao aumento da reabsorção de Na⁺, vasoconstrição periférica, aumento dos níveis de endotelina-1, inflamação e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como redução da liberação de NO. Muitos desses fatores aceleram o desenvolvimento da DR e aumentam o risco de DCV entre os pacientes com DM e HA (DOJKI; BAKRIS, 2018).

Pechter *et al.* (2003) relataram que um programa de exercício de 12 semanas de baixa intensidade baseado em natação em 26 pacientes com DRC leve a moderada resultou em diminuição da PA, proteinúria reduzida e uma leve melhora na TFG. Isso foi associado a uma diminuição na pressão arterial sistólica e diastólica e no estresse oxidativo.

Estudos recentes sugerem que a atividade mitocondrial reduzida no DM pode ser a base para a progressão da DR, através do aumento da inflamação e dos fatores pró-fibróticos, e o exercício físico auxiliaria na redução dos danos, pois é um estímulo muito forte para a biogênese mitocondrial. Os ensaios clínicos

têm demonstrado que o treinamento, especialmente o treinamento de alta intensidade, pode retardar o início do DM e melhorar a RI (HALLAN; SHARMA, 2016).

As melhorias induzidas pelo exercício físico na melhora da RI sem redução no peso corporal ou diminuição do tecido adiposo é provavelmente devido ao aumento do teor de GLUT-4, elevada síntese de glicogênio ou atividade enzimática oxidativa aumentada. Os mecanismos responsáveis pelas melhorias induzidas pelo treinamento de exercícios na glicemia podem estar intimamente associados com o fluxo de glicogênio (HAYS; GALASSETTI; COKER, 2008).

Pacientes diabéticos com DRC e albuminúria geralmente desenvolvem insuficiência renal progressiva (ROSSING *et al.*, 2005). Portanto, os efeitos do exercício na albuminúria e na progressão da DR nessa população são de grande importância clínica. A albuminúria em pacientes DM2 está associada à disfunção endotelial e inflamação de baixo grau (STEHOUWER *et al.*, 2002). O exercício está associado à diminuição da inflamação e há uma associação positiva entre inflamação e microalbuminúria (BARZILAY *et al.*, 2004). Assim, pode ser esperado que uma redução induzida pelo exercício na inflamação e/ou no estresse oxidativo diminua a proteinúria e diminua a progressão da DR (SMITH; BURTON, 2012).

O treinamento de intensidade moderada, além de beneficiar o controle metabólico, melhora a função renal, reduz a microalbuminúria, restaura o equilíbrio oxidativo e aumenta a biodisponibilidade do NO em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) (KURDAK *et al.*, 2010). O exercício aeróbico regular, especialmente previamente realizado, antes da indução de DM, melhorou o controle metabólico e tem ação renoprotetora sobre o rim diabético (AMARAL *et al.*, 2016). Coelho *et al.* (2010) demonstraram que o treinamento físico realizado antes do início da lesão renal é capaz de melhorar os parâmetros de estresse oxidativo, possivelmente reduzindo a produção de oxidantes sem alterar a função renal e o sistema de defesa antioxidante.

No estudo de De Souza *et al.* (2012), os resultados mostraram que o treinamento físico é um componente importante no tratamento da DRC, pois exerceu influência positiva nos parâmetros de estresse oxidativo, principalmente na redução da produção de superóxido e dano oxidativo, assim como

uma melhora no sistema de defesa antioxidante, como o aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPX).

Neste contexto, identifica-se a necessidade de melhorar a compreensão do papel do EFR sobre a obesidade e a DR, contribuindo na busca de alternativas de intervenções para a melhoria da qualidade de vida da população em geral.

1.5 Modelo MSG

Um modelo semelhante de SM pode ser obtido em ratos por administração subcutânea de MSG, que, em doses elevadas, danifica as áreas centrais do hipotálamo como o ARQ e neurônios circunventriculares, sendo este modelo denominado de modelo MSG (HIRATA *et al.*, 1997). Durante a idade adulta, roedores MSG apresentam crescimento atrofiado, obesidade leve, aumento do acúmulo de gordura, DLP, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e RI, o que o caracteriza como um modelo de SM (GASPAR *et al.*, 2016).

O modelo de roedores MSG apresenta aumento da modulação simpática da variabilidade da frequência cardíaca, barorreflexo alterado e é hipertenso quando adulto (KARLEN-AMARANTE *et al.*, 2014). A ativação do SNS implica na patogênese de componentes específicos da SM e está associada ao aumento do risco cardiovascular. Estudos em animais confirmaram que a ativação excessiva do SNS exerce efeitos desfavoráveis sobre o sistema cardiovascular induzindo hipertrofia cardíaca, remodelação arterial e disfunção endotelial (GRASSI, 2006). Este aumento da atividade pode levar ao aumento da PA via vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção tubular renal de Na⁺ (RHAMOUNI *et al.*, 2005).

O aumento do sistema nervoso autônomo renal (SNAR) observado em roedores modelo MSG sugere que um fluxo simpático alterado para o rim pode contribuir para a HAS leve no roedor obeso MSG e também sugere o envolvimento do SRAA na obesidade do MSG; sendo que o aumento do SNAR observado no modelo MSG pode ser devido ao aumento dos níveis de leptina (MATTOS *et al.*, 2012). Observou-se em rato MSG com 3 meses de idade um aumento no nível plasmático de leptina em comparação com ratos controle (MACHO *et al.*, 2000). A leptina causa ativação simpática em outros leitos que

não são geralmente considerados termogênicos, como o rim e a glândula adrenal (MATTOS *et al.*, 2012).

Um estudo que se propôs a investigar as características de receptores de angiotensina II no tecido adiposo de roedores MSG, observou elevação de proteína receptora angiotensina 1 (AT1) e, menor ligação à angiotensina II no tecido adiposo neste modelo. Os autores sugeriram que poderia ser um defeito geral na membrana celular dos adipócitos para a obesidade MSG (PINTÉROVÁ *et al.*, 2001; ZORAD *et al.*, 2003).

Este modelo MSG também é caracterizado por hiperinsulinemia e maior secreção de insulina associada à hiperglicemia precoce. Todas as disfunções neste modelo são essenciais para fazer dos animais obesos e pré-diabéticos MSG um bom modelo para estudar as doenças metabólicas e seus distúrbios associados (MARTIN *et al.*, 2016).

O acúmulo excessivo de gordura abdominal é um fator de risco para o DM2 e está associado à DLP e um aumento nos níveis séricos de cortisol. Um aumento do cortisol também foi observado em animais alimentados com dietas com altas doses de MSG (COLLISON *et al.*, 2011).

O peso corporal dos roedores MSG é menor, uma vez que a regulação da liberação do hormônio do crescimento nestes roedores é deficiente devido à perda relativa do fator liberador do hormônio do crescimento, embora a gordura armazenada como o Índice de Lee (IL) é muito grande, o que é uma característica incomum devido à falta de hormônio de crescimento neste modelo experimental (HERMANUSSEN *et al.*, 2006). A administração de MSG em roedores recém-nascidos resulta em danos no ARQ e na eminência mediana do hipotálamo, diminuindo a liberação do hormônio liberador do hormônio do crescimento, que prejudica a secreção do hormônio do crescimento pelos somatossomos da hipófise anterior (GASPAR *et al.*, 2016).

O modelo MSG também está relacionado a danos renais, sendo que dados publicados em estudos indicam que a fibrose renal está associada ao consumo crônico de MSG e o estresse oxidativo é a principal causa de lesão renal (SHARMA *et al.*, 2014).

A presença de receptores glutamatérgicos (Glu-Rs) foi demonstrada no rim (CONTINI *et al.*, 2017). Os receptores NMDA são amino tetraméricos receptores de ácido que atuam como canais de cálcio da membrana. O receptor é delimitado

pela ligação do L-glutamato e seu cofator L-glicina, permitindo que o cálcio entre na célula. O receptor foi bem descrito no sistema nervoso, onde a entrada de cálcio produz ativação de NO e produção de NO. Recentemente, a presença de NMDA foi demonstrada no rim (LEUNG *et al.*, 2002), onde exerce efeito tônico vasodilatador na fluência do glomérulo e efeito pró-reabsorvente no túbulo proximal (DENG; THOMSON, 2009).

A administração crônica de MSG em ratos produz hiperfiltração com aumento da reabsorção tubular renal de Na⁺, potássio e água, que com o tempo pode causar alteração de íons, tendo efeitos em nível renal e sistêmico, tal como insuficiência renal e HAS (MAHIEU *et al.*, 2016). Também se observa alterações nos sistemas antioxidantes e marcadores renais, incluindo subprodutos de peroxidação lipídica. Além disso, o MSG dietético aumenta o pH urinário em ratos e a urina alcalina pode influenciar a capacidade renal de secretar ou reabsorver metabólitos que contribuem para a formação de cálculos, como no caso dos produtos com fosfato de cálcio, com subsequente hidronefrose e fibrose intersticial (SHARMA *et al.*, 2013).

Em relação a alterações histopatológicas renais em ratos modelo MSG, observam-se alteração de glomérulos e prejuízo túbulo-intersticial. Os glomérulos apresentam diferentes estágios de degeneração, aumento do número de células mesangiais e fibrose na cápsula de Bowman. No córtex, há atrofia focal ou dilatação dos túbulos com perda da borda em escova, deslocamento de núcleos para o lúmen tubular e descamação celular. Muitas vezes, os túbulos dilatados apresentam cilindros de proteínas intratubulares. Fibrose de tecido intersticial pode ser observada entre os túbulos danificados com leve acúmulo de células mononucleares. A retenção de Na⁺ que leva à HAS foi acompanhada por alterações patológicas, estresse oxidativo intrarrenal e redução da excreção de NO (CONTINI *et al.*, 2017).

Portanto, identifica-se a necessidade de mais estudos que busquem compreender os efeitos do modelo MSG, no que fiz respeito às alterações renais, para dessa forma criar estratégias tanto de prevenção quanto de tratamento que visem minimizar os possíveis danos a este órgão.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da suplementação crônica com VD associada à natação regular sobre aspectos estruturais e histomorfométricos renais em ratos obesos-MSG.

2.2 Específicos

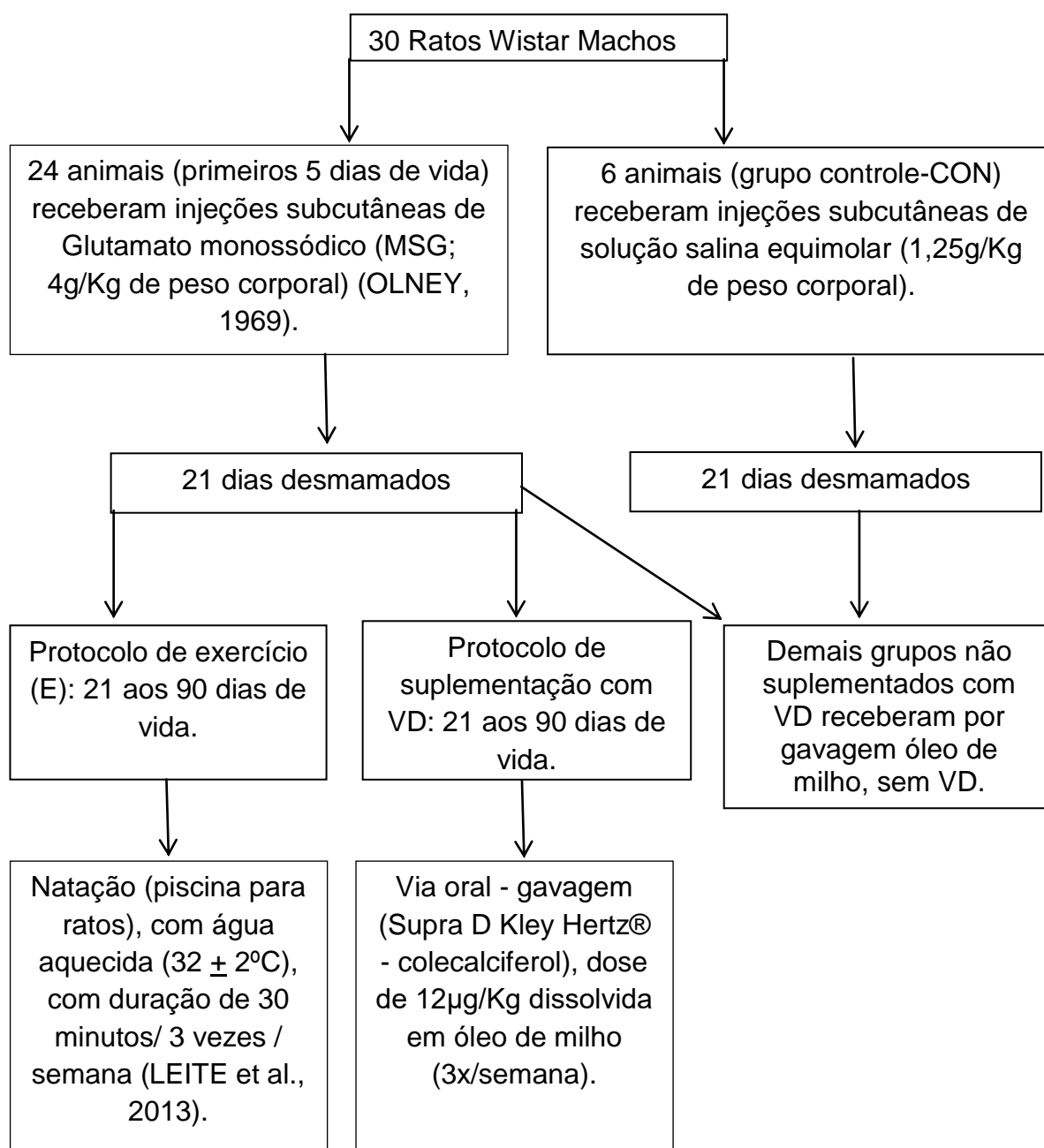
- Verificar a influencia da suplementação com VD e do exercício físico sobre os parâmetros corporais de ratos obesos.
- Verificar através da histomorfometria se a suplementação com VD associada com o exercício físico interfere na estrutura renal de ratos obesos.
- Verificar se a suplementação com VD e o exercício físico podem interferir na degeneração tubular renal de ratos obesos.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UNIOESTE (em anexo). Os animais foram adaptados e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR, em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sendo acomodados individualmente ou em duplas, sob condições controlada de temperatura (22^o e 25^oC), umidade relativa próxima de 55% e luminosidade-fotoperíodo (7:00~19:00h). Todos os animais receberam água e ração (BIOBASE, SC, Brasil), contendo 1,1% de cálcio; 0,8% fósforo e 4UI/g de vitamina D) para roedores, *ad libitum*, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN, 1993).

Para o procedimento experimental, utilizaram-se trinta ratos Wistar machos, sendo que destes, vinte e quatro receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de Glutamato monossódico (MSG; 4g/Kg de peso corporal) para o desenvolvimento da obesidade (OLNEY, 1969), e seis ratos (CON) receberam injeções subcutâneas de solução salina equimolar (1,25g/Kg de peso corporal). Aos 21 dias de vida, os animais MSG-tratados foram desmamados e subdivididos em novos grupos experimentais, conforme protocolos de exercício (E) e suplementação com VD descritos a seguir (Figura 1).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 1 – Esquema demonstrando a indução da obesidade e protocolos de exercício e de suplementação com VD.

3.2 Treinamento Físico

Para os grupos exercitados (E) o treinamento de natação iniciou aos 21 dias de vida e persistiu até os 90 dias. O protocolo de natação foi similar ao estabelecido por Leite *et al.* (2013) e realizado em ambiente com água aquecida

($32 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com duração de 30 minutos/3x/semana. Para evitar acomodação, um peso equivalente a 5% do peso corporal foi preso à cauda do animal. Todas as sessões tiveram início às 17:00 horas e ao final, os animais foram secos e devolvidos ao biotério. Animais sedentários (S) não foram submetidos a nenhum tipo de treinamento físico durante o experimento.

3.3 Suplementação com VD

Os roedores submetidos à suplementação com VD (Supra D Kley Hertz®, 1 gota = 200 UI de colecalciferol) receberam por gavagem $12\mu\text{g}/\text{Kg}$ de VD dissolvida em óleo de milho (AL-RASHEED *et al.*, 2015). A suplementação com VD foi administrada dos 21 aos 90 dias de vida, ocorrendo 3x/semana sempre entre 8:00-10:00 da manhã. Todos os demais grupos não suplementados com VD receberam por gavagem apenas óleo de milho, sem VD, na mesma frequência e horário que os demais grupos.

3.4 Delineamento experimental

Considerando a indução de obesidade com MSG, a natação e a suplementação com VD, foram organizados 5 grupos experimentais ($n=6/\text{grupo}$), conforme segue: Controle-Sedentário não suplementado (CON); MSG-Sedentário não suplementado (MSG); MSG-Sedentário + Vitamina D (MSG-S_{VD}); MSG-Exercitado não suplementado (MSG-E_{NS}); MSG-Exercitado + Vitamina D (MSG-E_{VD}).

3.5 Eutanásia, peso de órgãos e adiposidade

Aos 90 dias de vida os animais foram pesados (g) e realizou-se eutanásia por decapitação em guilhotina. Os animais foram submetidos à laparotomia para remoção dos órgãos e tecidos, que foram pesados em balança digital e registrado em gramas/gramas (g/g) de peso corporal.

Para avaliar o desenvolvimento da obesidade no grupo MSG foi mensurado o peso do depósito de gordura da cavidade abdominal (retroperitoneal) e realizado o cálculo do Índice de Lee (IL) em todos os animais pelo cálculo do IL

(fórmula: [raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm)] (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

3.6 Análise morfológica e morfométrica do rim

O rim direito foi fixado em álcool, formol e ácido acético por 24 horas, lavado em água corrente e estocado em álcool 70°. Posteriormente foi processado com metodologia adequada para microscopia de luz, com inclusão em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich). Para as análises morfológicas, foram realizados cortes semi-seriados com 5µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de aço descartável. Os cortes obtidos foram desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE) para análise.

Para análise morfométrica foi utilizada uma secção histológica renal e desprezadas outras três subsequentes ao longo do órgão, totalizando uma média de 10 secções/animal. Foram selecionados, aleatoriamente, 50 glomérulos por rim e mensurados: diâmetro do tufo glomerular, área do tufo glomerular, áreas da cápsula e do espaço de Bowman (Figura 2). Para mensuração da espessura do córtex renal foram realizadas 5 medidas/secção (Figura 3). Para saber a área do espaço de Bowman, foi feito o cálculo da área da cápsula subtraindo a área do tufo glomerular (DANILEWICZ et al., 1998; DIXIT et al., 2014). Todos os cortes foram analisados por meio de microscópio Olympus BX61. As imagens de glomérulo renal foram observadas com aumento de 400X e as imagens do córtex renal com aumento de 40X. As imagens foram registradas utilizando câmera digital Olympus DP71 com o software DP Controller 3.2.1.276 e analisadas pelo programa Image Pro-Plus 4.1. Os resultados foram expressos em µm.

Para a análise da degeneração tubular da medula renal foram analisados 3 campos aleatórios/secção e 10 secções/animal. As imagens foram observadas por meio de microscópio Olympus BX61 com aumento de 100X. A degeneração tubular foi mensurada em porcentagem de área afetada.

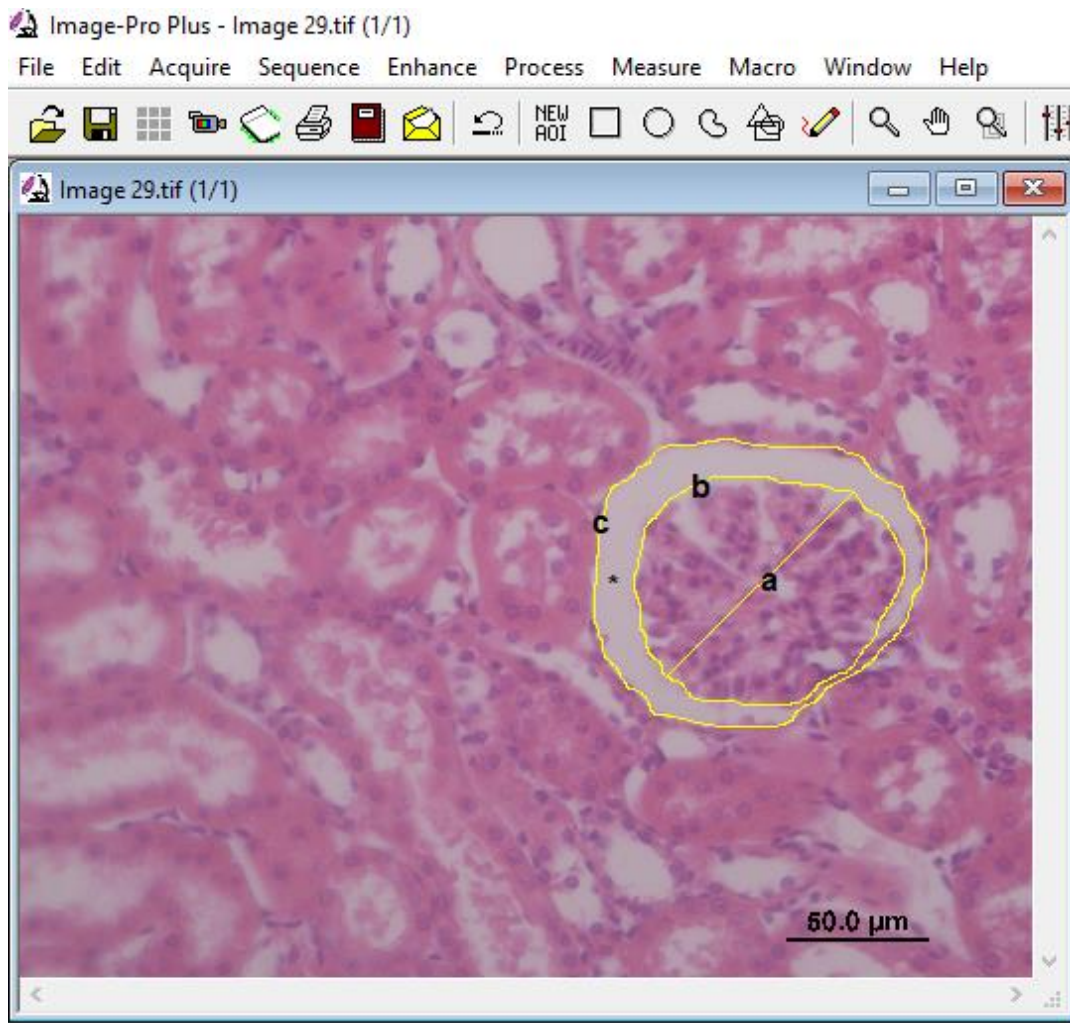


Figura 2 – Fotomicrografia representativa do grupo CON mostrando a medida de diâmetro do tufo glomerular (a), área do tufo glomerular (b), área da cápsula de Bowman (c) e espaço de Bowman (*).



Figura 3 – Fotomicrografia representativa do grupo CON mostrando a medida da espessura do córtex renal (d).

3.7 Análise Estatística

Os dados são apresentados como estatística descritiva e apresentados como médias \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste t não pareado foi utilizado, quando apropriado, para comparar as variáveis numéricas entre o grupo controle e o grupo MSG. A comparação entre os grupos MSG foram analisadas utilizando ANOVA *Two-way*, com pós-teste de Tuckey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. REFERÊNCIAS

ABESO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. 4. ed. São Paulo, SP, 2016. 188 p.

AGRAWAL, V. *et al.* Impact of treating the metabolic syndrome on chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 9, p. 520-528, set. 2009.

AL-RASHEED, N. M. *et al.* Vitamin D attenuates pro-inflammatory TNF- α cytokine expression by inhibiting NF- κ B/p65 signaling in hypertrophied rat hearts. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 289-299, jun. 2015.

AMARAL, L. S. *et al.* Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 4, p. 437-45, fev. 2016.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (AIN), AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76-A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, nov. 1993.

BARZILAY, J. *et al.* The relationship of cardiovascular risk factors to microalbuminuria in older adults with or without diabetes mellitus or hypertension: The cardiovascular health study. **American Journal of Kidney Disease**, v. 44, n. 1, p. 25-34, jul. 2004.

BERNARDIS, L. L., PATTERSON, B. D. Correlation between `Lee index` and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 1-16, abr. 1968.

BORGES, J. L. C. et al. Obesity, Bariatric Surgery, and Vitamin D. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 21, n. 2, p. 157-162, abr-jun. 2018.

BRATOEVA, K. *et al.* Manifestations of renal impairment in fructose-induced metabolic syndrome. **Cureus**, v. 9, n. 11, p. 1-10, nov. 2017.

BROOKS, G. C.; BLAHA, M. J.; BLUMENTHAL, R. S. Relation of C-reactive protein to abdominal adiposity. **The American Journal of Cardiology**, v. 106, n. 1, p. 56-61, jul. 2010.

CACCAMO, D. et al. Health risks of hypovitaminosis D: a review of new molecular insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 1-18, mar. 2018.

CARDINAL, B. J. *et al.* If exercise is medicine, where is exercise in medicine? Review of U.S. medical education curricula for physical activity-related content. **Journal of Physical Activity Health**, v. 12, n. 9, p. 1336-1346, set. 2015.

CARRELLI, A. *et al.* Vitamin D storage in adipose tissue of obese and normal weight women. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 32, n. 2, p. 237 – 242, fev. 2017.

CHAGNAC, A. *et al.* Glomerular hemodynamics in severe obesity. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 278, p. F817–F822, maio. 2000.

CHAGNAC, A. *et al.* The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 14, p. 1480–1486, jun. 2003.

CHAKHTOURA, M.; RAHME, M.; EL-HAJJ FULEIHAN, G. Vitamin D metabolism in bariatric surgery. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 46, n. 4, p. 947-982, dez. 2017.

CHEN, Y. C. *et al.* Visceral adiposity index as a predictor of chronic kidney disease in a relatively healthy population in Taiwan. **Journal of Renal Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 91-100, mar. 2018.

COELHO, B. L. *et al.* Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20, p.169–175, maio. 2010.

COLLISON, K. S. *et al.* Effect of trans-fat, fructose and monosodium glutamate feeding on feline weight gain, adiposity, insulin sensitivity, adipokine and lipid profile. **The British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 2, p. 218-226, jul. 2011.

COMINATO, L. *et al.* Obesity prevention: strategies and challenges in Latin America. **Current Obesity Reports**, v. 7, n. 2 p. 97-104, jun. 2018.

CONTINI, M. D. C. *et al.* Adverse effects in kidney function, antioxidant systems and histopathology in rats receiving monosodium glutamate diet. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 69, n. 7, p. 547-556, set. 2017.

CUNHA, N. V. *et al.* Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sciences**, v. 87, n. 1, p.375-381, set. 2010.

DAI, H. *et al.* Combined association of serum uric acid and metabolic syndrome with chronic kidney disease in hypertensive patients. **Kidney & Blood Pressure Research**, v. 41, n. 4, p. 413-23, jun. 2016.

DANILEWICZ, M.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, M. Diffuse idiopathic mesangial proliferative glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. **Medical Science Monitor**, v. 4, n. 6, p. CR955-959. 1998.

DAVIES, J. S.; POOLE, C. D.; FELDSCHREIBER, P. The medico-legal aspects of prescribing vitamin D. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, p. 1257–1263, dez. 2014.

DENG, A.; THOMSON, S, C. Renal NMDA receptors independently stimulate proximal reabsorption and glomerular filtration. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 296, n. 5, p. F976-F982, maio. 2009.

DE SOUZA, P. S. *et al.* Therapeutic action of physical exercise on markers of oxidative stress induced by chronic kidney disease. **Life Sciences**, v. 91, n. 3-4, p. 132-136, ago. 2012.

DESPRÉS, J. P. *et al.* Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28, n. 6, p.1039-1049, jun. 2008.

DIDRIKSEN, A. *et al.* Vitamin D3 increases in abdominal subcutaneous fat tissue after supplementation with vitamin D3. **European Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 3, p. 235 – 241, mar. 2015.

DI NISIO, A. *et al.* Impaired release of vitamin D in dysfunctional adipose tissue: new cues on vitamin D supplementation in obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 1, p. 2564-2574, jul. 2017.

DIX, C. F.; BARCLEY, J. L.; WRIGHT, O. R. The role of vitamin D in adipogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 1, p. 47–59, jan. 2018.

DIXIT, S. G. *et al.* To study the effect of monosodium glutamate on histomorphometry of cortex of kidney in adult albino rats. **Renal Failure**, v. 36, n. 2, p. 266–270, mar. 2014.

DOJKI, F. K.; BAKRIS, G. L. Blood pressure control and cardiovascular/renal outcomes. **Endocrinology and Metabolism Clinica of North America**, v. 47, n.1, p. 175-184, mar. 2018.

EDDY, A. A. Progression in chronic kidney disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12, n. 4, p. 353-65, out. 2005.

FRANCISCO, V. *et al.* Adipokines and inflammation: is it a question of weight? **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 10, p. 1569-1579, maio. 2018.

GARTNER, L.; HAIATT, J. L. Sistema urinário. In:_____.**Tratado de Histologia em Cores**. 2. ed . São Paulo: Guanabara Koogan , 1999, p. 337-357.

GARG, J. P.; BAKRIS, G. L. Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease. **Vascular Medicine**, v. 7, n. 1, p. 35-43, fev. 2002.

GASPAR, R. C. *et al.* High dosage of vitamin D regulates the energy metabolism and increases insulin sensitivity, but are associated with high levels of kidney damage. **Drug Development Research**, v. 78, n. 5, p. 203-209, ago. 2017.

GASPAR, R. S. *et al.* Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. **The Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 2, p.61-72, maio. 2016.

GELEIJNSE, J. M. Vitamin D and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases: a review of the current evidence. **American Journal of Hypertension**, v. 24, n. 3, p. 253-262, mar. 2011.

GRASSI, G. Sympathetic Overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. **Hypertension Research**, v. 29, n. 11, p. 839–847, nov. 2006.

GRASSIOLLI, S. *et al.* Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K⁺ATP channel-dependent but not -independent pathways on glucose-induced insulin release process. **Endocrine**, v. 30, n.2, p. 191-196. 2006.

GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. p. 505-528, dez. 2006.

HALL, J. E. *et al.* Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. **Circulation Research**, v. 116, n. 6, p. 991-1006, mar. 2015.

HALL, M. E. *et al.* Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 75–88, fev. 2014.

HALLAN, S.; SHARMA, K. The Role of Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 7, p. 61, jul. 2016.

HAMDY, O.; PORRAMATIKUL, S.; AL-OZAIRI, E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. **Current Diabetes Reviews**, v. 2, n. 4, p. 367–373, nov. 2006.

HAO, J. *et al.* High-fat diet causes increased serum insulin and glucose which synergistically lead to renal tubular lipid deposition and extracellular matrix accumulation. **The British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 1, p. 74-85, jan. 2012.

HAYS, N. P.; GALASSETTI, P. R.; COKER, R. H. Prevention and treatment of type 2 diabetes: current role of lifestyle, natural product, and pharmacological interventions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 2, p. 181-191, maio. 2008.

HEANEY, R. P. *et al.* Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. **The Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 96, n. 3, p. E447–E452, mar. 2011.

HERMANUSSEN, M. *et al.* Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 25–31, jan. 2006.

HERNÁNDEZ-BAUTISTA, R. J. *et al.* Biochemical alterations during the obese-aging process in female and male monosodium glutamate (MSG)-treated mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n.7, p. 11473-11494, jul. 2014.

HIRATA, A. E. *et al.* Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 5, p. 671–674, maio.1997.

HOLICK, M. F. *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, jul. 2011.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266–281, jul. 2007.

HOSEINI, R.; DAMIRCHI, A.; BABAEI, P. Vitamin D increases PPAR γ expression and promotes beneficial effects of physical activity in metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 36, p. 54-59, abr. 2017.

IDF - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome**. 2006. Disponível em: <<https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome.html>>. Acesso em: 12 de mar. 2018.

JAMES, M. T.; HEMMELGARN, B. R.; TONELLI, M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. **Lancet**, v. 375, n. 9722, p. 1296-1309, abr. 2010.

JONES, A. *et al.* Adipose and height growth through childhood and blood pressure status in a large prospective cohort study. **Hypertension**, v. 59, n. 5, p. 919–925, maio. 2012.

JOYCE, T. *et al.* Renal damage in the metabolic syndrome (MetSx): Disorders implicated. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 554–568, jan. 2018.

KARLEN-AMARANTE, M. *et al.* Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 61, n. 10, p. 1435–1442, out. 2012.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology Research and Practice**, p. 1-21, mar.2014. Disponível em: <<http://https://www.hindawi.com/journals/crp/2014/943162/>>. Acesso em: 19 maio. 2018.

KINASHI, H. *et al.* Connective tissue growth factor regulates fibrosis-associated renal lymphangiogenesis. **Kidney International**, v. 92, n. 4, p. 850-863, out. 2017.

KYROU, I.; TSIGOS, C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. **Hormones**, v.7, n.4, p. 287-293, 2008.

KOHNO, D. *et al.* Sweet Taste Receptor Serves to Activate Glucose- and Leptin-Responsive Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus and Participates in Glucose Responsiveness. **Frontier in Neurosciense**, v. 10, n. 502, p. 1-11, nov. 2016.

KURDAK, H. *et al.* The effects of regular aerobic exercise on renal functions in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 294–299, jun. 2010.

LEE, S. *et al.* Exercise without weight loss is an effective strategy for obesity reduction in obese individuals with and without Type 2 diabetes. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n.3, p. 1220-1225, set. 2005.

LEGARTH, C. *et al.* The Impact of Vitamin D in the Treatment of Essential Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1-14, fev. 2018.

LEITE, N.C. *et al.* Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Pancreatic Islets from MSG-Treated Obese Rats Subjected to Swimming Training. **Cell Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 2-3, p. 242-256. fev. 2013.

LEUNG, J. C. *et al.* Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. **American Journal Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, p. R964–R971, jun. 2002.

LI, Y. C. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 2, p. 229-328, jul. 2002.

LI, Y. C. Vitamin D in chronic kidney disease. **Contributions to Nephrology**, v. 180, p. 98-109, maio. 2013.

LOBATO, N. S. *et al.* Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: Role of NO and prostanoids. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 10, p. 808–816, out. 2011.

LOPES, H. F. *et al.* Visceral adiposity syndrome. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 8, n. 40, p. 1-8, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4950710/pdf/13098_2016_Article_156.pdf>. Acesso em: 19 maio. 2018.

LUCISANO, S. *et al.* New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage. **Kidney Blood Pressure Research**, v.37, n.6, p. 667-678, 2013.

MACHO, M. *et al.* Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiological Research**, v. 49, suppl. 1, p. S79–S85, 2000.

MAHIEU, S. *et al.* Monosodium glutamate intake affect the function of the kidney through NMDA receptor. **Life Sciences**, v. 149, p. 114-11915, mar. 2016.

MANUCHA, W.; JUNCOS, L. I. The protective role of vitamin D on the heart and the kidney. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 11, n.1, p. 12 –19, jan. 2017.

MARTIN, J. M. *et al.* Maternal diet supplementation with n-6/n-3 essential fatty acids in a 1.2 : 1.0 ratio attenuates metabolic dysfunction in MSG-induced obese Mice. **International Journal of Endocrinology**, p.1-10, 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ije/2016/9242319/>>. Acesso em: 19 maio. 2018.

MATTOS, A. M. da. S. *et al.* Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats. **Neuroscience Letters**, v. 522, n. 2, p. 118– 122, ago. 2012.

MCCULLOUGH, A. J. Epidemiology of the metabolic syndrome in the USA. **Journal of Digestive Diseases**, v.12, n. 5, p. 333-340, out. 2011.

MORSELLI, L. L. *et al.* Control of Energy Expenditure by AgRP Neurons of the Arcuate Nucleus: Neurocircuitry, Signaling Pathways, and Angiotensin. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 3, p.1-8, mar. 2018.

NATIONAL OSTEOPOROSIS SOCIETY. **Vitamin D and bone health: a practical clinical guideline for patient management [online]**. 2013. Disponível em: <<https://nos.org.uk/media/2073/vitamin-d-and-bonehealth-adults.pdf>>. Acesso em: 10 maio. 2018.

NAVARRO, G.; ARDILES, L. Obesidad y enfermedad renal crónica: Una peligrosa asociación. **Revista Médica do Chile**, v.143, n.1, p.77-84, jan. 2015.

NG, M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, ago. 2014.

NIJM, J.; JONASSON, L. Inflammation and cortisol response in coronary artery disease. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 3, p. 224-233, 2009.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, p. 719-721, 1969.

OPARIL, S. *et al.* Hypertension. **Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 18014, mar. 2018.

PALEY, C. A.; JOHNSON, M, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome: exercise as medicine? **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, v. 10, n. 7, p. 1-8, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5935926/pdf/13102_2018_Article_97.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2018.

PECHTER, U. *et al.* Beneficial effects of water-based exercise in patients with chronic kidney disease. **International Journal Rehabilitation Research**, v. 26, n. 2, p. 153-156, jun. 2003.

PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and metaanalysis. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 4, p. 341–349, abr. 2015.

PEETERS, A. *et al.* Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. **Annal of Internal Medicine**, v. 138, n. 1, p. 24–32, jan. 2003.

PIKE, J. W.; CHRISTAKOS, S. Biology and mechanisms of action of the vitamin D hormone. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 46, n. 4, p. 815-843, dez. 2017.

PINTÉROVÁ, L. *et al.* Elevated AT1 receptor protein but lower angiotensin II-binding in adipose tissue of rats with monosodium glutamate-induced obesity. **Hormone and Metabolic Research**, v. 33, n. 12, p. 708–712, dez. 2001.

PRABHAKAR, S. S. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 24, n. 4, p. 333-44, jul. 2004.

QUESADA-GOMEZ, J. M.; BOUILLON, R. Is calcifediol better than cholecalciferol for vitamin D supplementation? **Osteoporosis International**, p. 1-15, abr. 2018.

RAHMOUNI, K. *et al.* Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. **Hypertension**, v. 45, n. 1, p. 9–14, jan. 2005.

RAZZAQUE, M. S. Can adverse effects of excessive vitamin D supplementation occur without developing hypervitaminosis D? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, S0960-0760m, n. 17, 30171-1, jul. 2017.

REBOUL, E. *et al.* Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 5, p. 691–702, maio. 2011.

ROSSING, K. *et al.* Remission of nephrotic-range albuminuria reduces risk of end-stage renal disease and improves survival in type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 48, n.11, p. 2241-2247, nov. 2005.

ROUTH, V. H. *et al.* Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. **Frontier in Systems Neurosciense**, v. 8, n. 236, p. 1-13, dez. 2014.

SANTORO, D. *et al.* Vitamin D receptor polymorphism in chronic kidney disease patients with complicated cardiovascular disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 187-93, mar. 2015.

SCHUSTER, I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. **Biochim Biophys Acta**, v.1814, n. 1, p. 186–199, jan. 2011.

SCIENTIFIC ADVISORY COMMITTEE ON NUTRITION. **Vitamin D and health**. London, 2016. Disponível em: <<https://www.gov.uk/government/groups/scientific-advisory-committee-on-nutrition>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

SCRAGG, R.; SOWERS, M.; BELL, C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **American Journal of Hypertension**, v. 20, n. 7, p. 713–719, jul. 2007.

SHAMARDL, H. A. *et al.* Potential cardiovascular and renal protective effects of Vitamin D and coenzyme Q₁₀ in L-NAME-Induced hypertensive rats. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 354, n. 2, p. 190-198, ago. 2017.

SHARMA, A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 93, p.1-6. 2015. Disponível em:<<https://jbiomedsci.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12929-015-0192-5>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

SHARMA, A. *et al.* Monosodium glutamate (MSG) consumption is associated with urolithiasis and urinary tract obstruction in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-9, set. 2013.

SHARMA, A. *et al.* Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to monosodium glutamate. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. 1-11, dez. 2014.

SKAABY, T.; THUESEN, B. H.; LINNEBERG, A. Vitamin D, Cardiovascular Disease and Risk Factors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 221-230. 2017.

SMITH, A. C.; BURTON, J. O. Exercise in kidney disease and diabetes: time for action. **Journal of Renal Care**, v. 38, suppl. 1, p. 52-58, fev. 2012.

STEHOUWER, C. D. et al. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: Progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1157-1165, abr. 2002.

SWISHER, A. K. Yes, "Exercise is Medicine"....but It Is So Much More!. **Cardiopulmonary Physical Therapy Journal**, v. 21, n. 4, p. 4, dez. 2010.

TADA, A.; MIURA, H. Association of mastication and factors affecting masticatory function with obesity in adults: a systematic review. **BMC Oral Health**, v. 18, n.1, p. 76, maio. 2018.

TAIN, Y. L.; HSU, C. N. Developmental Origins of Chronic Kidney Disease: Should We Focus on Early Life? **International of Journal Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1-16, fev. 2017.

TAYLOR, P. N.; DAVIES, J. S. A review of the growing risk of vitamin D toxicity from inappropriate practice. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 6, p. 1121-1127, jun. 2018.

TOBAR, A. *et al.* Proximal tubular hypertrophy and enlarged glomerular and proximal tubular urinary space in obese subjects with proteinuria. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-9, set. 2013.

TSUBOI, N. *et al.* The renal pathology of obesity. **Kidney International Report**, v.2, n. 2, p.251-260, mar. 2017.

VIANNA, H. R. *et al.* Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 3, p. 351-364, jul-set. 2011.

WALSH, J. S.; BOWLES, S.; EVANS, A. L. Vitamin D in obesity. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 24, n. 6, p. 389-394, dez. 2017.

WAMBERG, L. *et al.* Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue: the effect of obesity and diet -induced weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 5, p. 651 – 657, maio. 2013.

WANG, X.; GARRETT, M. R. Nephron number, hypertension, and CKD: physiological and genetic insight from humans and animal models. **Physiological Genomics**, v. 49, n. 3, p. 180–192, mar. 2017

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 523, n. 1, p.123–133. 2012.

WISSE, B. E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 11, p. 2792–2800, nov. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Fact sheet Updated. 2016. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

WU, Y. *et al.* Obesity-related glomerulopathy: insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 44–50, jan. 2006.

XI, G. *et al.* Down-regulation of insulin receptor substrate 1 during hyperglycemia induces vascular smooth muscle cell dedifferentiation. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 292, n. 5, p. 2009-2010, fev. 2017.

YAMASHITA, C. *et al.* Exaggerated renal pathology of partial ablation-induced chronic renal failure in eNOS deficient mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 1029–1031, maio. 2008.

ZAMMIT, A. R. *et al.* Abdominal obesity is a risk factor for dysexecutive function in chronic kidney disease. **Preventive Medicine Reports**, v. 4, p. 128-133, dez. 2016.

ZORAD, S. *et al.* Low number of insulin receptors but high receptor protein content in adipose tissue of rats with monosodium glutamate-induced obesity. **General Physiology and Biophysics**, v. 22, n. 4, p. 557–560, dez. 2003.

Os resultados foram organizados no formato de artigo e submetido ao periódico *Journal of Anatomy* (em anexo).

5. O exercício físico e a suplementação crônica com vitamina D elevam a espessura cortical renal e diminuem a degeneração tubular renal induzida pelo glutamato monossódico em ratos

Physical exercise and chronic supplementation with vitamin D increase the renal cortical thickness and decrease the renal tubular degeneration induced by monosodium glutamate in rats

Késia Zanuzo^{1*}, Anna Caroliny Detogni³, Ediana Amanda Piana³, Luiz Pierre Huning², Patrick Fontes Rodrigues², Zoé Maria Guareschi³, Sabrina Grassioli³, João Paulo de Arruda Amorim³

¹ Postgraduate Program in Applied Health Sciences, State University of Western Parana (UNIOESTE), Francisco Beltrão-PR, Brazil.

² Graduation in Medicine, State University of Western Parana (UNIOESTE), Cascavel-PR, Brazil.

³ Postgraduate Program in Biosciences and Health, State University of Western Parana (UNIOESTE), Cascavel-PR, Brazil.

*State University of Western Parana (UNIOESTE), Health Sciences Center, Block III, 1º Floor, Street Maringá, 1200 Highway PR-182 Km 02 - Água Branca Neighborhood, Francisco Beltrão/PR, Brazil. Zip code: 85601-970

Phone: + 55 46 3520-0718.

E-mail address: kesiazauzo@gmail.com

Resumo

A administração neonatal de glutamato monossódico (MSG) em roedores induz obesidade associada a alterações histopatológicas renais. A vitamina D (VD) parece modular a inflamação renal, enquanto o exercício físico melhora a proteinúria e glomeruloesclerose. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação crônica com VD associada à natação regular sobre aspectos histomorfométricos renais em ratos obesos - MSG. Para tal, ratos Wistar machos (n=24) receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de Glutamato monossódico (MSG; 4g/Kg) enquanto ratos Controles (CON;n=6) receberam salina equimolar. Aos 21 dias de vida os ratos MSG-tratados foram randomicamente distribuídos entre animais sedentários (S) e exercitados (E; natação; 3x/semana), os quais foram subdivididos em suplementados oralmente com VD (12µg/Kg; 3x/semana) ou não suplementados (NS) formando 5 grupos experimentais (n=6 ratos/grupo): MSG; MSG-S_{VD}; MSG-E_{NS}; MSG-E_{VD} e o grupo CON. Após os 90 dias de vida realizou-se eutanásia, e a obesidade foi avaliada pelo peso dos depósitos de tecido adiposo branco (TAB) e cálculo do Índice de Lee (IL). O rim direito foi retirado, pesado e submetido a técnicas histológicas para análise histomorfométrica. Dados foram expressos como média±erro padrão com análise de variância Anova Two-way (p<0,05). No presente estudo, os animais do grupo MSG apresentaram menor peso corporal e comprimento naso-anal, porém elevada adiposidade quando comparados com o grupo CON (p<0,05). Marcantes alterações na morfologia renal foram encontradas em ratos do grupo MSG, tais como, menor diâmetro do tufo glomerular, área do tufo glomerular, área da cápsula de Bowman, área do espaço de Bowman e espessura do córtex renal quando comparado aos mesmos parâmetros renais no grupo CON (p<0,05). Assim, o rim de ratos do grupo MSG foi significativamente menor que o grupo CON (p<0,05), além de apresentar intensa degeneração tubular renal. Em animais MSG-E_{VD} o peso do rim foi reduzido em relação em relação ao grupo MSG-E_{NS} (p<0,05). Em animais MSG-S_{VD}; MSG-E_{NS} e MSG-E_{VD} houve aumento da espessura do córtex renal em relação ao grupo MSG (p<0,05). Em animais MSG-E_{NS} e MSG-E_{VD} houve redução da degeneração tubular em relação aos ratos MSG e o grupo MSG-E_{VD} também apresentou redução da degeneração tubular renal em comparação com o grupo MSG-S_{VD} (p<0,05). Em conjunto, nossos dados mostraram que ratos MSG-obesos tiveram intensa degeneração glomerular e tubular, similar aquela observada na progressão da doença renal crônica. O exercício e a VD foram efetivos em elevar a espessura do córtex renal, e quando associados, protegeram da degeneração tubular tendo, portanto, importante papel na prevenção de lesão renal.

Palavras-chave: glutamato monossódico, obesidade, vitamina D, exercício físico, rim.

Introdução

A lesão renal aguda (LRA) é definida como perda abrupta da função renal causada por uma grande variedade de condições clínicas, incluindo doença cardiovascular, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM) e está associada a um alto risco de mortalidade e deterioração progressiva da função renal que pode levar à doença renal crônica (DRC), bem como doença renal terminal (Fortrie et al. 2019).

A maioria das DRC conduz ao estágio final comum de rins pequenos, com a região cortical e o parênquima afilados (indicativos de atrofia) e hiperecogênicos, indicativos de esclerose e fibrose (rins pequenos, densos e ecogênicos), indicando alterações irreversíveis e associadas a um pior prognóstico (Orozco et al. 2004; Kariyanna et al. 2010; Totou et al. 2018). À medida que a fibrose evolui, os epitélios tubulares lesionados perdem sua capacidade regenerativa e sofrem apoptose levando à atrofia tubular e criando glomérulos não funcionais (Webster et al. 2017).

Por sua vez, a obesidade também causa várias alterações estruturais, hemodinâmicas e metabólicas nos rins, sendo que a glomerulopatia relacionada à obesidade (GRO) é o mais conhecido de tais estados de doença (Tsuboi et al. 2017). Características típicas da histopatologia renal para a GRO incluem glomerulomegalia e glomeruloesclerose segmentar focal (GESF) (Chagnac et al. 2000; Chagnac et al. 2003).

Para estudar a doença renal induzida pela obesidade semelhante à fisiopatologia humana, é importante estabelecer modelos animais de obesidade, juntamente com a desregulação da glicose, hiperlipidemia e hipertrigliceridemia (Glastras et al. 2016). Experimentalmente, a obesidade pode ser induzida em roedores pela administração neonatal de glutamato monossódico – o denominado modelo MSG. Este modelo apresenta entre suas características hipercotisolismo, hiperinsulinemia, dislipidemia e aumento da ativação do sistema nervoso autônomo renal (Hermanussen et al. 2006; Collison et al. 2011; Gaspar et al. 2016; Martin et al. 2016). Além disso, apresentam alterações histopatológicas renais como glomérulos com diferentes estágios de degeneração e prejuízo túbulo-intersticial (Contini et al. 2017).

Nesse contexto, como forma de prevenção e/ou tratamento da obesidade, bem como, para as graves patologias que alteram o funcionamento renal, destacam-se os estudos referentes à vitamina D (VD) e ao exercício físico regular (EFR), considerados estratégias alternativas para outras opções terapêuticas, tais como, as farmacológicas e cirúrgicas (Scomparin et al. 2011; Mccracken et al. 2018).

A VD tem demonstrado papel na modulação da inflamação renal, que pode ser atribuída à sua capacidade de suprimir a via NFκB, um fator chave de transcrição que

é pensado para mediar inflamação aguda e crônica e fibrogênese por regulação da expressão gênica de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, incluindo interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Guijarro & Egido, 2001; Kim & Kim, 2014).

Estudos experimentais em modelos animais também descreveram os benefícios do EFR para doenças renais associadas à HAS sendo que exercícios baseados em terra e água induzem respostas diferentes na função renal. Os exercícios de natação produziram resposta diferente na função renal em comparação com os que realizaram corrida, no qual apenas ratos treinados em natação apresentaram melhor perfil para proteinúria e glomeruloesclerose (Totou et al. 2018).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação crônica com VD associada à natação regular sobre a estrutura renal de ratos obesos-MSG.

Materiais e Métodos

Animais

Vinte e quatro ratos machos Wistar receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de Glutamato monossódico (MSG; 4g/Kg de peso corporal) (Olney, 1969). No mesmo período, seis ratos receberam injeções subcutâneas de solução de cloreto de sódio (NaCl) equimolar na dose de 1,25g/Kg de peso corporal formando o grupo Controle (CON). Aos 21 dias de vida os animais MSG-tratados e CON foram desmamados e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR, sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$), umidade relativa próxima de 55% e luminosidade-fotoperíodo (7:00~19:00h). Todos os animais receberam água e ração *ad libitum* (BIOBASE, SC, Brazil) contendo 1,1% de cálcio; 0,8% fósforo e 4UI/g de VD, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN, 1993). Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UNIOESTE. Após o desmame, animais MSG-tratados foram randomicamente distribuídos em subgrupos conforme protocolos de exercício ou suplementação com VD, conforme descritos a seguir.

Treinamento Físico

Para todos os grupos exercitados (E), o treinamento físico de natação iniciou aos 21 dias de vida e persistiu até os 90 dias. O protocolo de natação foi similar ao estabelecido por Leite et al. (2013). A natação foi realizada em piscina para ratos, com água aquecida ($32\pm 2^{\circ}\text{C}$), com duração de 30 minutos/3x/semana. Para evitar acomodação, um peso equivalente a 5% do peso corporal foi preso à cauda do animal. Todas as sessões tiveram início às 17:00 horas. Ao final de cada sessão os animais foram secos e devolvidos ao biotério. Animais sedentários (S) não foram submetidos a nenhum tipo de treinamento físico durante o experimento.

Suplementação com VD

Os roedores submetidos à suplementação com VD (Supra D Kley Hertz®, 1 gota = 200 UI de colecalciferol) receberam por gavagem $12\mu\text{g}/\text{Kg}$ de VD dissolvida em óleo de milho (Al-Rasheed et al. 2015). A suplementação com VD foi administrada dos 21 aos 90 dias de vida, ocorrendo 3x/semana sempre entre 8:00-10:00 horas. Todos os demais grupos não suplementados (NS) receberam por gavagem óleo de milho, sem VD, na mesma frequência e horário que os demais grupos.

Delineamento experimental

Considerando a indução de obesidade com MSG, a natação e a suplementação com VD, foram organizados 5 grupos experimentais ($n=6$ ratos/grupo), conforme segue: Controle-Sedentário não suplementado (CON); MSG-Sedentário não suplementado (MSG); MSG-Sedentário + Vitamina D (MSG- S_{VD}); MSG-Exercitado não suplementado (MSG- E_{NS}); MSG-Exercitado + Vitamina D (MSG- E_{VD}).

Eutanásia, peso de órgãos e adiposidade

Aos 90 dias de vida os animais foram pesados (g), registrado o comprimento naso-anal (CNA, cm) e posteriormente realizada eutanásia por decapitação em guilhotina após breve desensibilização com gás carbônico (CO_2). A obesidade foi avaliada indiretamente pelo cálculo do Índice de Lee (fórmula: [raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm)] descrito por Bernardis & Patterson (1968).

Após a eutanásia, os animais foram submetidos à laparotomia para remoção dos depósitos de gordura visceral (retroperitoneal). O rim direito foi retirado, pesado e transferido para solução fixadora para técnicas histológicas. Todos os depósitos de gordura retroperitoneal, bem como o rim, foram expressos em g/g de peso corporal.

Análise morfológica e morfométrica do rim

O rim direito depois de fixado em álcool, formol e ácido acético, por 24 horas, foi lavado em água corrente e estocado em álcool 70°, e processado com metodologia adequada para microscopia de luz, com inclusão em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich). Para as análises morfológicas, foram realizados cortes semi-seriados com 5µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de aço descartável. Os cortes obtidos foram desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) para análise.

Para análise morfométrica foi utilizada uma secção histológica renal e desprezadas outras três subseqüentes ao longo do órgão, totalizando uma média de dez secções/animal. Foram selecionados, aleatoriamente, 50 glomérulos por rim e mensurados: diâmetro do tufo glomerular, área do tufo glomerular, área da cápsula e do espaço de Bowman. Para saber a área do espaço de Bowman foi feito o cálculo da área da cápsula subtraindo a área do tufo glomerular e para a mensuração da espessura do córtex renal foram realizadas 5 medidas, por secção (Danilewicz et al. 1998; Dixit et al. 2014). Todos os cortes foram observados por meio de microscópio Olympus BX61. As imagens de glomérulo renal foram observadas com aumento de 400X e as imagens do córtex renal com aumento de 40X. As imagens foram registradas utilizando câmera digital Olympus DP71 com o software DP Controller 3.2.1.276 e analisadas pelo programa Image Pro-Plus 4.1. Os resultados foram expressos em µm.

Para a análise da degeneração tubular da medula renal foram analisados 3 campos aleatórios/secção e 10 secções/animal. As imagens foram observadas por meio de microscópio Olympus BX61 com aumento de 100X. A degeneração tubular foi mensurada em porcentagem de área afetada.

Análise Estatística

Os dados são apresentados como médias ± erro padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, San Diego, CA). Todos os dados foram analisados utilizando ANOVA, *Two-way* com pós-teste de

Tuckey. O teste t não pareado foi utilizado, quando apropriado, para comparar os parâmetros entre o grupo controle e o grupo MSG. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Adiposidade, parâmetros biométricos e análise morfológica renal

Aos 90 dias de vida os animais do grupo MSG apresentaram menor peso corporal (25,5%) e CNA (10%) quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,05$); sem diferença estatística no IL. Porém, ratos do grupo MSG apresentaram maior adiposidade, marcada por acentuado aumento no peso do depósito de gordura retroperitoneal (100%) em relação ao grupo CON ($p < 0,05$; Tabela 1).

Os animais do grupo controle apresentaram estrutura renal preservada, onde a região cortical apresenta-se mais escura e granular, enquanto a medula apresenta regiões estriadas e pálidas (Fig. 1c). No córtex podemos observar grânulos vermelhos semelhantes a pontos, os corpúsculos renais. Nos corpúsculos renais estão localizados os glomérulos que são tufo de capilares glomerulares (Fig. 1c). No corpúsculo renal dos animais do grupo controle, observamos o glomérulo que está invaginado dentro da cápsula de Bowman, o pólo vascular e o pólo urinário, que é a região de continuação entre o corpúsculo renal e o túbulo proximal, o qual drena o espaço de Bowman. Nesta região de junção, o epitélio simples pavimentoso da camada parietal da cápsula de Bowman se junta com o epitélio cúbico simples do túbulo. Os rins dos animais do grupo controle mostraram os corpúsculos renais circundados por túbulos renais (Fig. 1a).

No presente estudo, o tratamento com MSG modificou a morfologia renal. Observamos no rim de animais do grupo MSG menor diâmetro do tufo glomerular (8%), área do tufo glomerular (21%), área da cápsula de Bowman (28%), área do espaço de Bowman (37%) e espessura do córtex renal (16%) quando comparado aos mesmos parâmetros renais no grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 1f-j). O peso do rim também foi menor (19,5%) no grupo MSG em comparação ao grupo CON ($p < 0,05$; Fig. 1e). O grupo MSG também apresentou degeneração tubular renal (Fig. 3a).

A suplementação com VD e a natação regular promoveram mudanças nos parâmetros biométricos avaliados nos animais obesos-MSG. Houve diferença estatística na prática de exercício físico de forma isolada ($F = 10,67$; $p = 0,0021$) sobre o depósito de gordura retroperitoneal, assim, foi observado que o grupo MSG-ENS apresentou média inferior de 37,5% de depósito de gordura retroperitoneal na comparação com o grupo MSG ($p < 0,05$). Quando se avaliou a interação entre o

exercício físico e a suplementação com VD foram observadas diferenças significativas na ação isolada da suplementação com VD ($F= 4,336$; $p 0,0428$) sobre o peso corporal, de modo que o grupo MSG-E_{VD} apresentou média 9% inferior de peso corporal na comparação com o grupo MSG, porém sem diferença significativa quando realizado o pós-teste. Também observou-se diferenças significativas quando se avaliou a interação entre VD e exercício físico ($F=11,41$; $p 0,0015$), sendo que o grupo MSG-E_{VD} apresentou redução (12,5%) de depósito de gordura retroperitoneal, quando comparado com o grupo MSG, porém sem diferença estatística quando realizado o pós-teste (Tabela 2).

Após os 90 dias de vida, a suplementação com VD e a natação regular promoveram mudanças nos parâmetros histomorfométricos renais avaliados nos animais obesos-MSG. Houve diferença estatística quando avaliada a suplementação com VD de forma isolada ($F=4,241$; $p 0,0455$) e também na interação entre o exercício físico com a suplementação com VD ($F= 5,156$; $p 0,0282$) sobre o peso do rim, assim, foi observado que o grupo MSG-E_{VD} apresentou média inferior de 25,55% de peso do rim na comparação com o grupo MSG-E_{NS} ($p<0,05$; Fig. 2e). Foram observadas diferenças significativas na ação isolada tanto da suplementação com VD ($F= 6,351$; $p 0,0156$) quanto do exercício físico ($F= 45,99$; $p <0,001$) sobre o percentual de degeneração tubular, de modo que o grupo MSG-E_{NS} e o grupo MSG-E_{VD} apresentaram percentual inferior de 30,33% e de 47,10%, respectivamente, de degeneração tubular renal na comparação com o grupo MSG. O grupo MSG-E_{VD} também apresentou redução de 43,25% de degeneração tubular renal em comparação com o grupo MSG-S_{VD} ($p<0,05$; Fig. 3e). Houve diferença estatística na espessura do córtex renal, tanto na suplementação com VD e no exercício físico de forma isolada ($F= 5,459$; $p 0,0306$ e $F= 12,57$; $p 0,0022$, respectivamente) quanto na interação entre ambos ($F= 5,459$; $p 0,0360$), assim, observou-se que o grupo MSGS_{VD}, MSG-E_{NS} e o grupo MSG-E_{VD} apresentaram maiores médias de 18,73%; 21,50% e 27,11%, respectivamente, na comparação com o grupo MSG ($p<0,05$; Fig. 2j).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as médias dos outros parâmetros avaliados (diâmetro do tufo glomerular, áreas do tufo, da cápsula de Bowman e do espaço de Bowman), a Fig. 2 a-d, demonstra que o grupo MSG-E_{VD} aparenta ter sofrido menos danos de atrofia renal, apresentando maiores médias, quando comparado com os grupos MSG-S_{VD} e MSG-E_{NS}.

Discussão

Em nosso estudo, os animais do grupo MSG, com 90 dias de vida, apresentaram menor peso corporal e CNA e aumento da adiposidade em comparação ao grupo

controle. De acordo com Hirata et al. (1997), essas características são típicas desse modelo experimental, pois esses ratos não apresentam hiperfagia e, deste modo, mantêm o peso dentro da normalidade apesar do acúmulo de gordura visceral. Além disso, o menor peso corporal e CNA dos roedores MSG se deve também a deficiência da liberação do hormônio do crescimento, devido à perda relativa do fator liberador do hormônio do crescimento pela ação do MSG no núcleo arqueado (Hermanussen et al. 2006; Gaspar et al. 2016).

O IL, que pode ser utilizado para indicar o grau de obesidade, não apresentou diferença estatística entre os grupos MSG e controle em nosso estudo. Sabe-se que o IL não é absolutamente preciso para a determinação do percentual de gordura corporal do roedor. Ele é equivalente, para ratos, como o IMC utilizado em humanos, que leva em consideração a distribuição de massa através da superfície do corpo. Sendo assim, os animais com baixo peso e reduzido CNA podem ser obesos ou não, o que será determinado pelo percentual de gordura corporal (Von Diemen & Trindade, 2010).

No presente estudo, a prática de exercício físico de forma isolada diminuiu o depósito de gordura retroperitoneal na comparação com o grupo MSG. Estudos anteriores demonstraram proteção semelhante do EFR na redução da adiposidade em ratos tratados com MSG (Ribeiro et al. 2014; Scomparim, 2011). De acordo com Nonogaki (2000), a adiposidade reduzida nos grupos que realizaram natação é provavelmente uma atividade aprimorada do sistema nervoso simpático (SNS), sendo que o EFR ativa circuitos do SNS que promovem a ativação do eixo simpático-adrenal, bem como o eixo hipotalâmico-hipofisário, e, além disso, o EFR aumenta a atividade da lipase sensível a hormônio no tecido adiposo via ação reforçada do SNS.

A suplementação de VD em MSG-obesos sedentários não apresentou redução nos depósitos de gordura e peso corporal, o que também foi observado nos grupos exercitados e suplementados, apesar de ter sido observado em nosso estudo uma provável ação isolada da suplementação com VD sobre o peso corporal na comparação com o grupo MSG. No estudo de Jin et al. (2018), a 1,25(OH)2D3, injetada (subcutânea) na dose de 1µg/kg, 2x/semana, durante 16 semanas, atenuou significativamente a obesidade induzida pelo MSG e a resistência à insulina (RI), vale destacar que em nosso estudo ofertamos a VD em tempo semelhante, porém de forma oral.

Há evidências experimentais de que a concentração de VD na gordura subcutânea aumenta com a suplementação de VD, e um estudo *in vitro* sugere que adipócitos de pessoas obesas com RI podem ter comprometimento da liberação de VD (Didriksen et al. 2015; Di Nisio et al. 2017). A 1,25(OH)2D hormonalmente ativa é produzida no túbulo renal proximal pela enzima CYP27B1, após uma segunda hidroxilação na

posição 1 e há condições em que sua atividade pode ser anormal, como por exemplo, em doenças que apresentam anormalidades nas concentrações de VD como na insuficiência hepática avançada, obesidade, má absorção intestinal, síndrome nefrótica ou DRC (Schuster, 2011; Quesada-Gomez & Bouillon, 2018). As alterações degenerativas em ratos MSG já foram marcadamente pronunciadas na região proximal dos túbulos contorcidos, local de ativação da VD, o que também pode ter efeito negativo na sua ativação (Al-Agha, 2010).

No presente estudo, o tratamento com MSG modificou a morfologia renal. Observamos que no rim de animais MSG-obesos existe redução glomerular e menor área renal associado à intensa degeneração tubular, sugerindo grave atrofia renal. Estudo de Elbassuini et al. (2018), em que ofertaram dose oral de 35mg/kg/dia de MSG também observaram uma estrutura renal desorganizada, com glomérulo atrofiado, porém espaço de Bowman dilatado, e túbulos renais com lúmen dilatado. No entanto, no estudo de Dixit (2014), com ratos tratados com 4mg de MSG/g/kg, em que o MSG foi administrado por via subcutânea, em ratos Wistar albinos adultos, a histomorfometria demonstrou glomérulos com aumento no comprimento e no tamanho da cápsula de Bowman, com aumento do espaço de Bowman. Ferreira et al. (2011), estudaram o índice de esclerose glomerular (IEG), em um grupo de ratos Wistar e outro grupo de ratos espontaneamente hipertensos, que receberam injeções subcutâneas diárias de MSG (2mg/kg/dia e 1mg/kg/dia, respectivamente) no período neonatal (até o 11º dia de vida); e concluíram que, a indução de obesidade neuroendócrina nos ratos hipertensos aumentou significativamente o IEG. Ressalta-se, que em nosso estudo, a via de administração do MSG também foi via injeção subcutânea, porém em diferente dose e tempo de administração (4g/kg/dia e nos primeiros 5 dias de vida).

Este modelo experimental de obesidade apresenta alterações metabólicas que podem levar ao dano renal, entre elas a ativação excessiva do SNS (Grassi, 2006; Hoy et al. 2008; Da Silva Mattos et al. 2012). A lesão renal súbita adquirida consistindo em disfunção microcirculatória, particularmente estreitamento arteriolar aferente glomerular e vasoconstrição aferente são mediadores-chave dessa hipótese (Ruiz-Hurtado & Ruilope, 2018). Outra hipótese para o dano renal é a doença aterosclerótica da arterial renal (DAAR), que está diretamente relacionada com isquemia renal (refletindo em diminuição do peso, volume e espessura do córtex renal) o que pode ser determinante na atrofia renal (Konopka et al. 2007). Há evidências experimentais de que a hipóxia cortical renal pode surgir da isquemia renal ou da hiperfiltração glomerular, e que a fração de filtração é um forte determinante da tensão de oxigênio no tecido cortical (PtO₂) e que a utilização ineficiente de oxigênio para reabsorção de sódio promove hipóxia renal em condições patológicas, incluindo DM (tipo 2), HAS e

doença renovascular (Lee et al. 2017). Além do mais, sabe-se que o aumento da pressão arterial renal, característica deste modelo experimental, pode provocar uma degeneração tubular e fibrose intersticial, enquanto a hipertensão glomerular resulta em glomeruloesclerose, atrofia glomerular e glomerulite proliferativa. Juntas, essas mudanças estão associadas com hiperfiltração glomerular e progressão dos danos tubulares e glomerulares, sendo que o resultado final é a piora da HAS e, eventualmente, insuficiência renal (Acierno & Lobato, 2004).

A deposição de gordura visceral, característica também encontrada neste modelo experimental, poderia determinar compressão da cápsula renal, determinando retenção hidrossalina por ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), além do aumento da atividade adrenérgica. Esses dois mecanismos poderiam determinar alteração na hemodinâmica glomerular, promovendo lesão glomerular e o aparecimento de microalbuminúria (Hall et al. 2003).

De acordo com Beland et al. (2010) um sinal precoce de insuficiência renal pode ser a progressiva redução da espessura do córtex renal, e sugerem que a avaliação da espessura do córtex seria um bom indicador de avaliação da função renal, pois conseguiram estabelecer uma relação linear estatisticamente significativa entre a função renal e a espessura do córtex renal.

Também observamos em nosso estudo a presença de degeneração tubular renal nos animais dos grupos MSG. Dados semelhantes ao encontrado no estudo de Al-Agha (2007), em que após a administração oral de duas doses diferentes de MSG, 2mg/g/kg e 3mg/g/kg por 21 e 45 dias, respectivamente, em ratos albinos machos adultos, observaram que os túbulos renais apresentavam acentuada degeneração com marcada congestão intertubular e infiltração celular inflamatória. Segundo os autores, em especial em doses de MSG mais elevadas (3mg/g/Kg) ocorrem lesões tubulares mais graves provavelmente decorrentes do efeito tóxico direto do MSG sobre as células renais. Vercutere et al. (2004) observaram que os aditivos alimentares, como o MSG, causaram alterações no revestimento celular dos túbulos contorcidos renais, assim como nos corpúsculos de Bowman, e também poderiam ser atribuídos às variações no limiar de reabsorção tubular, fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular (TFG), e todos esses fatores podem contribuir para o efeito nefrotóxico do MSG, que leva a danos celulares e funcionais. No estudo de Ortiz et al. (2006), em que ratos receberam MSG na dose de 4mg/g/kg, porém, por via intraperitoneal, observaram degeneração tubular e necrose renal nesses animais, nos tempos de 15, 30 e 45 minutos após a administração de MSG. Ressalta-se que nos trabalhos citados, o MSG foi administrado por outras vias (oral e intraperitoneal), e em nosso estudo administramos o MSG via injeção subcutânea.

Estudos sugerem que níveis plasmáticos adequados de VD são necessários para os efeitos metabólicos do EFR, tais como, para o aumento das adipocinas anti-inflamatórias (Hoseini et al. 2017). Neste sentido nós associamos EFR e suplementação com VD para avaliar efeito renal. Assim, foi observado que ambos, EFR e VD elevam a espessura do córtex renal em MSG-obesos. Interessantemente, a combinação EFR e VD não potencializou este efeito, sugerindo que EFR e VD agem por mecanismos distintos para promover aumento da espessura do córtex renal. Os mecanismos envolvidos nesta resposta são ainda desconhecidos. Todavia, é bem estabelecido que o aumento do fluxo sanguíneo glomerular pode contribuir para a melhora na oxigenação, redução do estresse, além de melhorar o efeito do SNS e do SRAA. Estes efeitos parecem ser promovidos pelo EFR em pacientes com DRC (Cocks et al. 2013; Howden et al. 2017).

Por outro lado, mecanismos moleculares por trás das ações protetoras da VD no rim podem estar mais relacionados à diminuição do estresse oxidativo, e aumento significativo da capacidade antioxidante total do tecido renal (Elbassuoni et al. 2018; Finch et al. 2012). O receptor da VD (VDR) tem atividades anti-inflamatórias potentes e a baixa expressão de VDR é associada com a atividade de lesão renal (Sun et al. 2019). Xu et al. (2015) relataram que a ativação renal de VDR resulta em menor produção de citocinas pró-inflamatórias renais induzidas por lipopolissacarídeo (LPS).

No rim, o VDR é expresso principalmente em células do epitélio tubular proximal e distal, podócitos e células epiteliais do ducto coletor (Yang et al. 2018). A VD também inibe o SRAA, que está aumentado em ratos modelo MSG, e já está bem descrito na literatura, que este aumento é um importante fator de risco responsável pela progressão de doenças renais (Li et al. 2002). Todavia, é importante ressaltar que o efeito da VD sobre a sobrevida na DRC é controverso, e embora, apesar dos estudos demonstrarem uma diminuição da proteinúria, é comum observar-se uma redução significativa da função renal (diminuição da TFG, hipercalemia) nos pacientes com DRC que receberam tratamento com VD (Christiansen et al. 1978, Palmer et al. 2007; de Zeeuw et al. 2010; Agarwal et al. 2011).

Interessantemente, neste estudo observamos pela primeira vez que há um efeito mais acentuado de proteção tubular renal na associação de EFR com VD. Assim, é possível que a ação protetora tubular da VD, associada com o melhor fluxo sanguíneo renal promovido pelo EFR, atuem positivamente na proteção tubular e conseqüente favoreçam a ativação da VD e sua ligação ao seu receptor VDR.

Conclusão

Em conjunto, nossos dados mostraram que ratos MSG-obesos apresentaram degeneração glomerular e tubular, similar aquela observada na progressão da DRC. O

exercício e a VD, foram efetivos em elevar a espessura do córtex renal, e quando associados, protegeram da degeneração tubular renal tendo, portanto, importante papel na prevenção de lesão renal.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos autores

Késia Zanuzo, Anna Caroliny Detogni, Ediana Amanda Piana, Zoé Maria Guareschi, Luiz Pierre Huning, Patrick Fontes Rodrigues, Sabrina Grassioli e João Paulo de Arruda Amorim conceberam a ideia inicial do estudo e realizaram coleta de dados, análise, interpretação dos dados, redação do manuscrito e revisão crítica. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Referências

- Acierno MJ, Labato MA** (2004) Hypertension in dogs and cats. *Compend Contin Educ Vet* **26**, 336-345.
- Agarwal R, Hynson JE, Hecht TJ, Light RP, Sinha AD** (2011) Short-term vitamin D receptor activation increases sérum creatinine due to increased production with no effect on the glomerular filtration rate. *Kidney Int* **80**, p 1073–1079.
- Al-Agha SZ** (2007) Histological, histochemical and ultrastructural studies on the Kidney of rats after administration of monosodium glutamate. *J. al-Aqsa Univ* **10**, 20-40.
- Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Bassiouni YA, et al.** (2015) Vitamin D attenuates pro-inflammatory TNF- α cytokine expression by inhibiting NF- κ B/p65 signaling in hypertrophied rat hearts. *J Physiol Biochem* **71**, 289-299.
- American Institute of Nutrition (AIN), AIN-93** (1993). Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76-A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.
- Beland MD, Walle NL, Machan JT, Cronan JJ** (2010) Renal cortical thickness measured at ultrasound: is it better than renal length as an indicator of renal function in chronic kidney disease? *AJR Am J Roentgenol* **195**, 46–149.
- Bernardis LL, Patterson BD** (1968). Correlation between `Lee index` and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* **40**, 1-16.

- Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Ramadan E, Hirsch J, Gafter U** (2000) Glomerular hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, 817–822.
- Chagnac A, Weinstein T, Herman M, Hirsh J, Gafter U, Ori Y** (2003) The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1480–1486.
- Christiansen C, Rødbro P, Christensen MS, Hartnack B, Transbøl I** (1978) Deterioration of renal function during treatment of chronic renal failure with 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Lancet*, **2**, 700–703.
- Cocks M, Shaw CS, Shepherd SO, et al.** (2013) Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in sedentary males. *Journal Physiol* **591**, 641–656.
- Collison KS, Zaidi MZ, Saleh SM, et al.** (2011) Effect of trans-fat, fructose and monosodium glutamate feeding on feline weight gain, adiposity, insulin sensitivity, adipokine and lipid profile. *Br J Nutr* **106**, 218–226.
- Contini MDC, Fabro A, Millen N, Benmelej A, Mahieu S** (2017) Adverse effects in kidney function, antioxidant systems and histopathology in rats receiving monosodium glutamate diet. *Exp Toxicol Pathol* **69**, 547–556.
- Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M** (1998) Diffuse idiopathic mesangial proliferative glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. *Med Sci Moni* **4**, 955–959.
- Da Silva Mattos AM, Xavier CH, Karlen-Amarante M, da Cunha NV, Fontes MA, Martins-Pinge MC** (2012) Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats. *Neurosci Lett* **522**, 118–122.
- de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, et al.** (2010) Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* **376**, 1543–1551.
- Didriksen A, Burild A, Jakobsen J, Fuskevåg OM, Jorde R** (2015) Vitamin D3 increases in abdominal subcutaneous fat tissue after supplementation with vitamin D3. *Eur J Endocrinol* **172**, 235–241.
- Di Nisio A, De Toni L, Sabovic I** (2017) Impaired release of vitamin D in dysfunctional adipose tissue: new cues on vitamin D supplementation in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **102**, 2564–2574.
- Dixit SG, Rani P, Anand A, Khatri K, Chauhan R, Bharihoke V** (2014) To study the effect of monosodium glutamate on histomorphometry of cortex of kidney in adult albino rats. *Ren Fail* **36**, 266–270.

- Elbassuoni EA, Ragy MM, Ahmed SM** (2018) Evidence of the protective effect of L-arginine and vitamin D against monosodium glutamate-induced liver and kidney dysfunction in rats. *Biomed Pharmacother* **108**, 799-808.
- Ferreira LBD, Cesaretti MLR, Voltera AF, Ginoza M, Kohlmann Junior O** (2011) Effects of the overlapping between an experimental model of neuroendocrine obesity with arterial hypertension under blood pressure, body weight and metabolic and renal parameters in rats. *BJN* **33**, 1-7.
- Finch JL, Suarez EB, Husain K, et al.** (2012) Effect of combining an ACE inhibitor and a VDR activator on glomerulosclerosis, proteinuria, and renal oxidative stress in uremic rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* **302**,141-149.
- Fortrie G, de Geus HRH, Betjes MGH** (2019). The aftermath of acute kidney injury: a narrative review of long-term mortality and renal function. *Crit Care* **24**, 3-11.
- Gaspar RS, Benevides RO, Fontelles JL, et al.** (2016) Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. *J Endocrinol* **229**,61-72.
- Glastras SJ, Chen H, The R, et al.** (2016) Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. *Plos One* **11**, 1-15.
- Grassi G** (2006) Sympathetic Overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Hypertens Res* **29**, 839-847.
- Guijarro C, Egido J** (2001) Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* **59**, 415- 424.
- Hall JE, Jones DW, Kuo JJ, da Silva A, Tallam LS, Liu J** (2003) Impact of the obesity epidemic on hypertension and renal disease. *Curr Hypertens Rep* **5**, 386-92.
- Hermanussen M, García AP, Sunder M, Voigt M, Salazar V, Tresguerres JA** (2006) Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *Eur J of Clin Nutr* **60**, 25-31.
- Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, Dolnikoff MS** (1997) Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res* **30**, 671-674.
- Hoseini R, Damirchi A, Babaei, P** (2017) Vitamin D increases PPAR γ expression and promotes beneficial effects of physical activity in metabolic syndrome. *Nutrition* **36**, 54-59.
- Howden EJ, Lawley JS, Esler M, Levine BD** (2017) Potential role of endurance training in altering renal sympathetic nerve activity in CKD? *Auton Neurosci* **204**, 74-80.
- Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD** (2008) Nephron number, glomerular volumen, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **17**, 258-265.

- Jin W, Cui B, Li P, et al.** (2018) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects obese rats from metabolic syndrome *via* promoting regulatory T cell-mediated resolution of inflammation. *Acta Pharm Sin B* **8**, 178-187.
- Kariyanna SS, Light RP, Agarwal R** (2010) A longitudinal study of kidney structure and function in adults. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 1120-1126.
- Kim CS, Kim SW** (2014) Vitamin D and chronic kidney disease. *Korean J Intern Med* **29**, 416-427.
- Konopka CL, Jurach A, Wender OC** (2007) Experimental model for the study of chronic renal ischemia in rats: morphologic, histological and ultra-structural analysis. *Acta Cir Bras* **22**, 12-21.
- Lee CJ, Gardiner BS, Ngo JP, Kar S, Evans RG, Smith DW** (2017) Accounting for oxygen in the renal cortex: a computational study of factors that predispose the cortex to hypoxia. *Am J Physiol Renal Physiol* **313**, 218-236.
- Leite NdeC, Ferreira TR, Rickli S, et al.** (2013) Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Pancreatic Islets from MSG-Treated Obese Rats Subjected to Swimming Training. *Cell Physiol Biochem* **31**, 242-256.
- Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu, SQ, Cao LP** (2002) 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest* **110**, 229-238.
- Martin JM, Miranda RA, Barella LF, et al.** (2016) Maternal diet supplementation with n-6/n-3 essential fatty acids in a 1.2 : 1.0 ratio attenuates metabolic dysfunction in MSG-induced obese Mice. *Int J Endocrinol*, 1-10,
- Mccracken E, Monaghan M, Screenivasan S** (2018) Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol* **36**, 14-20.
- Nonogaki, K** (2000) New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* **43**, 533-549.
- Olney JW** (1969) Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721.
- Orozco AR, Jiménez RL, Aguilar AC, Arredondo MC, Rodríguez VM** (2004). Renal disease in diabetics. Immunological bases of tubule-interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Rev Alerg Mex* **51**, 155-161.
- Ortiz GG, Bitzer-Quintero OK, Zárate CB, et al.** (2006) Monosodium glutamate-induced damage in liver and kidney: a morphological and biochemical approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **60**, 86-91.
- Palmer SC, McGregor DO, Macaskill P, Craig JC, Elder GJ, Strippoli GF** (2007). Meta-analysis: Vitamin D compounds in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* **147**, 840-53.

- Quesada-Gomez JM, Bouillon R** (2018) Is calcifediol better than cholecalciferol for vitamin D supplementation? *Osteoporos Int* **29**, 1697-1711.
- Ribeiro RA, Bonfleur ML, Vanzela EC, et al.** (2014) Physical Exercise Introduced After Weaning Enhances Pancreatic Islet Responsiveness to Glucose and Potentiating Agents in Adult MSG-Obese Rats. *Horm Metab Res* **46**, 609-614.
- Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM** (2018) Microvascular injury and the kidney in hypertension. Lesión microvascular y riñón en la hipertensión lesión microvascular y riñón en la hipertensión. *Hipertensión y Riesgo Vascular* **35**, 24-29.
- Schuster I** (2011) Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 186-199.
- Scomparin DX, Grassioli S, Gomes RM, et al.** (2011) Low-Intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice. *Endocr Res* **36**, 83-90.
- Sun J, Zhang S, Liu JS, Gui M, Zhang H** (2019). Expression of vitamin D receptor in renal tissue of lupus nephritis and its association with renal injury activity. *Lupus*, 1-5.
- Tsuboi N, Okabayashi Y, Shimizu A, Yokoo A** (2017) The renal pathology of obesity. *Kidney Int Rep* **2**, p.251-260.
- Totou NL, Moura SS, Coelho DB, Oliveira EC, Becker LK, Lima WG** (2018) Swimming exercise demonstrates advantages over running exercise in reducing proteinuria and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Int* **105**, 76-85.
- Vercoutere B, Durozard, D, Baverel G, Martin G** (2004) Complexity of glutamine metabolism in kidney tubules from fed and fasted rats. *Biochem. J*, **378**, 485-495.
- Von Diemen V, Trindade MRM** (2010) Effect of the oral administration of monosodium glutamate during pregnancy and breast-feeding in the offspring of pregnant Wistar rats. *Acta Cir Bras* **25**, 37-42.
- Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P** (2017). Chronic Kidney Disease. *Lancet*. **25**, 1238-1252.
- Xu S, Chen, YH. Tan, ZX, et al.** (2015) Vitamin D3 pretreatment regulates renal inflammatory responses during lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Sci Rep* **5**, 1-26.
- Yang S, Li A, Wang JM, et al.** (2018) Vitamin D Receptor: A Novel Therapeutic Target for Kidney Diseases. *Curr Med Chem* **25**, 3256-3271.

Tabelas

Tabela 1 Adiposidade e parâmetros biométricos em ratos MSG-tratados.

	CON	MSG
Peso Corporal (g)	335.80 ± 6.27	250.20 ± 7.57*
Comprimento Naso-Anal (cm)	22.53 ± 0.20	20.27 ± 0.45*
Índice de Lee	0.30 ± 0.003	0.31 ± 0.007
Gordura Retroperitoneal (g/g PC)	0.004 ± 0.0004	0.008 ± 0.0003*

Dados em média±EPM; n= 6 ratos por grupo. *p<0,05 no teste t de Student. PC: Peso corporal; CON: controle and MSG: glutamate monossódico.

Tabela 2 Adiposidade e parâmetros biométricos em ratos tratados com MSG submetidos à suplementação de VD e exercício ao longo da vida.

	MSG	MSG-S _{VD}	MSG-E _{NS}	MSG-E _{VD}	p-value VD	p-value exercise	p-value interaction
Peso coporal (g)	250.20 ± 7.57	246.90 ± 7.06	260.8 ±13.58	227.50 ± 7.89	0.0428	0.6177	0.0906
Comprimento Naso-Anal (cm)	20.27 ± 0.45	19.96 ± 0.25	20.69 ± 0.40	19.55 ± 0.28	0.0512	0.9919	0.2546
Índice de Lee	0.31 ± 0.007	0.31 ± 0.003	0.30 ± 0.003	0.31 ± 0.002	0.4027	0.4094	0.7003
Gordura Retroperitoneal (g/g PC)	0.008 ± 0.0003 ^c	0.007 ± 0.0003 ^c	0.005 ± 0.0005 ^{a,b,d}	0.007 ± 0.0004 ^c	0.2289	0.0021	0.0015

Dados em média±EPM; n=6 ratos por grupo. MSG: ratos tratados com glutamato monossódico, sedentários e não-suplementados; MSG-S_{VD}: ratos tratados com glutamato monossódico, sedentários e suplementados com VD; MSG-E_{NS}: ratos tratados com glutamato monossódico, exercitados e não-suplementados; MSG-E_{VD}: ratos tratados com glutamato monossódico, exercitados e suplementados com VD. PC: peso corporal. As letras acima dos números mostram diferenças estatísticas entre os grupos por Anova de Two-way com pós-teste de Tukey (p<0,05). ^aMSG; ^bMSG-S_{VD}; ^cMSG-E_{NS} and ^dMSG-E_{VD}.

Figuras e legendas

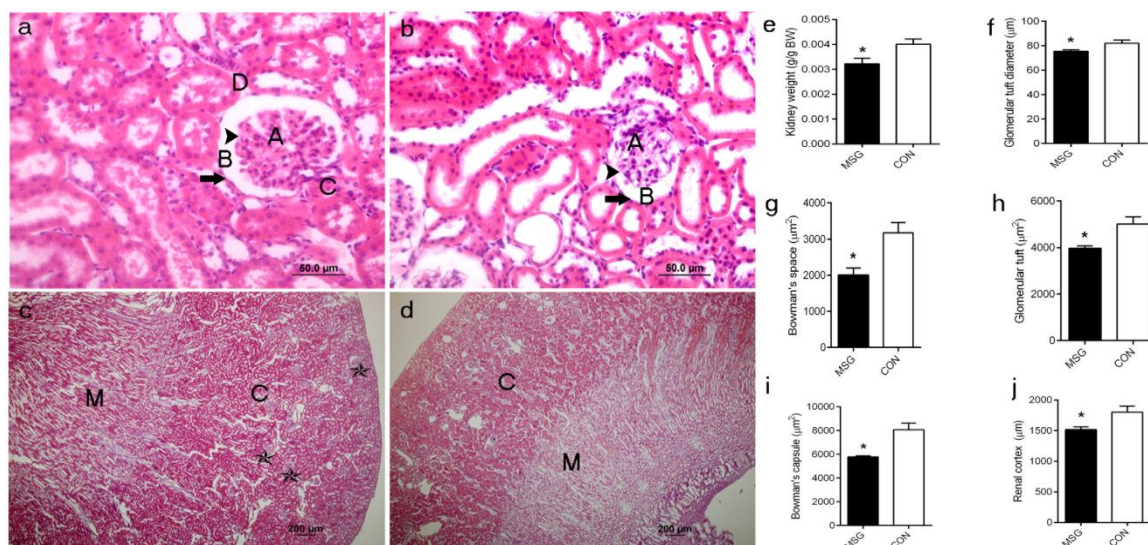


Fig.1 Fotomicrografia comparativa da estrutura renal de animais do grupo CON e MSG. **a.** Glomérulo com aspecto normal nos animais do grupo CON (A= tufo glomerular, B= espaço de Bowman, seta= Cápsula de Bowman, cabeça de seta= área do tufo glomerular, C= pólo vascular, D= pólo urinário). **b.** Grupo MSG com alteração (redução) de todos os parâmetros renais avaliados comparados ao grupo CON e os túbulos renais exibem a luz dilatada. **c.** Córtex renal (C), medula (M) e corpúsculo renal (estrela) com aspecto normal no grupo CON. **d - j.** Córtex renal (C) com menor espessura no Grupo MSG e maior presença de corpúsculo renal sem a presença de tufo glomerular (atrofia total). **e.** Peso de rim (g/g;PC). **f.** Diâmetro do tufo glomerular (μm). **g.** Área do espaço de Bowman (μm²). **h.** Área do tufo glomerular (μm²). **i.** Área da Cápsula de Bowman (μm²). Gráficos apresentam média±EPM. O símbolo "*" acima das barras representa diferença estatística no teste t de Student (p<0,05). Coloração = Hematoxilina de Harris e Eosina. (PC=peso corporal).

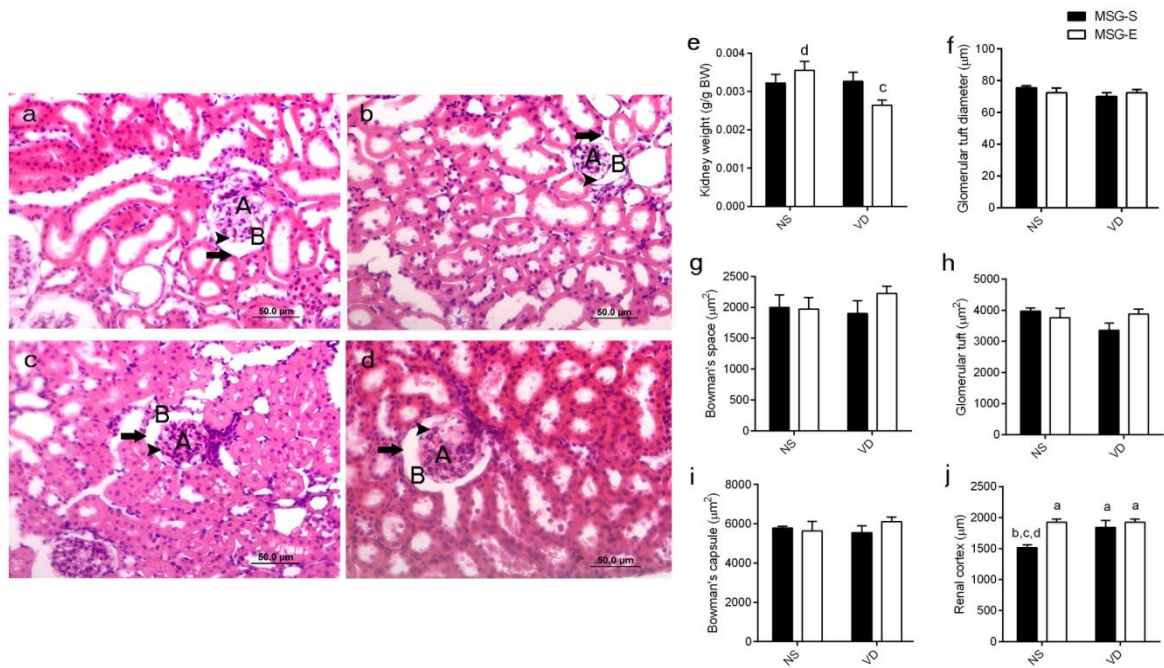


Fig.2 Fotomicrografia da estrutura renal de animais do grupos obesos-MSG. **a.** Glomérulo dos animais do grupo MSG (A= tufo glomerular, B= espaço de Bowman, seta= Cápsula de Bowman, cabeça de seta= área do tufo glomerular). **b.** Grupo MSG-S_{VD}. **c.** Grupo MSG-E_{NS}. **d.** Grupo MSG-E_{VD}. **e.** Peso de rim (g/g/PC). **f.** Diâmetro do tufo glomerular (μm). **g.** Área do espaço de Bowman (μm²). **h.** Área do tufo glomerular (μm²). **i.** Área da Cápsula de Bowman (μm²). **j.** Espessura do córtex renal (μm). Gráficos apresentam média±EPM. As letras acima das barras mostram diferenças estatísticas entre os grupos por Anova de Two-way com pós-teste de Tukey (p<0,05). ^aMSG (MSG-S_{NS}); ^bMSG-S_{VD}; ^cMSG-E_{NS} and ^dMSG-E_{VD}. Coloração = Hematoxilina de Harris e Eosina. (PC=Peso Corporal).

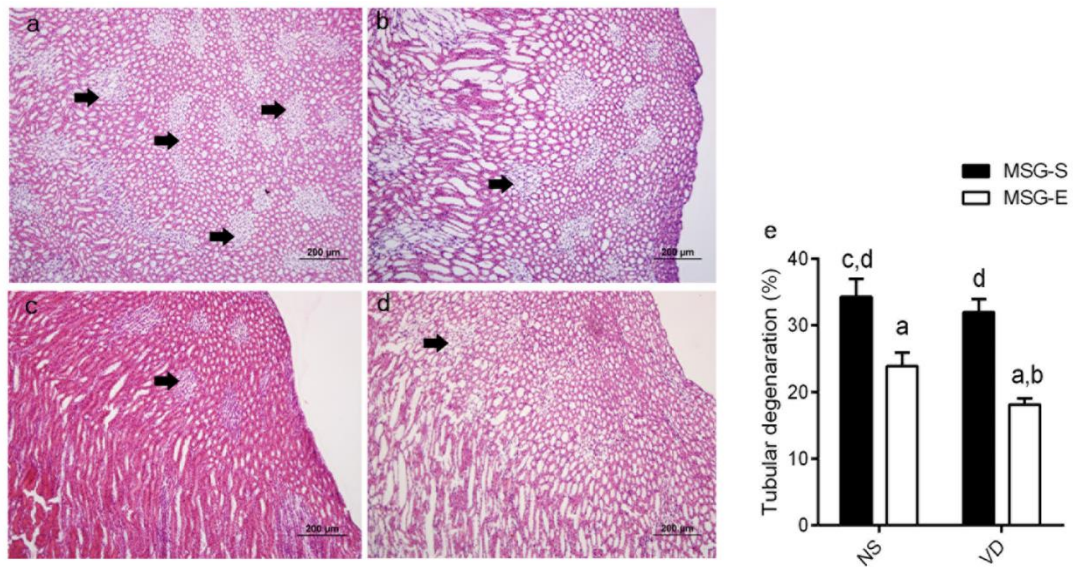


Fig.3 Fotomicrografia da degeneração tubular renal (seta preta) nos grupos obesos-MSG **a.** Grupo MSG. **b.** Grupo MSG-S_{VD}. No Grupo MSG-E_{NS} (**c**) e Grupo MSG-E_{VD} (**d**) são visualizadas menores quantidades de degeneração tubular. **e.** Degeneração tubular (%). As letras acima das barras mostram diferenças estatísticas entre os grupos por Anova de Two-way com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). ^aMSG (MSG-S_{NS}); ^bMSG-S_{VD}; ^cMSG-E_{NS} and ^dMSG-E_{VD}. Coloração = Hematoxilina de Harris e Eosina.

6. ANEXOS



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "A administração de vitamina D potencializa os efeitos do exercício físico sobre a obesidade hipotalâmica?", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 13/11/2015

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

Author Guidelines

For the Journal's Aim and Scope [Click here](#)

Articles submitted to Journal of Anatomy are done so on the following conditions: that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

There are no page charges, and charges are not made for colour, if, in the Editors' opinion it is essential. In all other cases costs must be borne by the author. The Editors-in-Chief of Journal of Anatomy endorse the ARRIVE guidelines for reporting experiments (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>), and expect authors to refer to these guidelines before submission of a manuscript.

NIH-funded authors and *Journal of Anatomy*

The NIH mandates grantees to deposit their peer-reviewed author manuscripts in PubMed Central, to be made publicly available within 12 months of publication. The NIH mandate applies to all articles based on research that has been wholly or partially funded by the NIH and that are accepted for publication on or after April 7, 2008. In order to help authors comply with the NIH mandate, for papers accepted for publication in *Journal of Anatomy*, Wiley Blackwell will post the accepted manuscript (incorporating all amendments made during peer review, but prior to the publisher's copy-editing and typesetting) of articles by NIH grant-holders to PubMed Central at the point of acceptance by the journal. This version will then be made publicly available in PubMed Central 12 months after publication. Following the deposit Wiley Blackwell authors will receive further communications from the NIH with respect to the submission. For further information, see [here](#).

If authors wish to make their final published article openly accessible and without a 12 month embargo, they can choose to publish via the [OnlineOpen](#) service. Wellcome and HHMI grantees can find out further information [here](#).

SUBMISSIONS

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp . All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Types of manuscripts

The majority of manuscripts published in Journal of Anatomy are Original Articles. There are no limits regarding the word count or number of display figures for Original Articles,

but authors are encouraged to write in a concise manner. Authors are discouraged from submitting papers longer than 70 manuscript pages (including figures and tables). The Editors will also consider shorter manuscripts for publication as Brief Communications. These papers are normally shorter than 15 manuscript pages and contain no more than three display figures. In addition, the Editors will consider manuscripts reporting on methodological developments, for publication as Methods papers (either as full length manuscripts or as Brief Communications).

Review articles are normally commissioned by the Editors, but we welcome pre-submission enquiries (prospective authors are encouraged to email a copy of the proposed title and abstract to janat@dpag.ox.ac.uk). Similarly, Historical Perspective and Educational Perspective manuscripts are normally commissioned by the Editors, but again we welcome pre-submission enquiries (prospective authors are encouraged to email a copy of the proposed title and abstract to janat@dpag.ox.ac.uk).

For all manuscripts, during the online submission process, authors will be asked to choose a subject area (these are only used to assist with the allocation of appropriate editors and reviewers) that best represents their paper, from the following:

- Cell biology and tissue architecture
- Comparative functional morphology
- Developmental biology
- Evolutionary developmental biology
- Evolutionary morphology
- Functional human anatomy
- Integrative vertebrate paleontology
- Methodological innovations in anatomical research
- Musculoskeletal system
- Neuroanatomy and neurodegeneration
- Significant advances in anatomy education

There is an additional category, 'Symposium papers', but this should only be used where an author has been specifically invited by one of the Editors in Chief or by a Guest Editor to submit a paper to a forthcoming special symposium issue.

Online manuscript submission

Submission of a manuscript to Journal of Anatomy implies that it reports unpublished work and that it is not under consideration for publication elsewhere. If previously published tables, illustrations or more than 200 words of text are to be included in the manuscript, then the copyright holder's permission must be obtained. Copies of permission letters should be included with the manuscript.

Manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/janat>. Full upload instructions and support are available online from the submission site via the Get Help Now button.

Manuscripts can be uploaded as a Word document (.doc or .docx), or as a Rich Text Format document (.rtf). If submitting to Manuscript Central using LaTeX please upload a PDF file of the manuscript for the reviewers. Note that upon acceptance we will require your TeX/LaTeX source files to edit and typeset the article. Figures for review should be

uploaded separately as GIF (.gif), JPEG (.jpg), TIFF (.tif), or EPS (.eps). On acceptance, you will be required to provide HIGH RESOLUTION GRAPHICS FILES (note that GIF (.gif), JPEG (.jpg), and PNG (.png) files are not acceptable for publication).

Please submit a covering letter addressed to the Editors when prompted online. The covering letter should state the importance and anatomical relevance of the study. Authors will also be asked to provide the names of one or more preferred referees (who have no personal or professional connection with the study or the authors), although the Editors are not obliged to use these.

Review of manuscripts

Due to space restrictions and to the volume of high quality papers submitted, the Editors reserve the right to return immediately those papers that are unlikely to be competitive for space in the journal and/or those that do not conform to the general editorial philosophy and standards of Journal of Anatomy. Wherever possible, such editorial decisions will be processed within a week of submission. Manuscripts selected for external peer review will normally be reviewed within four weeks of submission.

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Please note, manuscripts are **single-blind** peer reviewed: the identity of the reviewer is anonymous (unless the reviewer does not wish to be), but the author name and affiliation is on the paper.

PRESENTATION

Text

Authors should refer to recently published manuscripts for an overall guide to Journal style (available at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1469-7580](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1469-7580)).

Text should be divided into the following sections and appear in the order:

- (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations);
- (2) abstract (no longer than 500 words, in a single paragraph, not divided into sections with headings);
- (3) keywords;
- (4) main body: introduction, methods, results, discussion (this may be combined with the results section) and conclusions if desired;
- (5) acknowledgements;
- (6) author contributions (see below);
- (7) references;
- (8) supplementary material (if any);
- (9) tables; and
- (10) figure legends.

Please avoid the use of footnotes, and number the pages using the page numbering feature of the word processing software.

Authorities for the Latin binomial of every organism are not used in the title or summary, and only on the first mention in the main body of the text.

Gene names and loci should be in italic text and protein names should use in roman text.

Virus nomenclature (and acronyms) should follow the guidelines of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV). The current report is: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL (Eds) (2001) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy Viruses*. San Diego: Academic Press. Authors are also advised to check the ITCV website for the latest information.

Chemical nomenclature should follow the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definitive rules for nomenclature.

Industrial products should be referred to by their common names (ISO Publications 1831, 2474, etc.). In the absence of a common name, use the full name or a defined abbreviation, in preference to a trade name. At first mention, trade names should be capitalised.

Statistics: Calculations and the validity of deductions made from them should be checked and validated by a statistician.

Symbols, units and abbreviations should be expressed as Système International (SI) units, as given in: Baron DN (Ed) (1994) *Units and Abbreviations: a guide for medical authors and editors*. London: Royal Society of Medicine Press. In exceptional circumstances, others may be used, provided they are consistent. Apply to the Editorial Office for advice.

Author contributions

Journal of Anatomy recommends that authors submit a short description of all contributions to their manuscript. Each author's contribution should be described in brief, to appear immediately before the references. Authorship credit might include contributions to concept/design, acquisition of data, data analysis/interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript and approval of the article. Contributors who do not qualify as authors can also be listed and their particular contribution described. Further information on authorship and contributorship may be found here.

References

References in the text should be inserted in parentheses in full for single and dual authored papers, but using the first author and et al. for multiple authored papers. Reference to personal communications, unedited and un-refereed work, and work that is unpublished should be minimal and should appear in the text only. It is the author's responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. References in the list should follow the Harvard system. Over 6 authors will be abbreviated to 3 authors et al. Refer to a recent copy of the journal for examples.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Supporting Information

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should

be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>.

Graphics

Numerical results should be presented either as tables or figures, but not both. The Journal welcomes colour figures and plates, when information would be lost if reproduced in black and white.

Tables: Tables should be typed on separate pages, as an integral part the text file. They should have a brief descriptive title and be self-explanatory. Units should appear in parentheses in the column headings, not in the body of the table. Repeated words or numerals on successive lines should be written in full. Footnotes should be minimal. When the precision of data is expressed as standard error (se) or standard errors of differences (sed) the degrees of freedom (df) should be given.

Electronic artwork: Journal of Anatomy only accepts submission of electronic artwork. The journal accepts the following formats only:

(1) GRAPHS, CHARTS and MAPS as Encapsulated Postscript Format (.eps).

The best results are obtained with software applications that can output EPS format (Systat SigmaPlot; Adobe Illustrator; CorelDraw; Deneba Canvas; Macromedia Freehand); and

(2) PHOTOGRAPHS in Tagged Image File Format (.tif).

TIFF files should be supplied at a minimum resolution of 300 dpi (dots per inch) at the final size at which they are to appear in the journal. TIFF and EPS formats are the industry standard for archiving and print and online publication.

Detailed information on digital illustration standards is available at this webpage.

Please note that file formats other than EPS and TIF will be automatically rejected by the online submission website.

Colour files should be in RGB format. Labelling should be in 10pt sans serif style font. Figure sections should be designated with upper case letters. Magnification bars should be given on electron and light micrographs.

Legends: Table and figure legends should be included within the text file and contain sufficient information to be understood without reference to the text. Each should begin with a short title for the figure. All symbols and abbreviations should be explained within the legend.

Illustrated abstract: Journal of Anatomy publishes graphical abstracts for each article, displayed online in graphical form with a brief abstract. During submission, please nominate an existing image from within the article for use as the illustrated abstract. Your short abstract should consist of 2-3 sentences (max 500 characters with spaces) summarising the key findings presented in the paper.

Cover images: Electronic artwork of high quality suitable for the cover of Journal of Anatomy are welcomed. They should be sent to the Editorial Office (janat@dpag.ox.ac.uk) and be accompanied by a relevant caption. It is preferred that images should be related to submitted papers. Contributors are required to grant exclusive publishing rights to the Society. It is the Publisher's policy not to publish items without signed copyright transfer agreement.

PLAGIARISM

Authors must obtain permission to reproduce any copyright material, and include an acknowledgement of the source in their Article. Authors should be aware that the unreferenced use of the published and unpublished ideas, writing or illustrations of others, from whatever source (including research grant applications), or submission of a complete paper under 'new' authorship in the same or a different language, constitutes plagiarism.

CONDITIONS OF ACCEPTANCE

Manuscripts are accepted on the understanding that they will not be published elsewhere in any form, without the prior consent of the Society. Your material will not be passed to the Publisher without receipt of:

1. covering letter documenting any revisions required by the editor;
2. signed copyright transfer agreement;
3. completed accepted artwork checklist - documenting the graphic files supplied in accordance with industry standards; and
4. EPS files output from vector based software/ 800dpi TIFF files. **LOW RESOLUTION ARTWORK SUBMITTED FOR REVIEW IS NOT SUITABLE FOR PRINT OR ONLINE PUBLICATION.**
5. Any potential or perceived conflict of interest must be declared in the Acknowledgements section of the manuscript. If no conflict exists, please add a sentence to this effect in the Acknowledgements section.

AFTER ACCEPTANCE

Authors will be required to assign copyright to the Anatomical Society. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library,

as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

If you want your article to be open access please choose the appropriate licence agreement when you log in to Wiley's Author Services system. Click on 'Make my article OnlineOpen' and choose the appropriate license by clicking on 'Sign license agreement now' when you log in to Wiley's Author Services system.

For the full list of terms and conditions, see
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>.

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit
<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FAF) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit:
<http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

ARTICLE TRACKING

Online production tracking is now available for your article through Wiley Blackwell Author Services.

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit Wiley Blackwell Author Services for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

PROOFS

Email notification that your work is in proof and ready for collection will be sent from the Journal of Anatomy e-proofing website. Further instructions will be sent with the upload notification email. Acrobat Reader is required in order to read this file. This can be

downloaded (free of charge) from Adobe.

In your absence, please arrange for a colleague to correct on your behalf. Major alterations will be charged to the author and delay publication.

OFFPRINTS

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required

fields: www.sheridan.com/wiley/eoc

AUTHOR MATERIAL ARCHIVE POLICY

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

PREPRINTS

This journal will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of their manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

DATA SHARING, ACCESSIBILITY AND CITATION

Journal of Anatomy encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Last updated: 21st December 2018



Késia Zanuzo <kesiazanuzo@gmail.com>

Manuscript JANAT-2019-0090

2 mensagens

Edward Fenton <onbehalf@manuscriptcentral.com>

25 de fevereiro de 2019 17:07

Responder a: janat@dpag.ox.ac.uk

Para: kesiazanuzo@gmail.com

Cc: janat@dpag.ox.ac.uk

25-Feb-2019

Dear Author,

Re Physical exercise and chronic supplementation with vitamin D increase the renal cortical thickness and decrease the renal tubular degeneration induced by monosodium glutamate (Zanuzo, Késia; Detogn, Anna Carolyn ; Piana, Ediana Amanda; Guareschi, Zoé Maria Guareschi; Fontes Rodrigues, Patrick; Huning, Luiz Pierre ; Grassioli, Sabrina; de Arruda Amorim, João Paulo)

Your manuscript has been successfully uploaded for submission to Journal of Anatomy. The manuscript has been assigned the manuscript number JANAT-2019-0090.

As corresponding author you will receive future communications via e-mail. Please make a note of the manuscript number and be sure to include it in all future communications.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to Journal of Anatomy Manuscript Central <https://mc.manuscriptcentral.com/janat>. Your user id is kesiazanuzo@gmail.com and https://mc.manuscriptcentral.com/janat?URL_MASK=8a76861c4eec47d794b93d47d58d8d60

From your Author Centre you can view your online submission at any time by clicking on your manuscript title which is hotlinked/underlined. My contact details, or the contact details of the Receiving Editor handling the manuscript, are also available on this site.

I will try to handle your manuscript as rapidly as possible and I will be in touch again shortly. Thank you for submitting your manuscript to Journal of Anatomy.

Journal of Anatomy Editorial Office

This letter has been generated electronically