

**CAROLINA STAUT PINHAL**

**“ESTUDO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL DOS  
EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA EM RINS DE  
RATAS WISTAR”**

CAMPINAS

2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CAROLINA STAUT PINHAL

**“ESTUDO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL DOS EFEITOS DA  
DIETA HIPERLIPÍDICA EM RINS DE RATAS WISTAR”**

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Aline Bôer

Co-Orientador: Prof. Dr. Jose Antonio Rocha Gontijo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

DE MESTRADO DEFENDIDA PELA ALUNA CAROLINA STAUT PINHAL

E ORIENTADA PELA PROFA.DRA.PATRÍCIA ALINE BÔER

Assinatura do Orientador

---

CAMPINAS  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÉNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P654e Pinhal, Carolina Staut, 1987-  
Estudo morfológico e funcional dos efeitos da dieta  
hiperlipídica em rins de ratas Wistar. / Carolina Staut  
Pinhal. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Patricia Aline Bôer.  
Coorientador : Jose Antonio Rocha Gontijo.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Fator de crescimento transformador  
beta. 3. Testes de função renal. 4. Fibrose. I. Bôer,  
Patricia Aline. II. Gontijo, Jose Antonio Rocha, 1956-.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Kidney time-course morphological and functional disorders induced by long-term high fat diet intake in female rats.

**Palavras-chave em inglês:**

Obesity

Transforming growth factor beta

Kidney function tests

Fibrosis

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Patrícia Aline Bôer [Orientador]

Wellerson Rodrigo Scarano

Adriana Souza Torsoni

**Data da defesa:** 28-01-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica



---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

CAROLINA STAUT PINHAL

---

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). PATRÍCIA ALINE BÔER

Co-orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO

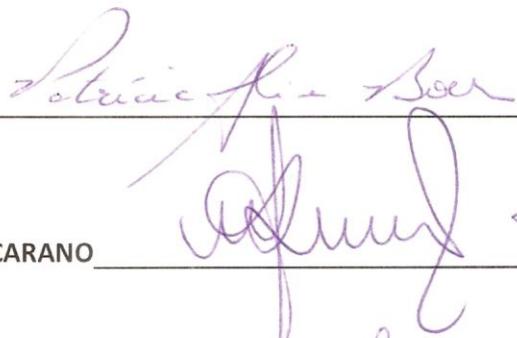
---

---

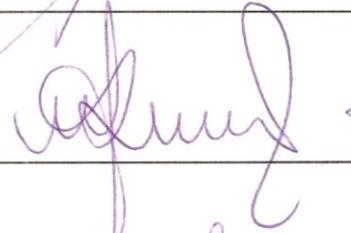
### MEMBROS:

---

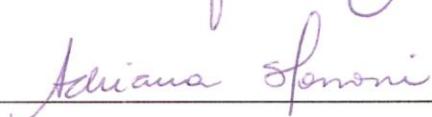
1. PROF(A). DR(A). PATRÍCIA ALINE BÔER



2. PROF(A). DR(A). WELLERSON RODRIGO SCARANO



3. PROF(A). DR(A). ADRIANA SOUZA TORSONI



---

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 28 de janeiro de 2013

---



*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Manoel e Clelia, meus irmãos Natália e Marcelo,  
e ao meu noivo, Garon, pois sem eles  
nada disso seria possível.*



## **Agradecimentos**

---

*Primeiramente a Deus, por ter permitido que eu concluisse mais esse objetivo da minha vida.*

*À minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Aline Boer, pela acolhida, pela confiança e principalmente pela paciência e orientação sábia. Muito Obrigada! E ao meu Co-Orientador Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo, que concedeu a chance de trabalhar com sua equipe, obrigada por toda colaboração.*

*Ao Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, por todos os empréstimos de materiais e esclarecimentos, sempre muito disposto.*

*Aos Professores Dr. José Francisco Figueiredo, Dra. Flávia Fernandes Mesquita e Dra. Eliana Cotta de Faria pelas suas sugestões na qualificação.*

*Aos funcionários da Unesp e da Unicamp por toda colaboração e convívio, as secretárias Salete, Luciana e Regina, e aos técnicos Ricardo, José Eduardo e Ize. E não esquecendo da Dona Terezinha por suas conversas agradáveis.*

*À todos do Laboratório de Metabolismo Hidrossalino da Unicamp, por toda a colaboração em especial a Ize, Flávia e Carmem.*

*À todos os colegas do Laboratório de Programação Fetal, Dani, Agnes, Carla, Letícia, Victor, Heloisa, Selma e Margarete, por todas as ajudas, pelas risadas, choros e desesperos sempre em conjunto. Em especial a Agnes e Dani, por todas as ajudas e ensinamentos e que sem a Dani eu não teria conhecido a Prof. Patrícia. Muito Obrigada a todos.*

*Aos amigos e colegas que fiz no departamento Joyce, Leo, Flávia entre outros que tornaram os dias mais agradáveis e que com certeza não vou me esquecer.*

*À todos da minha família, meus pais, avós e ao meu noivo, pela torcida, preocupação, ajuda e por me acompanharem sempre nesta caminhada. Amo muito cada um de vocês.*

*Aos animais, por contribuírem com a sua vida em prol deste trabalho.*

*À Capes, Cnpq e Fapesp pelo suporte financeiro.*



# *Resumo*



## **RESUMO**

Alguns estudos vêm indicando que o consumo de dieta rica em gordura pode provocar, em longo prazo, desordens renais morfológicas e funcionais. O presente estudo foi realizado em ratas submetidas à dieta hiperlipídica (HFD) durante 3, 5, 7 e 9 semanas comparativamente àquelas que receberam dieta padrão (Co), avaliando-se, por immunoblotting, imunohistoquímica e técnicas histológicas, a expressão renal do receptor tipo 1 de angiotensina II (AT1) e de proteínas relacionadas à fibrose e transição epitelio mesenquimal (EMT), paralelamente ao estudo da função renal. Os resultados da análise por immunoblotting e imunohistoquímica demonstraram aumento significativo na expressão de TGF $\beta$ -1 renal após 3 semanas de dieta hiperlipídica comparativamente ao grupo Co. Paralelamente, verificamos aumento na expressão de ZEB2 nos rins de animais HFD acompanhado pela redução da expressão de E-caderina e aumento na deposição de colágeno e fibronectina. O estudo funcional demonstrou redução significativa na fração de excreção de sódio urinário nos animais HFD após 9 semanas de tratamento. Esta redução ocorreu em consequência da falha na excreção, tanto proximal quanto pós-proximal, de sódio e esteve associada ao decréscimo significativo do clearance de creatinina. A redução na taxa de filtração glomerular ocorreu paralelamente à proteinúria e ao aumento na expressão glomerular de desmina. Estes são os primeiros resultados demonstrando que, em ratas, o consumo de dieta hiperlipídica em longo prazo leva a EMT e acúmulo de colágeno nos rins aumentando a susceptibilidade para desenvolvimento de falência renal.

**Palavras-Chave:** Obesidade, Fator de Crescimento Transformador beta, Testes de Função Renal , Fibrose.



# *Abstract*



## **ABSTRACT**

Evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of high fat diet (HFD) on kidney morphology and function disorders. The present study was performed in 3, 5, 7 and 9 week-old HFD female rats compared to appropriated gender and age-matched animals evaluating the kidney expression of AngII receptor and fibrotic and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers, by immunoblotting, immunohistochemical and histological techniques, in parallel with kidney function. In the current study, the time-course HFD-treated group showed, by immunoblotting and immunohistochemical analysis, a significant early time-course increase in the expression of TGF $\beta$ -1 in the entire kidney of HFD-treated rats, compared to that observed in control group. Simultaneously, the study shows a transient increase in the expression of ZEB2 in HFD whole kidney accompanied by fall in the E-cadherin expression and increased collagen and fibronectin deposition. Also demonstrated a pronounced decrease in fractional urinary sodium excretion in long-term HFD-treated rats. The decreased FE<sub>Na+</sub> was accompanied by a fall in FEP<sub>Na+</sub> and FEPP<sub>Na+</sub> and occurred associated with significant decreased  $C_{Cr}$  and, certainly on the sodium filtered load. The reduction in the glomerular filtration rate occurred in parallel to proteinuria and glomerular desmin overexpression. In conclusion, from our present knowledge, these are the first showing that long-term HFD intake, enhance the susceptibility for adult renal disease and increased renal collagen expression and, subsequently should cause tubular and glomeruli EMT and renal failure at later time points in rats.

**Key Words:** Obesity , Transforming Growth Factor beta , Kidney Function Tests , Fibrosis.



***Lista de Siglas e Abreviaturas***

---

**Ang II-** Angiotensina II

**AT1/2-** Receptor de Angiotensina 1/2

**CCr-** Clearance de Creatinina

**Gd<sub>t</sub>-** Gordura total

**Cli-** Clearance de Lítio

**CNa-** Clearance de Sódio

**Cr-** Creatinina

**CEATOX-** Centro de Assistência Toxicológica

**CEMIB-** Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas

**CEUA-** Comissão de Ética no uso de Animais

**COBEA-** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**Co-** Grupo Controle

**Col-** Colágeno

**EMT-** Transição Epitélio Mesenquimal

**EPM-** Erro padrão da média

**FELi-** Fração de Excreção de Lítio

**FENa**- Fração de excreção de Sódio

**FEPNa**- Fração de excreção Proximal de Sódio

**FEPPNa**- Fração de excreção Pós Proximal de Sódio

**HFD**- Hight Fat Diet/ Grupo Hiperlipídico

**IBGE**- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IMC**- Índice de Massa Corpórea

**Li**- Lítio

**LiCl**- Cloreto de Lítio

**MEC**- Matriz Extra Celular

**PC**- Peso corporal

**TGF $\beta$** - Fator de Crescimento Transformador Beta

**VU**- Volume Urinário

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1- Peso Corporal Inicial.....</b>	55
<b>Figura 2 - Peso Corporal Final.....</b>	55
<b>Figura 3 - Ingestão Diária de Ração.....</b>	56
<b>Figura 4 - Consumo de Ração em Calorias.....</b>	57
<b>Figura 5 - Índice de Adiposidade.....</b>	57
<b>Figura 6 - Peso do rim direito.....</b>	58
<b>Figura 7- Peso do rim esquerdo.....</b>	58
<b>Figura 8- Volume Urinário.....</b>	58
<b>Figura 9- Clearance de Creatinina.....</b>	59
<b>Figura10- Manipulação de Sódio e Potássio.....</b>	60
<b>Figura 11- Proteína Urinária.....</b>	62
<b>Figura 12- Porcentagem Fibras Colágeno da Região Cortical.....</b>	62
<b>Figura 13- Porcentagem Fibras Colágeno da Região Medular.....</b>	63
<b>Figura 14- Imunomarcação TGF- <math>\beta</math>1, 3 semanas de tratamento.....</b>	64
<b>Figura 15- Imunomarcação TGF- <math>\beta</math>1, 5 semanas de tratamento.....</b>	65
<b>Figura 16- Imunomarcação TGF- <math>\beta</math>1, 7 semanas de tratamento.....</b>	65
<b>Figura 17- Imunomarcação TGF- <math>\beta</math>1, 9 semanas de tratamento.....</b>	66
<b>Figura 18- Imunomarcação AT1R, 3 semanas de tratamento.....</b>	67
<b>Figura 19- Imunomarcação AT1R, 5 semanas de tratamento.....</b>	68
<b>Figura 20- Imunomarcação AT1R, 7 semanas de tratamento.....</b>	69

<b>Figura 21- Imunomarcação AT1R, 9 semanas de tratamento.....</b>	69
<b>Figura 22- Imunomarcação ZEB-2, 3 semanas de tratamento.....</b>	70
<b>Figura 23- Imunomarcação ZEB-2, 5 semanas de tratamento.....</b>	70
<b>Figura 24- Imunomarcação ZEB-2, 7 semanas de tratamento.....</b>	71
<b>Figura 25- Imunomarcação ZEB-2, 9 semanas de tratamento.....</b>	72
<b>Figura 26- Imunomarcação Fibronectina,3- 9 semanas de tratamento.....</b>	74
<b>Figura 27- Imunomarcação Desmina,3- 9 semanas de tratamento.....</b>	75
<b>Figura 28-Resultados das análises pelo Western Blotting TGF-<math>\beta</math>1, AT1,ZEB2, E-caderina.</b>	
.....	76
<b>Figura 30- Esquema Representativo dos Resultados: AT1, TGF- <math>\beta</math>1,COL, ZEB-2 e E-caderina.....</b>	77

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> -Comparação da composição e do total de calorias da dieta AIN 93G modificada para hiperlipídica com a dieta convencional (Controle) ração Purina Labina– Presence para ratos e camundongos, Agribands do Brasil Ltda.....	44
<b>Tabela 2</b> - Análise Bioquímica da Urina.....	61
<b>Tabela 3</b> - Análise Bioquímica do Plasma.....	61
<b>Tabela 4</b> - Porcentagem Fibras de Colágeno: Região Cortical e Medular.....	63



	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO .....</b>	xi
<b>ABSTRACT .....</b>	xv
<b>1-INTRODUÇÃO .....</b>	27
1.1 Fibrose Renal mediada por Angiotensina II e TGF-β.....	32
1.2 Fibrose renal e transição epitélio mesenquimal (EMT).....	34
<b>2- OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....</b>	37
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	41
3.1 Animais e ambiente de experimentação.....	43
3.2 Delineamento Experimental.....	43
3.3 Estudo da Função Renal .....	45
3.3.1 Dosagens das Concentrações da Proteína Urinária, do Sódio, Lítio, Potássio e Creatinina Plasmáticas e Urinárias.....	45
3.3.2 Fórmulas Utilizadas para Análise dos Parâmetros Funcionais.....	46
3.4 Sacrifício, Coleta e Armazenamento.....	47
3.5 Índice de Adiposidade.....	47
3.6 Processamento Histológico e Imunoistoquímico.....	47
3.7 Western Blot .....	49
3.8 Quantificação de Colágeno através da Coloração <i>Picrossírius</i> .....	50
3.9 Análise Estatística.....	50

<b>4- RESULTADOS .....</b>	53
4.1 Peso Corporal Inicial e Final.....	55
4.2 Ingestão Diária de Ração/ Calorias e Índice de Adiposidade.....	56
4.3 Peso Renal.....	57
4.4 Função Renal .....	58
4.4.1 Volume Urinário .....	58
4.4.2 <i>Clearance</i> de Creatinina.....	59
4.4.3 Manipulação Renal de Sódio e Potássio.....	59
4.4.4 Proteína Urinária.....	62
4.5 Análise da Área ocupada por Fibras de Colágeno.....	62
4.6 Imunoistoquímica.....	64
4.7 Western Blot.....	76
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	79
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	85
<b>7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	89
<b>8-APÊNDICES.....</b>	105

# *1. Introdução*



## **1. Introdução**

Um estudo epidemiológico recente demonstrou que no mundo todo, ao longo das duas últimas décadas, 1.460 milhões de adultos apresentam sobrepeso [índice de massa corporal (IMC) > 25] e 502 milhões obesidade (IMC > 30) (Finucane *et al.*, 2011). Esta prevalência de obesidade em diferentes populações está relacionada a fatores ambientais, como a redução da atividade física e principalmente à dieta. Estes aspectos podem ainda interagir com fatores genéticos contribuindo para o aumento de gordura corporal em todo o mundo (Pereira-Lancha, Campos-Ferraz e Lancha, 2012). A obesidade é um problema de saúde pública de primeira ordem nos países industrializados, podendo levar a diminuição na expectativa de vida global (Olshansky *et al.*, 2005). As comorbidades relacionadas à obesidade incluem diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular, esteatose hepática, doença de Alzheimer, doença renal crônica e certos tipos de câncer (Haslam e James, 2005; Brunt, 2010; Barnes e Yaffe, 2011).

No Brasil um estudo realizado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e o Ministério da Saúde, encontrou excesso de peso em 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres (IBGE, 2010). Com a crescente industrialização e o estilo de vida moderno dos últimos tempos, o acesso a alimentos ricos em gorduras e carboidratos tem mudado o hábito alimentar da população. As mudanças dos hábitos alimentares estão diretamente relacionadas ao crescimento populacional, ao sedentarismo, ao estresse, e principalmente à redução do tempo disponível para se alimentar (ABESO, 2010). A alimentação rica em lipídios está relacionada ao aumento na incidência de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, hipertensão arterial e dislipidemias (PARKER *et al.*, 1993; MONTELL *et al.*, 2001).

A hipertensão arterial associada à dieta rica em lipídios pode comprometer a natriurese pressórica, secundária à maior reabsorção de sódio. Os mecanismos que parecem estar envolvidos no comprometimento da natriurese pressórica estão relacionados à hiperatividade do sistema nervoso autônomo simpático, aumento da pressão intratubular, anormalidades estruturais dos rins e à ativação do

sistema renina-angiotensina-aldosterona. Além disso, Wang *et al.*, (1996) correlacionaram o consumo de dieta hiperlipídica à diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento da pressão arterial, aumento das concentrações de creatinina plasmática e maior reabsorção de sódio.

A síndrome metabólica, a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 tem sido associados a maior prevalência de litíase renal. Um dos mecanismos se refere à diminuição do pH urinário, prejudicando a excreção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e consequentemente aumento de cálculos de ácido úrico (BOBULESCU *et al.*, 2008; SAKHAE, 2009). Estudos realizados em animais normotensos e animais espontaneamente hipertensos demonstraram que a dieta hiperlipídica provoca alterações na função renal, sendo que esta se inicia após disfunção endotelial, progredindo então para um quadro de hipertensão e obesidade, que induz resposta inflamatória com possível rompimento da barreira de filtração renal (KNIGHT *et al.*, 2008). Além disso, a dieta hiperlipídica altera o balanço entre lipogênese e a lipólise renal, podendo levar ao acúmulo de lipídios e falência renal (KUME *et al.*, 2008).

O tecido adiposo produz vários fatores inflamatórios e de crescimento, que podem estar envolvidos no desenvolvimento de lesões renais em obesos. Entretanto, ainda não está totalmente esclarecido se a inflamação seria um evento desencadeador da lesão renal ou seria importante após a instalação da lesão hemodinamicamente mediada (PAULA *et al.*, 2006). O NF-κβ é um dos principais integrantes de um grupo de proteínas reguladoras gênicas que induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias em adipócitos, estando estas envolvidas no desenvolvimento de disfunção endotelial e falência renal (CINDIK *et al.*, 2005). Lin *et al.*, (2010) demonstraram que a alimentação rica em gorduras saturadas está diretamente associada a presença de albuminúria em adultos de meia idade e idosos, propondo a hipótese que a ingestão de gordura saturada pode ter relação com a albuminúria elevada devido ao aumento de marcadores associados a inflamação, incluindo a Proteína C Reativa (PCR). Outras citocinas ou adipocinas pró-inflamatórias produzidas na obesidade são TNF-α, IL-6 e resistinas, cujas concentrações plasmáticas se encontram elevadas em obesos. Ao contrário, a

concentração de adipocinas anti-inflamatórias como adiponectina, encontram-se diminuída (GUEDES *et al.*, 2010).

Estudos em cães que se tornaram obesos devido à dieta rica em gordura mostraram que, em cinco semanas após o inicio da dieta, ocorreu elevação de 30% na filtração glomerular em relação ao período basal e, neste mesmo modelo, nove semanas após a indução da obesidade, observou-se a expansão da cápsula de Bowman e aumento da matriz mesangial (PAULA *et al.*, 2006). Esse fato foi associado à maior expressão de TGF $\beta$ 1 glomerular e aumento na concentração de glicosaminoglicanos na membrana basal tubular.

Em condições metabólicas normais, quando a ingestão calórica e a utilização de calorias são bem equilibradas, os triglicérides tendem a acumular-se nos adipócitos. O desequilíbrio desse balanço pode levar ao acúmulo de gordura em outros tecidos (SAKHAEE, 2009). Sabe-se que o acúmulo de lipídios nos tecidos contribui para a lesão celular em alguns órgãos, entretanto se esse processo ocorre nos rins ainda é incerto (BOBULESCU, 2010). Os triglicérides, além de se acumularem no tecido adiposo, podem também se acumular em outros tecidos como músculos, fígado, pâncreas e coração (VAN-HERPEN e SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008). Esse processo de redistribuição de gordura desencadeia a lipotoxicidade, sendo que alguns estudos têm demonstrado relação entre obesidade e doença renal crônica, onde a lesão celular é principalmente devida ao acúmulo de ácidos graxos não esterificados e seus metabolitos tóxicos no citoplasma de células podendo levar a disfunção ou morte celular (VAN-HERPEN e SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008; SAKHAEE, 2009; BOBULESCU, 2010). Um dos primeiros a delinear a hipótese da nefrotoxicidade lipídica foi Moorhead *et al.*, (1982) propondo que a dislipidemia pode contribuir para a progressão da doença renal. Segundo o autor as dislipidemias podem ser provocadas por perda de albumina na urina, levando então ao aumento compensatório na síntese hepática de lipoproteínas, o que de fato poderia ser parte de um ciclo de feedback positivo causando lesão renal adicional. Recentemente, Al-Rajaie *et al* (2012) demonstraram que a dieta rica em colesterol resulta em maior nefrotoxicidade em ratas fêmeas que em machos.

Efeitos da obesidade sobre o sistema renal em animais experimentais e em humanos incluem adaptações estruturais e funcionais, tais como o aumento da taxa de filtração glomerular e aumento do fluxo sanguíneo (KAMBHAM *et al.*, 2001). Em um estudo realizado em 6618 amostras de biopsias renais entre 1986 a 2000, foi observado aumento de dez vezes na incidência de glomerulopatias associadas à obesidade, sendo que as principais alterações glomerulares encontradas foram glomeruloesclerose segmentar e focal, aumento do volume de glomérulos e fusão podocitária (KAMBHAM *et al.*, 2001).

Glomérulos e túbulos renais (particularmente túbulos proximais) parecem ser os mais suscetíveis ao acúmulo de lipídios, mas a localização do excesso de lipídios varia entre modelos animais. A disfunção e lesão celular ocorrem através de vários mecanismos, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio, danos em múltiplas organelas, interrupção de vias de sinalização intracelular, liberação de fatores pró-inflamatórios e pró-fibróticos e apoptose induzida por lipídios (lipoapoptose) (BOBULESCU, 2010).

Em um estudo realizado por Bobulescu *et al.* (2008), ratos alimentados com dieta rica em gordura tiveram menor pH urinário e menor excreção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em comparação com animais do grupo controle.

### **1.1. Fibrose renal mediada por Angiotensina II e TGF $\beta$**

A fibrose renal é caracterizada pelo acúmulo de fibroblastos e proteínas da matriz extracelular e, juntamente à perda da funcionalidade dos nefrons, representa a principal característica patológica na doença renal crônica de diversas etiologias incluindo inflamação e distúrbios hemodinâmicos e metabólicos (EDDY e NEILSON, 2006; KIMURA e IWANO , 2009; ZEISBERG e NEILSON , 2010)

A ocorrência de doença renal crônica vem aumentando em todo o mundo e, embora sua progressão seja multifatorial (HARRIS e NEILSON, 2006; RUSTER e WOLF, 2006; PERICO *et al.*, 2008), a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um fator chave envolvido (Rüster e Wolf , 2011)

A visão clássica da angiotensina II (Ang II) como um agente vasoativo envolvido na regulação hemodinâmica sistêmica e local (OPPERMANN *et al.*, 2010) tem sido ampliada devido às suas propriedades de citocina morfogênica que atuaativamente na patologia renal (KLAHR *et al.*, 1995; MEZZANO *et al.*, 2001). A Angiotensina II (Ang II) foi descrita, há duas décadas como estimulante da hipertrofia de células tubulares e do aumento na secreção de colágeno (WOLF e NEILSON, 1990; WOLF *et al.*, 1991;).

Os principais efeitos da Ang II ocorrem via associação a dois receptores específicos AT1 e AT2 (DANIELS *et al.*, 2007). AT1 é responsável pela maioria dos efeitos patológicos de Ang II promovendo proliferação, inflamação e fibrose (LIU *et al.*, 2003; LAN *et al.*, 2003). Embora o papel de AT2 não seja totalmente compreendido tem sido demonstrado seu envolvimento na inibição do crescimento celular e do recrutamento de células inflamatórias no rim (LAN *et al.*, 2003; HIGUCHI *et al.*, 2007; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001; SAKAI *et al.*, 2008; WENZEL *et al.*, 2010). Entretanto alguns trabalhos têm demonstrado que AT2 também tem efeito pró-inflamatório estando envolvido na promoção de fibrose e hipertrofia (WENZEL, 2008; CARVAJAL *et al.*, 2008; RUSTER *et al.*, 2009).

Tem sido demonstrada a associação da Ang II com o TGF $\beta$  que é uma citocina fibrogênica e anti-inflamatória que atua na patofisiologia na doença renal (ROSENBLUM *et al.*, 2010; SHARMA e ZIYADEH, 1994). A Ang II estimula tanto a transcrição quanto a síntese de TGF $\beta$ , particularmente TGF $\beta$ 1, em células de túbulo proximal e induz aumento na expressão de receptores específicos para TGF $\beta$  levando ao aumento de sua ação fibrogênica (WOLF *et al.*, 1993; 1995; 1999). Tem sido demonstrado que a Ang II estimula a proliferação de fibroblastos renais em cultura e aumenta a expressão de RNAm que codifica TGF $\beta$ , fibronectina e colágeno tipo I (KAGAMI *et al.*, 1994). Subsequentemente o TGF $\beta$  estimula o acúmulo de elementos da matriz extracelular (ECM) e inflamação (WOLF *et al.*, 1992; KAGAMI *et al.*, 1994; WOLF *et al.*, 1996; RUIZ-ORTEGA e EGIDO 1997; IWANO *et al.*, 2002; SANCHEZ-LOPES *et al.*, 2009; WOLF, 2000).

## **1.2. Fibrose renal e transição epitélio mesenquimal (EMT)**

Todas as células do nosso corpo são derivadas de uma única célula e os diferentes fenótipos existentes são resultado da expressão específica de um transcriptoma definido que facilita ainda mais a diversidade funcional. Durante décadas, foi proposto que o epitélio precisaria de um estágio terminal de diferenciação para executar suas funções e que, uma vez que esse estágio fosse atingido, estaria protegido de futuras alterações fenotípicas. Entretanto isso foi baseado em conjecturas sem evidência experimental e por isso vem sendo desafiado, por observações de que o epitélio diferenciado pode mudar seu fenótipo sob influência de estresse, por exemplo (NIETO, 2002; TSAI *et al.*, 2002).

A EMT é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, sofra inúmeras modificações bioquímicas, assumindo fenótipo de célula mesenquimal, passando a ter maior capacidade migratória, invasiva, resistência à apoptose. Em nosso trabalho trataremos sobre a EMT do tipo II, que está associada com inúmeras mudanças na expressão de proteínas (ZEISBERG & NEILSON, 2009) que afetarão os componentes das junções intercelulares, as moléculas envolvidas na interação célula-MEC, os componentes do citoesqueleto e reguladores transcricionais (QUAGGIN & KAPUS, 2011). Mudanças relacionadas aos componentes da MEC englobam a superexpressão de algumas proteínas da matriz (por exemplo, fibronectina e colágeno I) e envolvem uma grande variedade de ativadores ou repressores transcricionais utilizados para gerar as alterações características que ocorrem durante EMT (QUAGGIN & KAPUS, 2011).

Strutz *et al* (1995), foram os primeiros a demonstrar a presença de EMT em fibrose renal, utilizando a proteína Fsp1 como marcador em um modelo de doença anti-membrana basal tubular, e notaram que as células epiteliais tubulares podem expressar FSP1, que é normalmente expresso em fibroblastos e não no epitélio. Dessa forma postularam que a EMT pode servir como um novo caminho para a produção de fibroblastos na fibrose renal, já que no rim normal, os túbulos estão

circundados por uma pequena quantidade de tecido intersticial na qual, ocasionalmente, residem fibroblastos (NEILSON, 2006).

Em 1998, um grupo de pesquisadores encontrou evidências morfológicas e fenotípicas para a existência da EMT em rins remanescentes após 5/6 de nefrectomia. Após três semanas da nefrectomia, foi detectada a expressão de  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) bem como de sua forma filamentar no epitélio tubular. Com a progressão da doença, as células epiteliais tubulares perdem sua polaridade apical-basal e tornam-se alongadas migrando para o interstício peritubular através da membrana basal tubular danificada (NG et al, 1998).

Cheng e Lovett (2003) demonstraram que a lesão inflamatória no rim de camundongo pode resultar no recrutamento de uma variedade de células que podem desencadear uma EMT através da liberação de fatores de crescimento como TGF $\beta$ , PDGF, EGF, FGF-2. No local da lesão se acumulam macrófagos e fibroblastos que liberam esses fatores de crescimento, além disso, essas liberam quimiocinas e metaloproteinases. Células epiteliais sob a influência desses sinais moleculares e, agindo junto com as células inflamatórias, induzem danos à membrana basal pela degradação do colágeno tipo IV e da laminina. Estas alterações na expressão de proteínas são geralmente acompanhadas por mudanças morfológicas, pois as células passam a apresentar uma aparência fibroblástica e maior capacidade migratória (LIU, 2010). Esta transição está correlacionada ao declínio da função renal (RASTALDI et al., 2002; HERTIG et al., 2008).

Assim a fibrose renal é caracterizada pelo acúmulo de fibroblastos e proteínas da matriz extracelular, que juntamente com a perda da funcionalidade dos néfrons representam as principais características patológicas da doença renal crônica (EDDY and NEILSON, 2006).

A principal força motriz da EMT, durante a fase fibrogênica da fibrose renal, parece envolver vários fatores de crescimento profibróticos, incluindo TGF $\beta$  (YANG and LIU, 2001; ZAVADIL and BOTTINGER, 2005). TGF $\beta$ 1 pertence a superfamília de proteínas TGF $\beta$ , que são expressas em todos os tipos celulares de mamíferos (RUNYAN et al, 2009). TGF $\beta$ -1 é o mais estudado, além de ser o

mais potente indutor de EMT (ZAVADIL and BOTTINGER, 2005; WILLIS and BOROK, 2007), tendo a capacidade de iniciar e completar o curso inteiro do processo de EMT (YANG and LIU, 2001). O TGF $\beta$ -1 é uma citocina pró-inflamatória e tem como função regular a proliferação celular, apoptose, resposta imune e inflamatória (LETTERIO and ROBERTS, 1998; ROBERTS, 1998).

Wang *et al* (2010), encontraram mudanças morfológicas induzidas pelo TGF $\beta$ , em células mesangiais de ratos, além de aumento da expressão de  $\alpha$ SMA, vimentina e fibronectina. A morfologia dos podócitos também foi drasticamente alterada em células tratadas com TGF $\beta$ , que perderam a sua forma irregular arborizada e tornando-se mais simplificadas e alongadas.

O TGF $\beta$  aumenta a expressão de ZEB1 e ZEB2, que são repressores do gene E-caderina, e induzem a expressão do gene para colágeno tipo 1 (Col1 $\alpha$ 2). (SEKIDO et al, 1994; VERSCHUEREN et al, 1999; MURRAY et al, 2000; PONTICOS et al, 2004; EGER et al, 2005). Em condições basais, os repressores ZEB1/2 regulam negativamente a expressão Col 1 $\alpha$ 2, ligando-se a elementos E-box na região do promotor do Col 1 $\alpha$ 2 (YAMAMOTO et al, 1993; PARK et al, 1997; REEVES and ANDREOLI, 2000; ZIYADEH et al, 2000; WANG et al, 2004; KATO et al, 2007; WEIGERT et al, 2004; KATO et al, 2010).

Kato *et al* (2007), demonstraram que em células mesangiais, sob condições diabéticas, a expressão de Zeb1 e 2 está diminuída e a do col1 $\alpha$ 2 aumentada. Sugeriram que o TGF $\beta$  pode induzir a expressão de colágeno pela diminuição de ZEB 1/2, que é o mecanismo chave para a expressão aumentada do gene para colágeno.

## *2. Objetivos*



## ***2. Objetivo Geral***

O presente estudo tem como objetivo geral estudar, em ratas Wistar, os efeitos da dieta hiperlipídica na função, na morfologia e na expressão e localização de proteínas envolvidas na EMT, na fibrose renal e na lesão podocitária.

### ***2.1. Objetivos Específicos***

Avaliar em rins de ratas Wistar as repercussões do consumo de dieta hiperlipídica, durante 3, 5, 7 e 9 semanas, pelo estudo:

- Da função renal;
- Do conteúdo de colágeno na matriz extracelular;
- Da expressão e localização de TGF- $\beta$ , AT1R, ZEB-2 (SIP-1), E-caderina, fibronectina e desmina.



# *3. Materiais e Métodos*



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Animais e ambiente de experimentação**

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar fêmeas, com quatro semanas de idade procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP/Campinas. Os animais foram mantidos no Biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) no Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, em temperatura média de 25°C em condição controlada de luminosidade, em caixas de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada. Os animais permaneceram em grupos de 3 por caixa, com livre acesso a dieta sólida convencional para roedores (Purina Labina) e água até completarem oito semanas de idade, quando foram mantidos em caixas individuais. O experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº 371-CEUA, da Universidade Estadual Paulista- UNESP/Botucatu.

#### **3.2. Delineamento Experimental**

Ao atingirem seis semanas de vida o ganho de peso corporal foi mensurado, uma vez por semana até o inicio do tratamento.

A partir da oitava semana de vida os animais foram divididos em dois grupos de vinte: um grupo controle (Co) passou a ser alimentado com dieta padrão e o outro com dieta hiperlipídica (HFD: hight fat diet) (Tabela 1). Diariamente foram ofertadas 30g de ração pesando-se a quantidade residual para calcular o consumo. Os animais foram pesados três vezes por semana sendo avaliados os seguintes tempos de submissão à dieta:

- 3 semanas (Co3, n=5 e HFD3, n=5)
- 5 semanas (Co5, n=5 e HFD5, n=5)

- 7 semanas (Co7, n=5 e HFD7, n=5)
- 9 semanas (Co9, n=5 e HFD9, n=5)

**Tabela 1.** Composição e valor calórico da dieta AIN 93G modificada para hiperlipídica e da convencional Purina Labina para ratos e camundongos (Agribrands do Brasil Ltda).

INGREDIENTES	Dieta Controle g/Kg	Dieta Hiperlipídica g/Kg
<b>AMIDO</b>	397,5	52
<b>AMIDO DE MILHO DEXTRINIZADO</b>	132	143
<b>SACAROSE</b>	100	66
<b>CARBOIDRATOS</b>	<b>629,5</b>	<b>261</b>
<b>CASEÍNA</b>	200	271
<b>L-CISTINA</b>	3	3
<b>BITARTARATO DE COLINA</b>	2,5	2,5
<b>PROTEÍNAS</b>	<b>205,5</b>	<b>276,5</b>
<b>ÓLEO DE SOJA</b>	70	34
<b>BANHA (gordura saturada)</b>	---	333
<b>GORDURAS TOTAIS</b>	<b>70</b>	<b>367</b>
<b>CELULOSE MICROFINA (FIBRA)</b>	50	50
<b>FIBRAS TOTAIS</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>MIX MINERAIS</b>	35	35

<b>MIX VITAMINAS</b>	10	10
<b>CALORIAS</b>	2,93 calorias/g	5,44 calorias/g

### **3.3. Estudo da função renal**

A função renal foi avaliada pelos *clearances* de creatinina e de lítio após 9 semanas de tratamento.

Quatorze horas antes do início da coleta da urina, os animais receberam uma dose de cloreto de lítio a 0,06mEq/100g (Synth) administrado por gavagem (introdução de uma sonda gástrica através da cavidade oral), na concentração de 5% do peso corporal. Em seguida a ração foi retirada e os animais ficaram em jejum sólido, ingerindo água *ad libitum*. Duas horas e vinte minutos antes do início da coleta foram administradas, por gavagem, duas sobrecargas hídricas de volumes iguais (5% do peso corporal), com intervalo de 60 minutos entre as aplicações. Após a segunda sobrecarga os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, e após 20 minutos foi iniciada a coleta da urina, em tubos de ensaio graduados para quantificação do fluxo urinário durante 120 minutos.

Após o término da coleta o volume urinário foi anotado, a urina foi homogeneizada, centrifugada, e o sobrenadante foi congelado (-20°C) para posterior dosagem. Em seguida, os animais foram anestesiados com ketamina (75mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg) e submetidos à coleta de sangue através da cauda. Foram coletados 1,5 ml de sangue, em microtubos contendo 20µL de heparina. As amostras foram centrifugadas e o plasma foi congelado para posterior análise.

#### **3.3.1. Dosagens das Concentrações da Proteína urinária e do Sódio, Lítio, Potássio e Creatinina Plasmático e Urinário.**

As concentrações de sódio, lítio e potássio no plasma e na urina foram determinadas pelo método de fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo,

Brasil). A creatinina plasmática e urinária e a proteína urinária foram mensuradas pelo método colorimétrico por espectrofotometria (Micronal 383, São Paulo, Brasil).

### **3.3.2. Fórmulas Utilizadas para Análise dos Parâmetros Funcionais**

- Quantificação de Proteína na Urina

Para determinação de proteína na urina foi utilizada a fórmula: A teste/A padrão x 50 (A teste: absorbância do teste (valor da amostra), A padrão: absorbância padrão). Os resultados foram expressos em mg/dL.

- Clearance de Creatinina ( $C_{Cr}$ ), Sódio ( $C_{Na}$ ) e Potássio ( $C_k$ )

Representa a depuração plasmática da creatinina por unidade de tempo pela totalidade dos glomérulos renais funcionantes, calculada pela fórmula  $U_x V^1/P$  ( $U$ : concentração urinária de creatinina, sódio ou potássio,  $V^1$ : fluxo urinário minuto,  $P$ : concentração plasmática de creatinina, sódio ou potássio). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$  peso corporal.

- Fração de Excreção de Sódio ( $FE_{Na}$ )

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada pela urina em um determinado período de tempo, calculado pela fórmula  $C_{Na}/C_{Cr} \times 100$  ( $C_{Na}$ : clearance de sódio,  $C_{Cr}$ : clearance de creatinina). Os resultados foram expressos em porcentagem (%)

- Fração de Excreção de Potássio ( $FE_k$ )

Representa a fração de carga filtrada de potássio excretada pela urina em um determinado período de tempo, calculada pela fórmula  $C_k/C_{Cr} \times 100$  ( $C_k$ : clearance de potássio e o  $C_{Cr}$ : clearance de creatinina). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

- Fração de Excreção de Lítio ( $FE_{Li}$ )

Representa a fração de carga filtrada de lítio excretada pela urina em um determinado período de tempo, calculada pela fórmula:  $C_{Li}/C_{Cr} \times 100$  ( $C_{Li}$ : Clearance de Lítio,  $C_{Cr}$ : Clearance de creatinina)

- Fração de Excreção Proximal de Sódio ( $FEP_{Na}$ )

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada ao longo do túbulo proximal do néfron, calculada pela fórmula  $C_{Li}/C_{Cr} \times 100$  ( $C_{Li}$ : clearance de lítio,  $C_{Cr}$ : clearance de creatinina). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

- Fração de Excreção Pós Proximal de Sódio (FEPP<sub>Na</sub>)

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada ao longo dos segmentos distais do túbulo proximal do néfron, calculada pela fórmula  $C_{Na}/C_{Li} \times 100$  ( $C_{Na}$ : clearance de sódio,  $C_{Li}$ : clearance de lítio). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

### **3.4. *Sacrifício, coleta e armazenamento***

Após a 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> semana de dieta os animais foram anestesiados com ketamina (75mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg) por via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão na altura do abdômen para a remoção dos rins e pesagem destes. Um rim foi processado para histologia e o outro rim foi imediatamente colocado em tubo falcon e conservado em freezer -80°C para análise por western blot.

### **3.5. *Índice de Adiposidade***

Após a remoção dos rins foram coletadas bilateralmente e pesadas as bolsas de gorduras das regiões: pélvica, gonadal e retroperitoneal. Para se obter o índice de adiposidade de cada animal foi utilizada a fórmula:  $100 \times Gd_t/PC$  ( $Gd_t$ : gordura total,  $PC$ : peso corporal), e o resultado expresso em porcentagem(%).

### **3.6. *Processamento histológico e imunoistoquímico***

Os rins foram fixados por imersão em solução fixadora de parafolmoldeído (Sigma) por 15 horas, lavados em água corrente por 1 hora e armazenados em álcool 70%. Posteriormente o material foi desidratado através de soluções com concentração crescente de álcool (80%, 90%, 95%, 100%), diafanizado em xanol e embebido em paraplast (Sigma) para inclusão e formação dos blocos.

Cortes histológicos, com 5 µm de espessura, foram colocados sobre lâminas histológicas identificadas e pré-tratadas com solução de triethoxsilane (3- Aminopropyl, Sigma Chemical CO, Mo, EUA) para aumentar a aderência dos cortes. As lâminas contendo os cortes foram levadas à estufa à 60°C por 12 horas e, posteriormente, passaram pelos seguintes procedimentos: desparafinização (através de banhos em xanol e álcool-xanol), hidratação (realizada através da passagem do material por banhos sucessivos em soluções de concentração decrescente de álcool até a água destilada). Em seguida foi realizada recuperação antigênica em tampão citrato 0,01M pH=6,0 em panela de pressão por 25 minutos. Então foi feito bloqueio da peroxidase endógena: 90ml de metanol e 10ml de peróxido de hidrogênio durante 10 minutos em câmara escura. Logo após, foi feito o bloqueio de ligações inespecíficas em solução de leite desnaturado a 1% em PBS durante uma hora, em temperatura ambiente. Então os cortes foram incubados em anticorpo primário diluído em BSA (Amresco,5%), em câmara úmida por 12 horas a 4°C. Os anticorpos utilizados foram TGF-β1, ZEB2 (SIP1), AT1, desmina e fibronectina (Santa Cruz Biothecnology, EUA). Em seguida os cortes foram lavados em PBS 0.1M, pH 7.4 e incubados com anticorpo secundário (anti-rabbit ou anti-goat, 1:200 -Santa Cruz Biothecnology, EUA) diluído em BSA 1% (Amresco), em temperatura ambiente por duas horas. Após lavagens sucessivas com PBS (0.1M e pH 7.4) para a remoção do excesso de anticorpo, as amostras foram incubadas com o kit ABC (VECTOR Peroxidase Standart PK-4000) por 40 minutos. As lâminas foram então lavadas e incubadas com a solução de 3'3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB-Sigma Chemical CO, MO, EUA). O preparo da solução foi feito colocando-se 3,75 mg de DAB em 10 ml de tampão PBS e adicionado 2,5 µl de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) à 30% (a mistura dos componentes desta solução foi feita obrigatoriamente na seqüência em que aparece no texto e imediatamente antes do uso). Foram aplicados 200 µl/lâmina da solução em cada lâmina até o inicio da marcação, quando foram lavadas e contra-coradas com hematoxilina de Harris. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool 70%, 95% e 100% e xanol. Posteriormente, foi feita a

montagem das lâminas com lâminula (24x32mm) em resina sintética Permount (FISHER, EUA).

### **3.7. Western Blot**

Os rins até então armazenados em freezer a -80°C, foram homogeneizados (em solução tampão 10mM de EDTA, 100mM de Trisma base, 10mM de pirofosfato de sódio, 100mM fluoreto de sódio, 10mM ortovanadato de sódio, 2mM de PMSF, 0,1mg/mL de aprotinina), com Potyron (modelo PT 10/35, *Brinkmann Instruments*) operado em velocidade máxima, por no máximo 10 segundos. Após a extração foi aplicado em cada amostra 10% do volume total de Triton 10% por 40 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante retirado e mantido em biofreezer -80°C até o processamento.

- Quantificação de proteínas:

As proteínas totais foram quantificadas utilizando o método de Bradford e lidas por espectrofotometria. Após leitura foi realizado a adição de tampão de Laemmli e 2-Mercaptoethanol –Bio-Rad a uma parte da amostra que foi diluída em água destilada. Parte do extrato foi fervido em banho Maria a 100°C por cinco minutos, e aplicados no gel (SDS-PAGE) de 1,5 mm de espessura. No mesmo gel foi utilizado o marcador de proteínas (Thermo Scientific), para identificação do peso molecular. A eletroforese foi realizada em cuba da Bio-Rad (mini-Protean) com solução tampão para eletroforese a partir de 60V aumentando gradativamente até 120V por no máximo 2 horas em temperatura ambiente. As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando o equipamento de eletrotransferência da Bio-Rad, mantidas em solução tampão por aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 700V sob refrigeração contínua com gelo. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau e escaneadas (Romero-Calvo et al. 2010). Após lavagem as membranas foram imersas em solução bloqueadora (10ml de solução basal + 0,5g de leite em pó desnatado) com agitação constante por 2 horas em temperatura ambiente. Foi realizada lavagem com solução basal e feita a incubação em agitação à 4°C,

*overnight* com anticorpos primários (TGF- $\beta$ , SIP1, AT1) diluídos BSA 3%. Após a incubação com anticorpo primário foi realizada lavagem com solução basal e incubação com anticorpo secundário por duas horas em agitação e temperatura ambiente. Após lavagem as membranas foram incubadas em kit de quimioluminescência (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). As membranas foram expostas em filme fotográfico que posteriormente foi revelado e fixado (revelador manual-Brafox). O controle da quantidade de proteínas aplicadas aos géis foi feito pela divisão dos valores obtidos nas quantificações das bandas marcadas pelos anticorpos e pelo Ponceau nos respectivos pesos moleculares (Romero-Calvo *et al.*, 2010).

### **3.8. Quantificação de colágeno através da coloração Picrossírius**

Cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados como descrito anteriormente. Segundo foi realizada a coloração pelo Picrossírius intercalando com ácido pícrico (13 minutos) para a análise das fibras colágenas (JUNQUEIRA *et al.*, 1979) . As lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada, deixadas secar ao ar livre, por aproximadamente duas horas, e montadas com lamínula e permount (Fischer Scientific). Nesta técnica as fibras colágenas se coram de vermelho. Para análise foi realizada a captura das imagens em fotomicroscópio acoplado a um computador usando software de análise de imagem Leica Qwin Versão 3.1 para Windows<sup>TM</sup> .

Foram efetuadas 10 medidas automáticas (detecção automática da cor vermelha pelo software) utilizando-se objetiva 20x, em 10 campos microscópicos da região cortical e 10 na região medular (no mínimo 4 animais por grupo) para cálculo da área ocupada por fibras colágenas (LACORTE *et al.*, 2012).

### **3.9. Análise Estatística**

Os dados obtidos deste estudo são expressos em média $\pm$  EPM (Erro Padrão da Média) ou mediana e quartil quando apropriado. As análises

estatísticas foram realizadas utilizando Kruskal-Wallis, ANOVA one-way ou teste t de Student quando apropriado, através do GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., EUA). Post hoc comparações entre as média selecionadas foram realizadas com o teste Neuman-Keuls-Student, quando ANOVA inicial indicou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. As comparações que envolvem apenas duas médias dentro ou entre grupos foram feitas utilizando um teste t de Student. O nível de significância foi de  $P \leq 0,05$ .



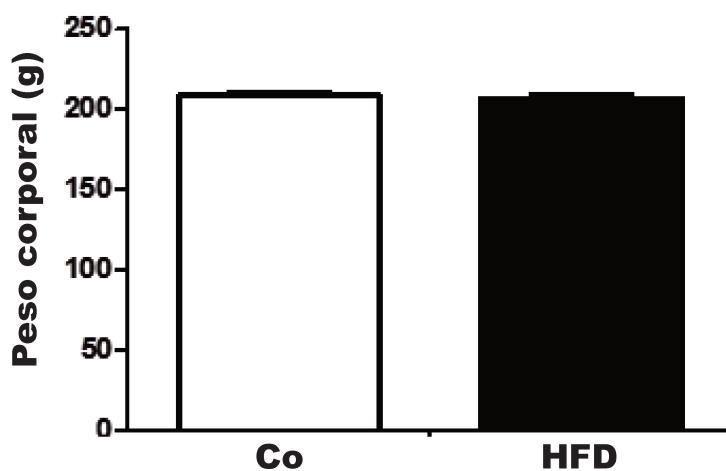
# *4. Resultados*



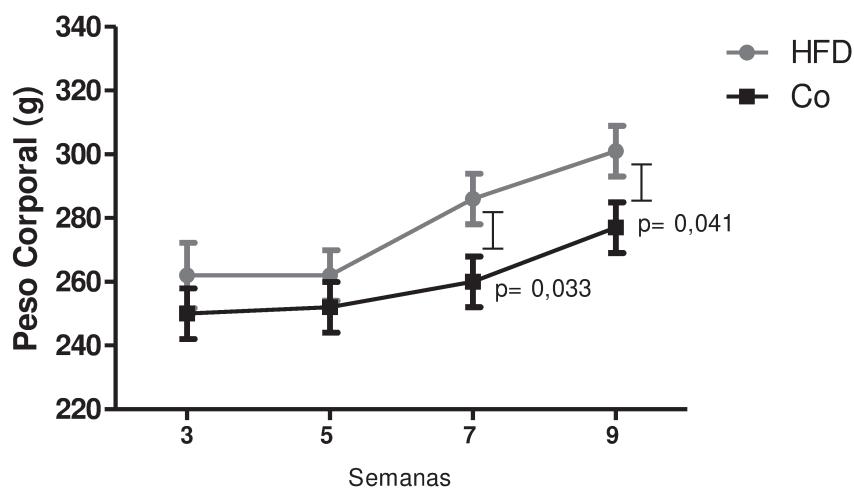
## 4. Resultados

### 4.1. Peso Corporal Inicial/ Final

Como demonstrado na figura 1, não foram encontradas diferenças no peso dos animais no início do experimento. A ingestão de dieta hiperlipídica levou ao aumento significativo do peso corporal comparativamente aos controles, após 7 e 9 semanas (Figura 2).



**Figura 1.** Peso corporal antes do início do tratamento. Os resultados estão expressos como média $\pm$  EPM ( $p=0.63$ ,  $n=20/\text{grupo}$ ).

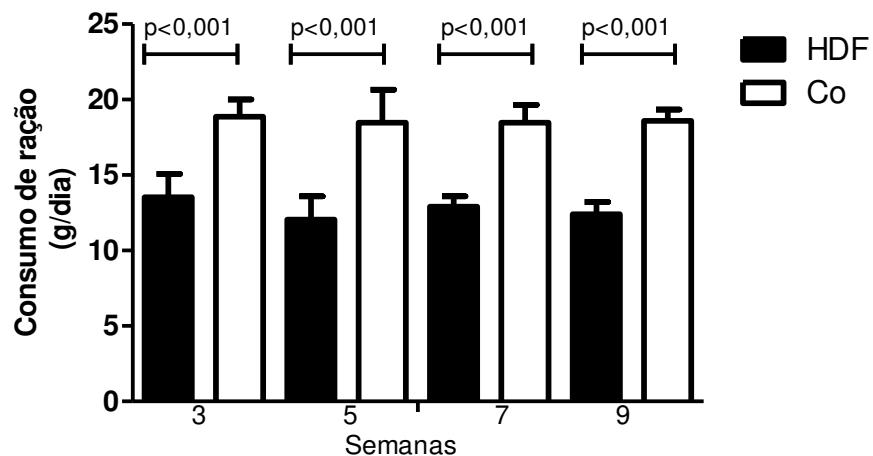


**Figura 2.** Peso corporal após os tempos experimentais de consumo de dieta padrão (Co) e hiperlipídica (HFD). Os resultados estão expressos como média± EPM ( $n=5$ ).

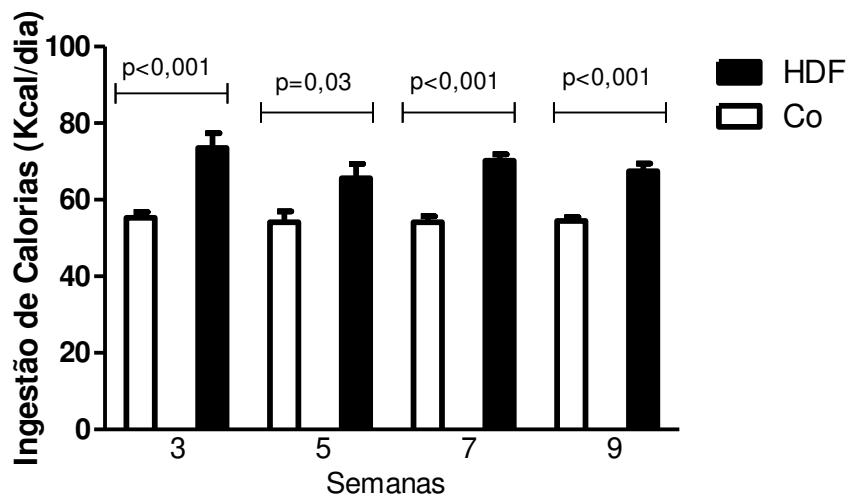
#### **4.2. Ingestão Diária de Ração/Calorias e Índice de Adiposidade**

Os animais HFD consumiram menor quantidade de ração quando comparados aos Co (Figura 3), entretanto o consumo calórico dos HFD foi significativamente maior em todos os períodos estudados (Figura 4).

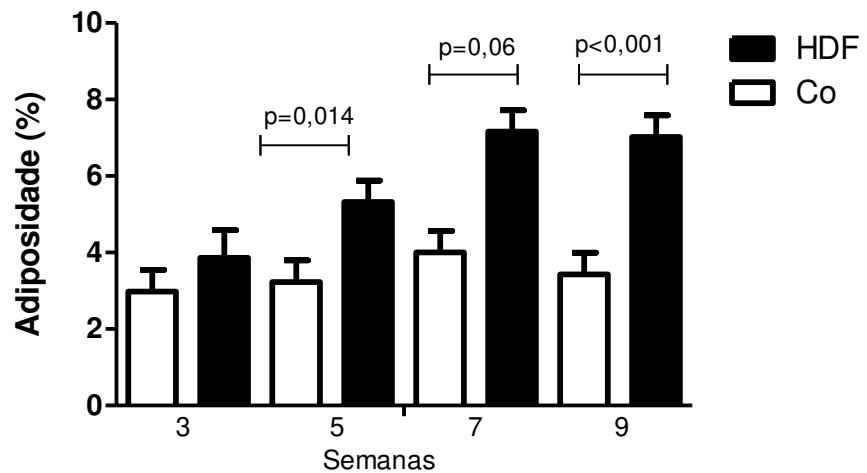
A partir da quinta semana de consumo de dieta hiperlipídica, observamos aumento significativo no índice de adiposidade em HFD comparativamente ao Co (Figura 5).



**Figura 3.** Ingestão diária de ração. Os resultados estão expressos como média± EPM.



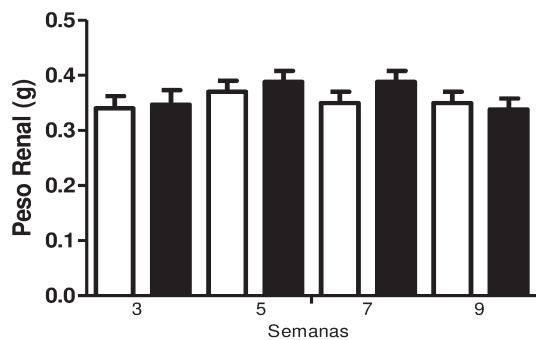
**Figura 4.** Consumo diário de calorias. Os resultados estão expressos como média± EPM.



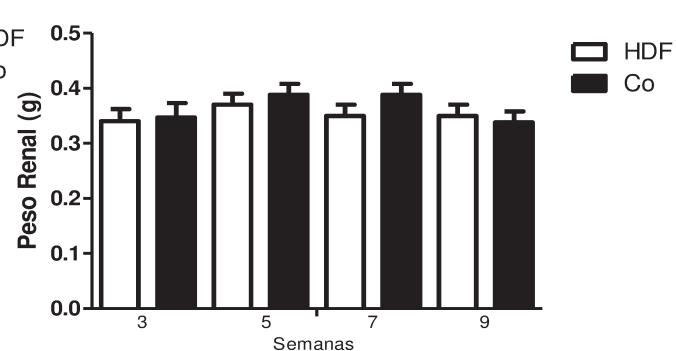
**Figura 5.** Índice de adiposidade. Os resultados estão expressos como média± EPM.

#### 4.3. Peso Renal

Não foram observadas diferenças significativas no peso dos rins direitos (Figura 6) e esquerdos (Figura 7) dos animais HFD comparativamente aos Co.



**Figura 6.** Peso dos rins direitos calculado pela fórmula: Peso do rim/Peso Corpóreo x100. Resultados expressos em média± EPM.

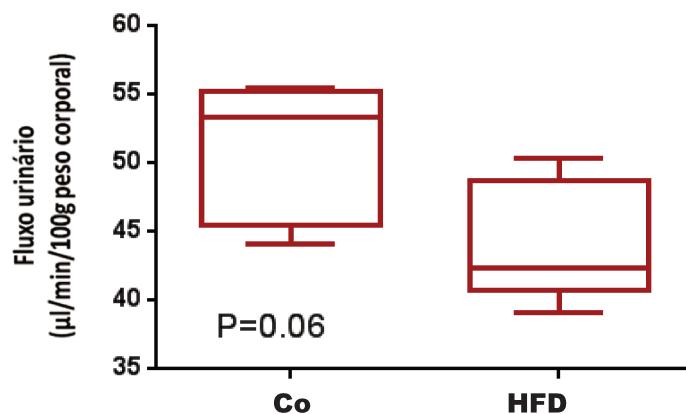


**Figura 7.** Peso dos rins esquerdos calculado pela fórmula: Peso do rim/Peso Corpóreo x100. Resultados expressos em média± EPM.

#### 4.4. Função Renal

##### 4.4.1. Volume Urinário

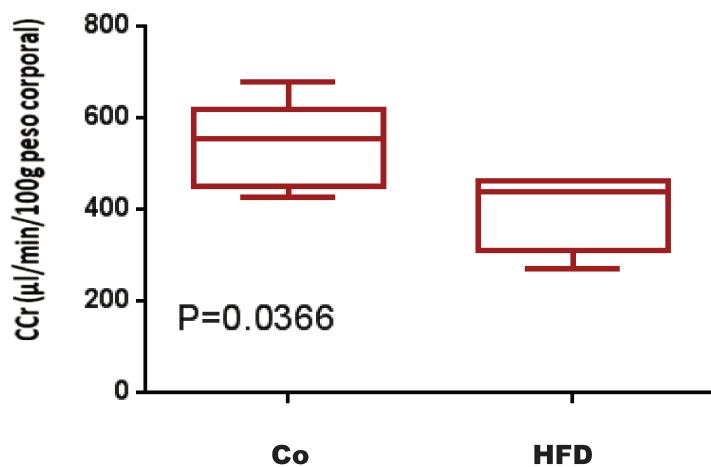
O grupo HFD apresentou redução, embora não significativa, do fluxo urinário comparativamente ao grupo Co ( $50.9 \pm 2.32$  vs  $44.2 \pm 2$ ,  $n=5$ , Figura 8).



**Figura 8.** Fluxo urinário. Resultados expressos em média± EPM.

#### 4.4.2. Clearance de Creatinina

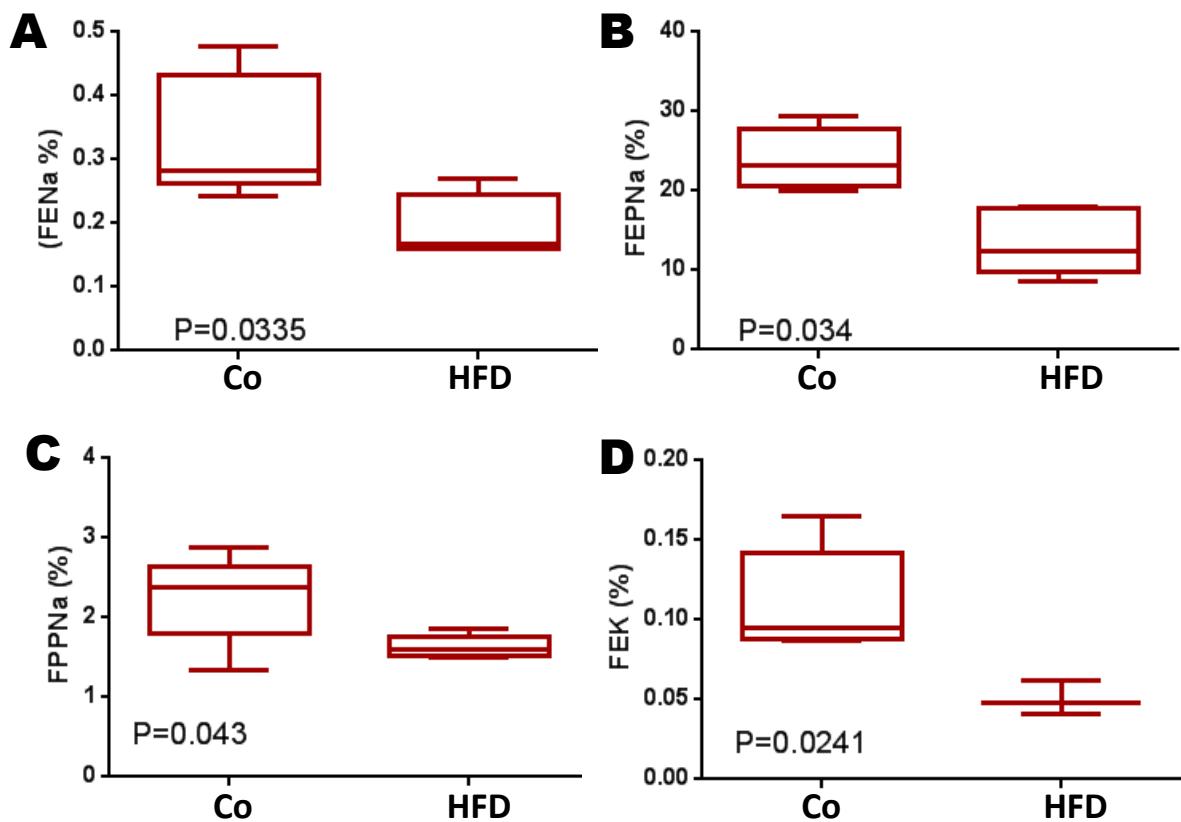
Os animais do grupo HFD apresentaram redução significativa na taxa de filtração glomerular, estimada pelo *clearance* de creatinina (Figura 9), quando compara à taxa apresentada pelos animais do grupo Co ( $396.6 \pm 37.67$  vs  $539.3 \pm 42.67$ , n=5).



**Figura 9.** Clearance de creatinina (Ccr). Resultados expressos em média± EPM.

#### 4.4.3. Manipulação Renal de Sódio e Potássio

Na figura 10A podemos observar que os animais do grupo HFD apresentaram redução significativa na fração de excreção de sódio comparativamente à observada nos animais do grupo Co ( $0.19 \pm 0.043$ , n=4 vs  $0.33 \pm 0.043$ , n=5). O *clearance* de lítio revelou que esta retenção de sódio, observada no grupo HFD, foi devida a redução na excreção deste íon tanto pelo nefron proximal (HFD:  $13.43 \pm 1.87$  vs Co:  $23.9 \pm 1.72$ , n=5, Figura 10B) quanto pelo pós-proximal (HFD:  $1.62 \pm 0.06$  vs Co:  $2.25 \pm 0.25$ , n=5, Figura 10C). Em relação a fração de excreção de potássio houve diminuição significativa no grupo HFD comparativamente ao controle (HFD:  $0.05 \pm 0.006$ , n=3 vs Co:  $0.11 \pm 0.015$ , n=5, Figura 10D).



**Figura 10.** Manipulação renal de Sódio e Potássio. Resultados expressos em média± EPM.

Nas tabelas 2 e 3 encontram-se os resultados obtidos nas dosagens bioquímicas.

**Tabela 2.** Análise Bioquímica do Plasma.

	Valor p		
	Co	HFD	
<b>Sódio</b> (mmol/L)	151,30 ±4,943	140,50 ±7,340	<b>0,0259</b>
<b>Número de Animais</b>	5	5	
<b>Potássio</b> (mmol/L)	7,96 ±0,458	7,29 ±0,235	<b>0,0196</b>
<b>Número de Animais</b>	5	5	
<b>Creatinina</b> (mg/dL)	0,37 ±0,048	0,45 ±0,048	<b>0,0299</b>

Resultados expressos em média± EPM.

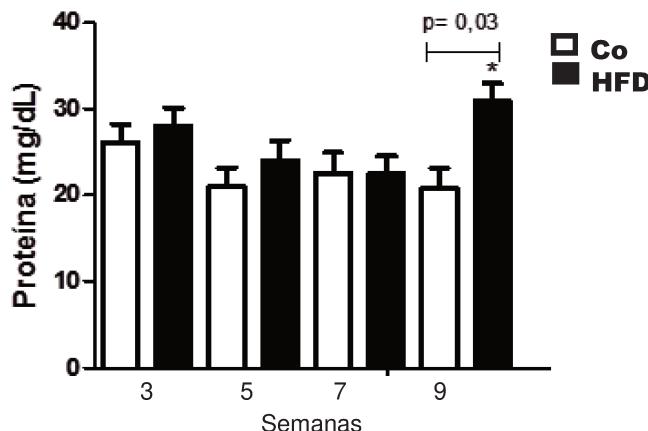
**Tabela 3.** Análise Bioquímica da Urina.

	Valor p		
	Co	HFD	
<b>Sódio</b> (mmol/L)	5,64 ±1,755	3,24 ±0,661	<b>0,0211</b>
<b>Número de Animais</b>	4	5	
	3,77	2,07	<b>0,0002</b>
<b>Potássio</b> (mmol/L)	±0,414	±0,414	
<b>Número de Animais</b>	5	4	
<b>Creatinina</b> (mg/dL)	3,58 ±0,453	4,32 ±0,453	<b>0,0325</b>
	5	5	

Resultados expressos em média± EPM.

#### 4.4.4 Proteína Urinária

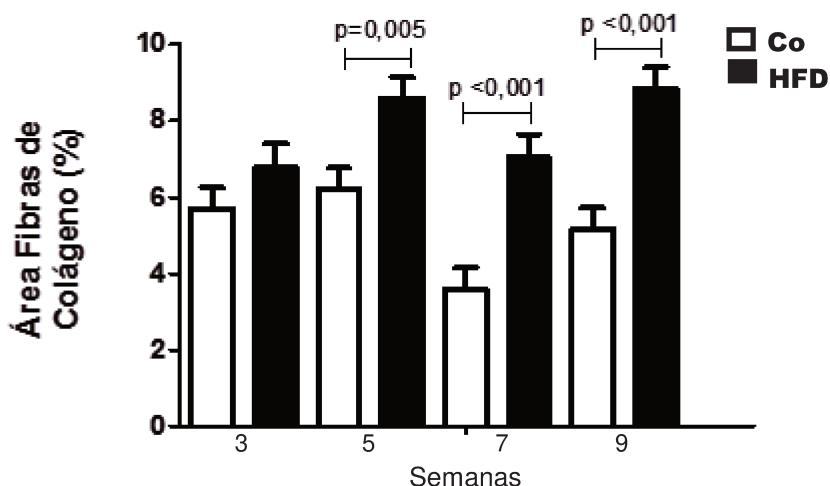
Quanto à ocorrência de proteinúria, somente após 9 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica verificamos aumento significativo (Figura 11).



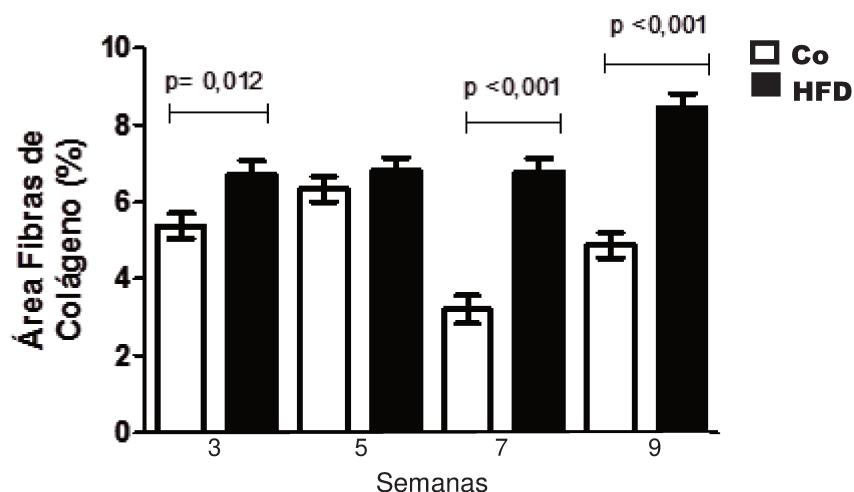
**Figura 11.** Proteína Urinária. Resultados expressos em média $\pm$  EPM.

#### 4.5. Análise da área ocupada por fibras de colágeno

A partir da 5<sup>a</sup> semana de dieta hiperlipídica verificamos aumento significativo na concentração de fibras colágenas no córtex renal comparativamente ao controle (Figura 12, Tabela 4). Já na região medular, observamos que após 3 semanas de dieta hiperlipídica ocorreu aumento significativo das fibras colágenas entretanto, este aumento não foi observado após 5 semanas e voltou a aparecer após 7 e 9 semanas (Figura 13, Tabela 4).



**Figura 12.** Porcentagem de fibras colágenas no córtex renal. Resultados expressos em média± EPM.



**Figura 13.** Porcentagem de fibras colágenas na medula renal. Resultados expressos em média± EPM.

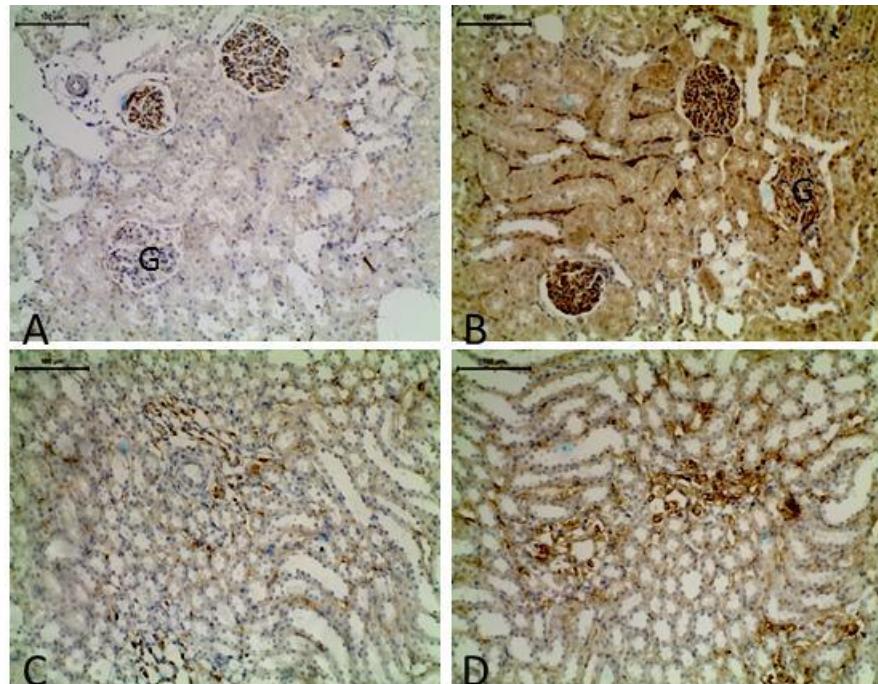
**Tabela 4.** Porcentagem Fibras Colágeno: Regiões Cortex e Medula

Grupos								Valor de p	
	3 SEMANAS		5 SEMANAS		7 SEMANAS		9 SEMANAS		
	HFD	Co	HFD	Co	HFD	Co	HFD	Co	
Área	6,79	5,70	8,60	6,23	7,04	3,60	8,86	5,17	<0,001
Colágeno	±0,616	±0,551	±0,551	±0,551	±0,551	±0,551	±0,616	±0,551	t=1,0
Cortex (%)									
Número de Animais	4	5	5	5	5	5	4	5	
Área	6,69	5,36	6,81	6,33	6,77	3,19	8,45	4,87	<0,001
Colágeno	±0,367	±0,329	±0,329	±0,329	±0,367	±0,367	±0,367	±0,329	t=1,0
Medula(%)									
Número de Animais	4	5	5	5	4	4	4	5	

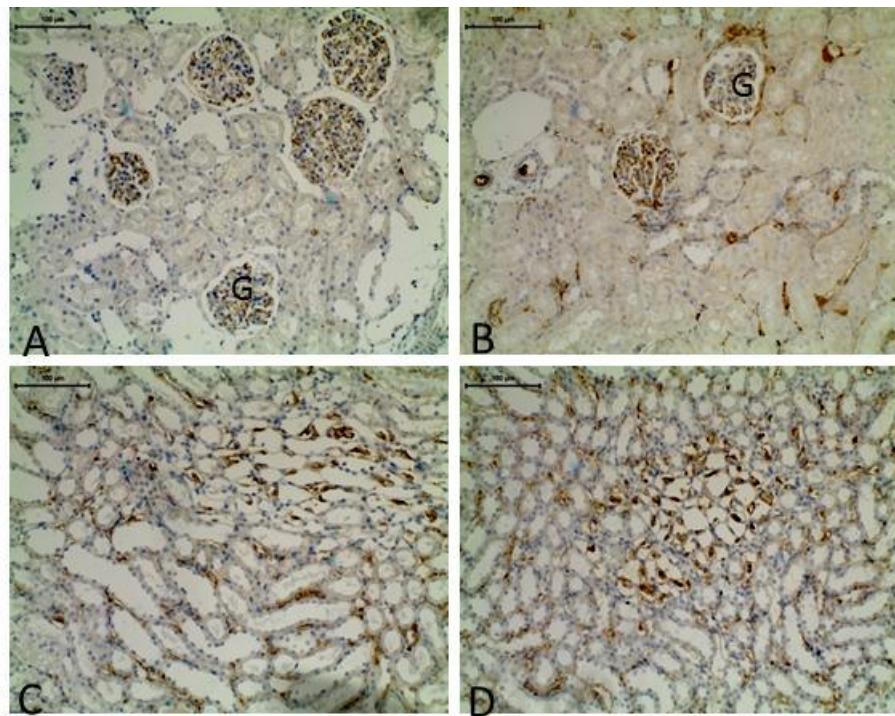
Resultados expressos em média± EPM.

#### **4.6. Imunoistoquímica**

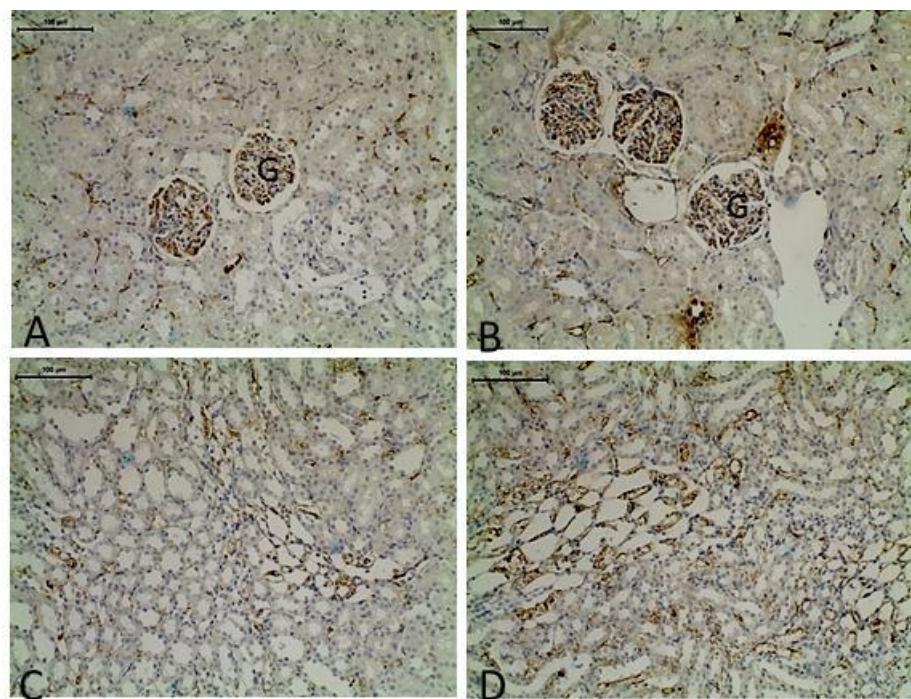
A análise das lâminas demonstrou que TGF $\beta$ -1 está localizado preferencialmente na matriz extracelular, tanto peritubular quanto mesangial, nos animais controle (Figura 14). Após 3 semanas de dieta hiperlipídica ocorreu aumento na imunoreatividade para TGF $\beta$ -1 em todo o tecido renal, tanto no córtex quanto na medula (Figura 14). Entretanto, após 5 (Figura 15) e 7 semanas (Figura 16) de dieta hiperlipídica não observamos aumento na imunomarcação deste fator de crescimento. Somente após 9 semanas de dieta é que a expressão aumentou novamente na região cortical (Figura 17).



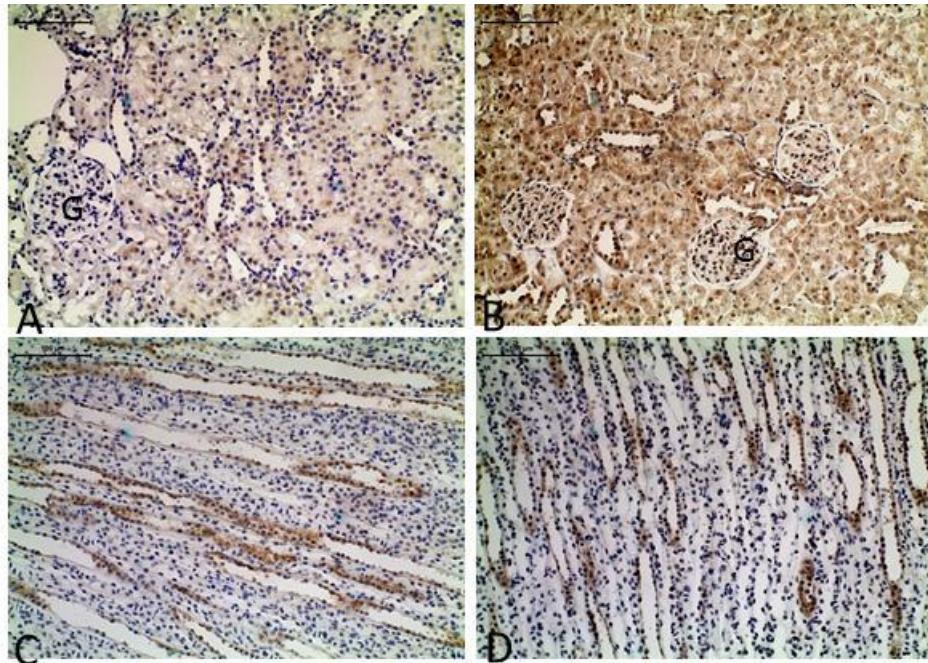
**Figura 14.** Imunomarcação para TGF $\beta$ -1 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co3 (A e C) e HFD3 (B e D). G: glomérulo.



**Figura 15.** Imunomarcação para TGF $\beta$ -1 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co5 (A e C) e HFD5 (B e D). G: glomérulo.

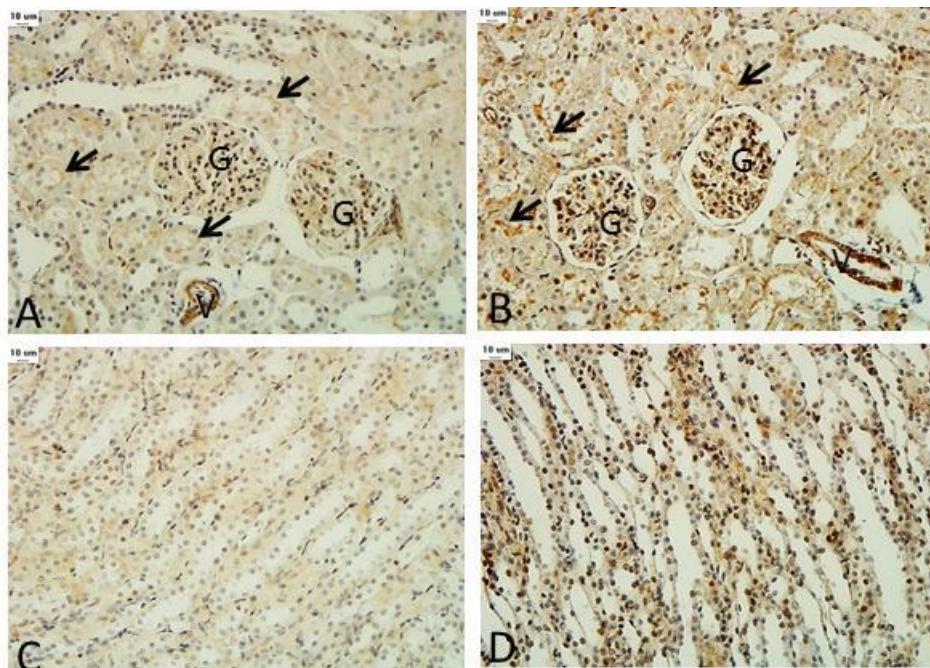


**Figura 16.** Imunomarcação para TGF $\beta$ -1 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co7 (A e C) e HFD7 (B e D). G: glomérulo.



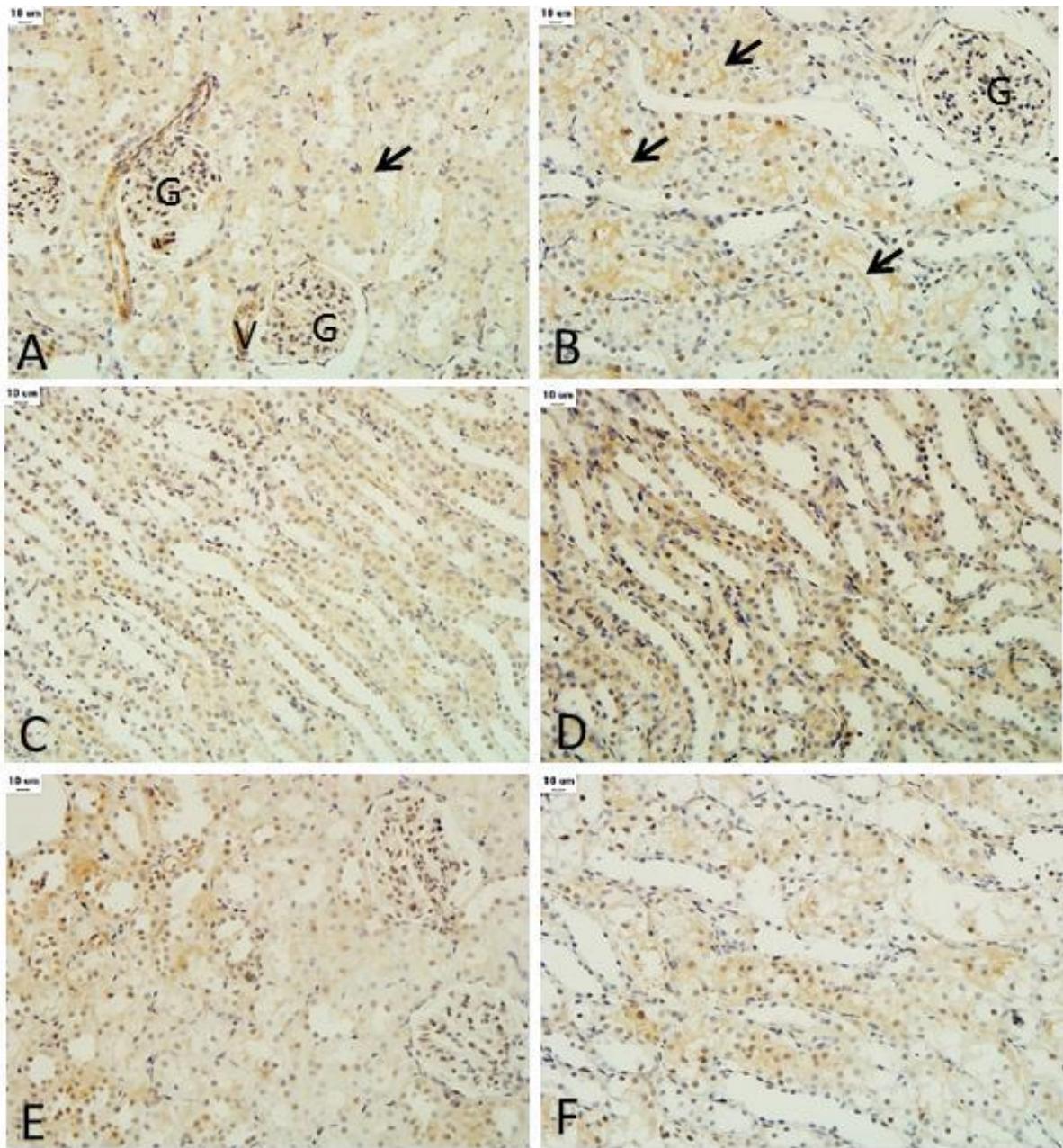
**Figura 17.** Imunomarcação para TGF $\beta$ -1 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co9 (A e C) e HFD9 (B e D). G: glomérulo.

Na porção cortical dos rins de animais do grupo Co3 a imunomarcação mais intensa do receptor AT1 foi verificada nas células glomerulares, na bordadura em escova das células do nefron proximal e nas paredes vasculares (Figura 18A). O mesmo padrão de distribuição foi verificado nos animais do grupo HFD3, entretanto a marcação foi mais intensa (Figura 18B). Este aumento de intensidade na imunomarcação também foi encontrado na porção medular comparativamente ao grupo Co3 (Figura 18C e D).



**Figura 18.** Imunomarcação para receptor AT1 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co3 (A e C) e HFD3 (B e D). G: glomérulo, V: vaso, Setas: bordadura em escova.

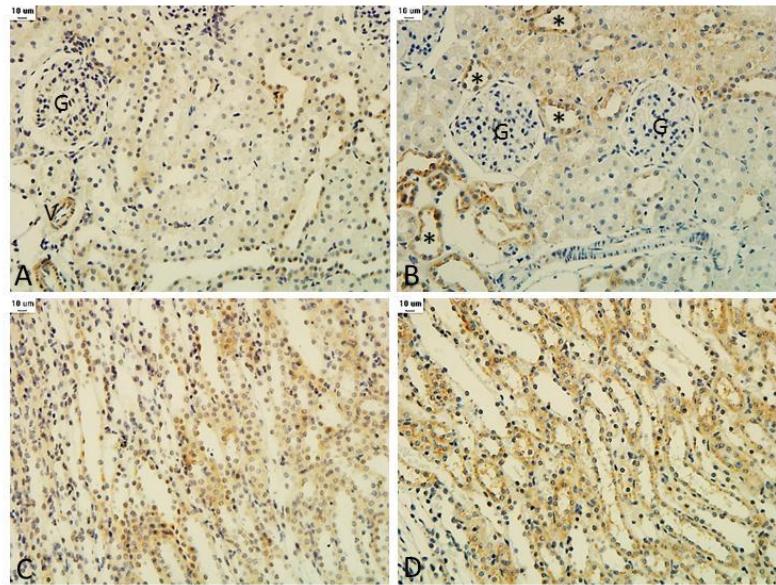
Na porção cortical dos rins de animais do grupo Co5 observamos o mesmo padrão de marcação observado nos animais do grupo Co3. Repare na figura 19A a localização citosólica dispersa nos epitélios tubulares. Nos animais do grupo HFD5 os receptores AT1 estão preferencialmente nos núcleos e na bordadura em escova dos segmentos proximais do néfron (Figura 19B). Na medular verificamos aumento na marcação do receptor AT1 (Figura 19C e D). Tanto na região cortical (Figura 19E) quanto na medular (Figura 19F) observamos áreas de necrose tubular onde a imunomarcação para receptores AT1 estava aumentada. A necrose foi caracterizada pela perda da citoarquitetura tecidual e presença de restos celulares na luz tubular.



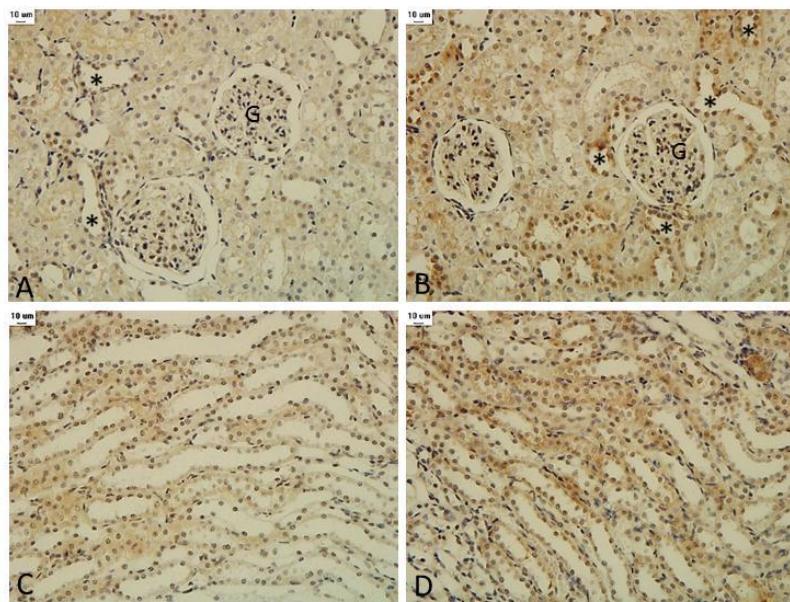
**Figura 19.** Imunomarcação para receptor AT1 no córtex (A, B e E) e na medula (C, D e F) renais de animais Co5 (A e C) e HFD5 (B e D). G: glomérulo, V: vaso, Setas: bordadura em escova.

Após 7 semanas de consumo de dieta hiperlipídica observamos aumento na marcação para receptor AT1 nos segmentos pós-proximais do néfron, tanto corticais quanto medulares, e redução nos glomérulos (Figura 20). Após 9

semanas de dieta hiperlipídica observamos aumento em todo tecido renal (Figura 21).

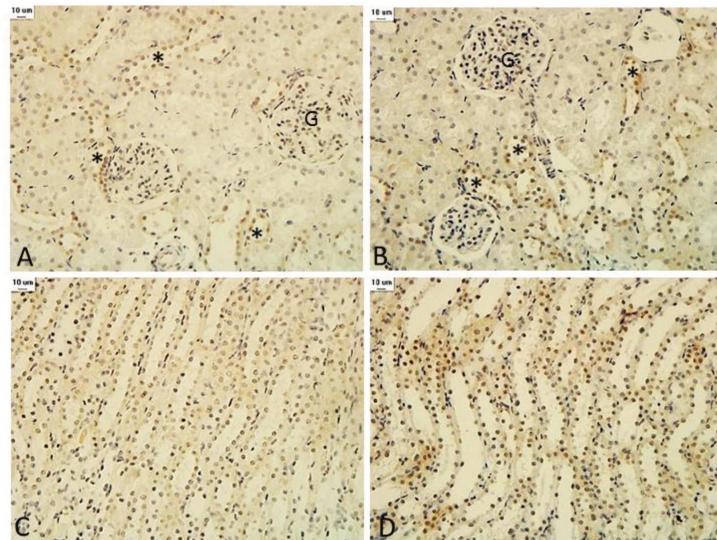


**Figura 20.** Imunomarcação para receptor AT1 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co7 (A e C) e HFD7 (B e D). G: glomérulo, asterisco: segmento pós-proximal.

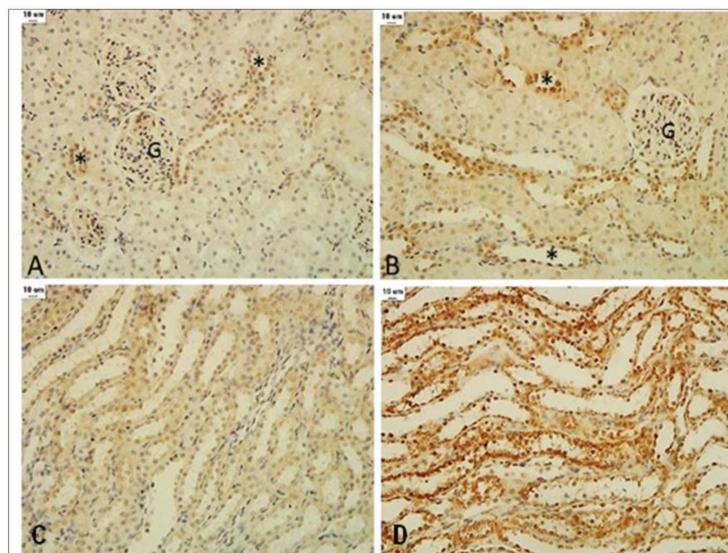


**Figura 21.** Imunomarcação para receptor AT1 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co9 (A e C) e HDF9 (B e D). G: glomérulo, asterisco: segmento pós-proximal.

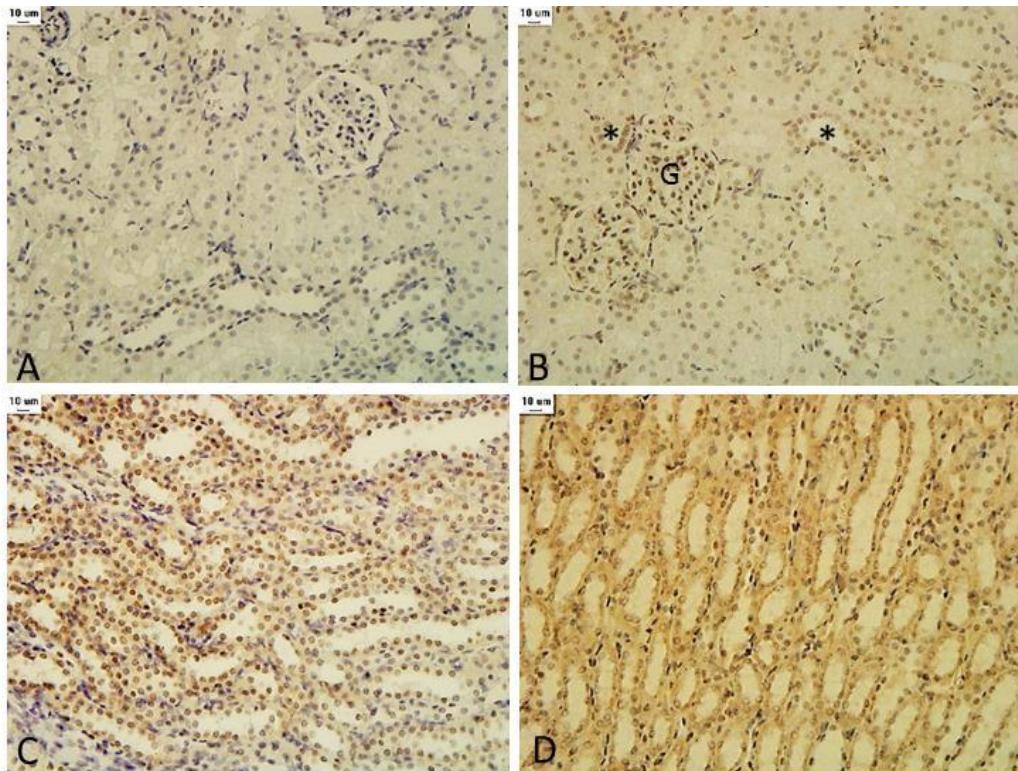
Pela imunomarcação verificamos que no rim o fator de transcrição ZEB2 localiza-se predominantemente nos núcleos de células do nefron pós-proximal e dos coletores e nos glomérulos (Figura 22A e C). Após 3 semanas de dieta hiperlipídica esta marcação foi maior, podendo ser melhor evidenciada na região medular (Figura 22C e D). Este aumento foi mais intenso após 5 semanas de dieta hiperlipídica (Figura 23)



**Figura 22.** Imunomarcação para ZEB2 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co3 (A e C) e HFD3 (B e D). G: glomérulo, asterisco: segmento pós-proximal.



**Figura 23.** Imunomarcação para ZEB2 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co5 (A e C) e HFD5 (B e D). G: glomérulo, asterisco: segmento pós-proximal.

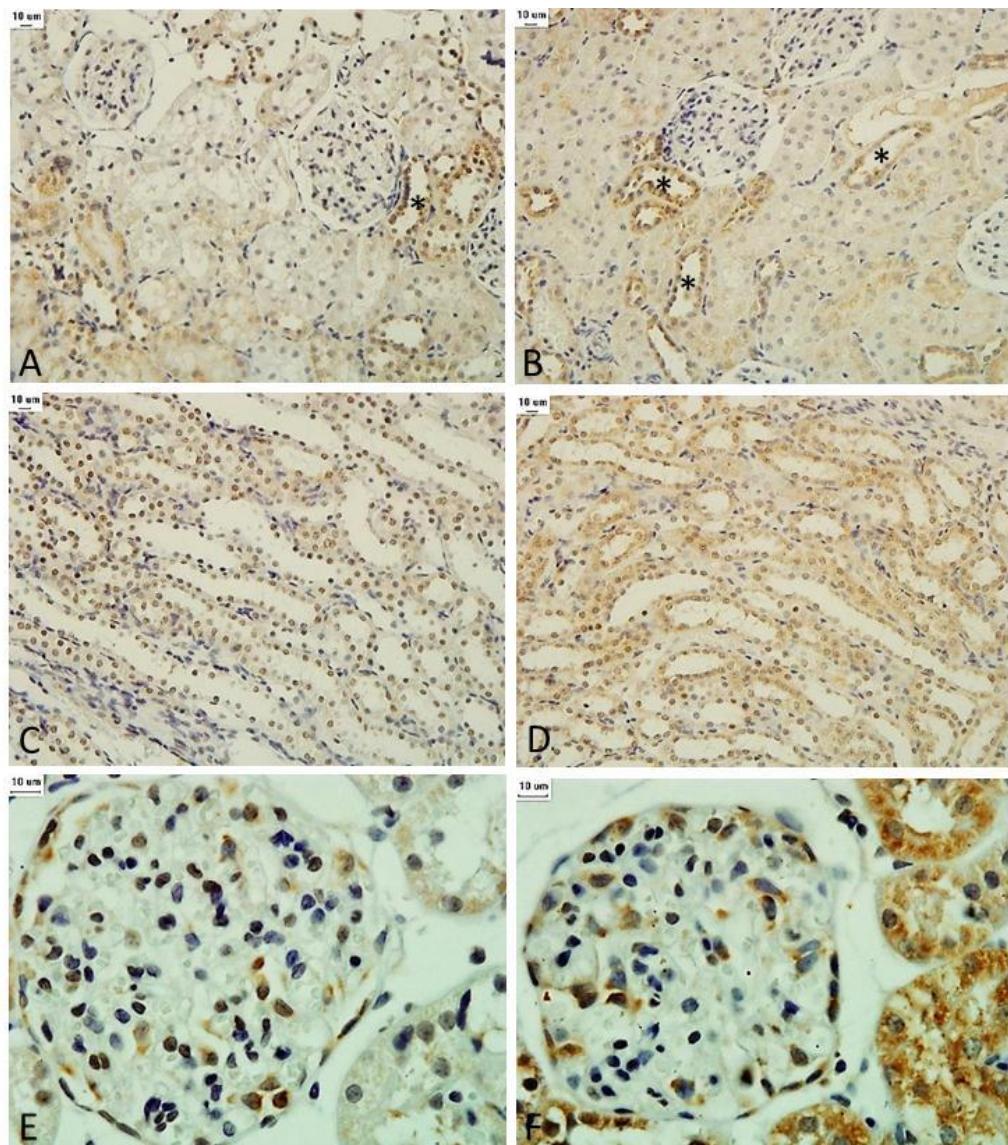


**Figura 24.** Imunomarcação para ZEB2 no córtex (A e B) e na medula (C e D) renais de animais Co7 (A e C) e HFD7 (B e D). G: glomérulo, asterisco: segmento pós-proximal.

O grupo HFD7 também apresentou aumento na expressão de ZEB2 tanto no citosol quanto nos núcleos das células renais (Figura 24). Já no grupo HFD9 não verificamos aumento de expressão de ZEB2 nos glomérulos (Figura 25A, B, E e F). Nos túbulos verificamos aumento de ZEB2 principalmente nos segmentos pós-proximais dos néfrons e nos coletores (Figura 25A-F).

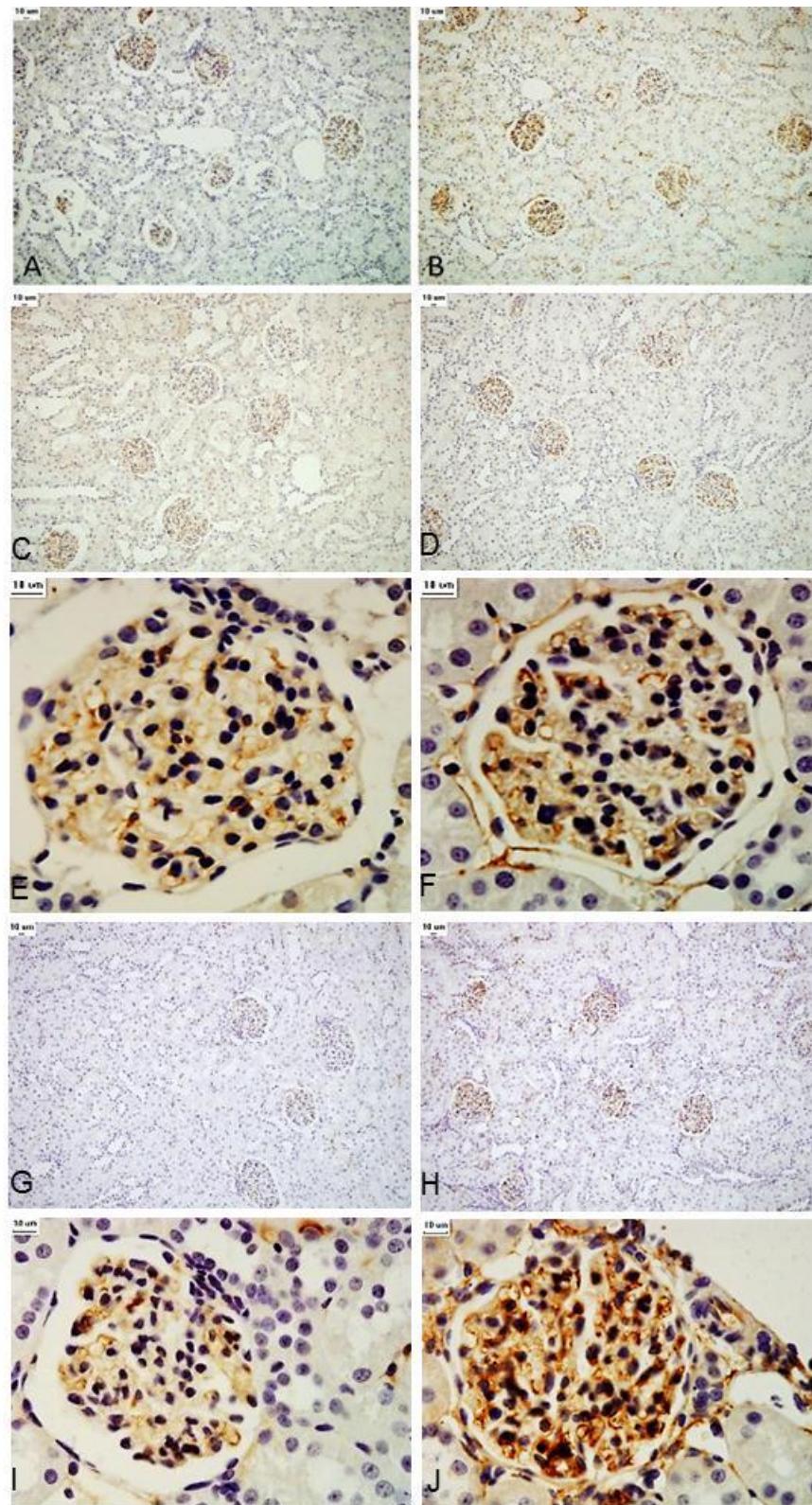
Nos animais do grupo Co (3, 5, 7 e 9 semanas) a fibronectina imunomarcada pode ser localizada na matriz peritubular e mais concetrada nos glomérulos renais (Figura 26). Após 3 e 5 semanas de dieta hiperlipídica observamos pequeno aumento na expressão desta proteína (Figura 26B e D). Já nos animais dos grupos HFD7 e 9 ocorreu aumento de expressão de fibronectina

(Figura 26E-J). Na figura 26, tanto em F quanto em J, repare que a fibronectina aparece na membrana de filtração glomerular ao redor dos capilares.

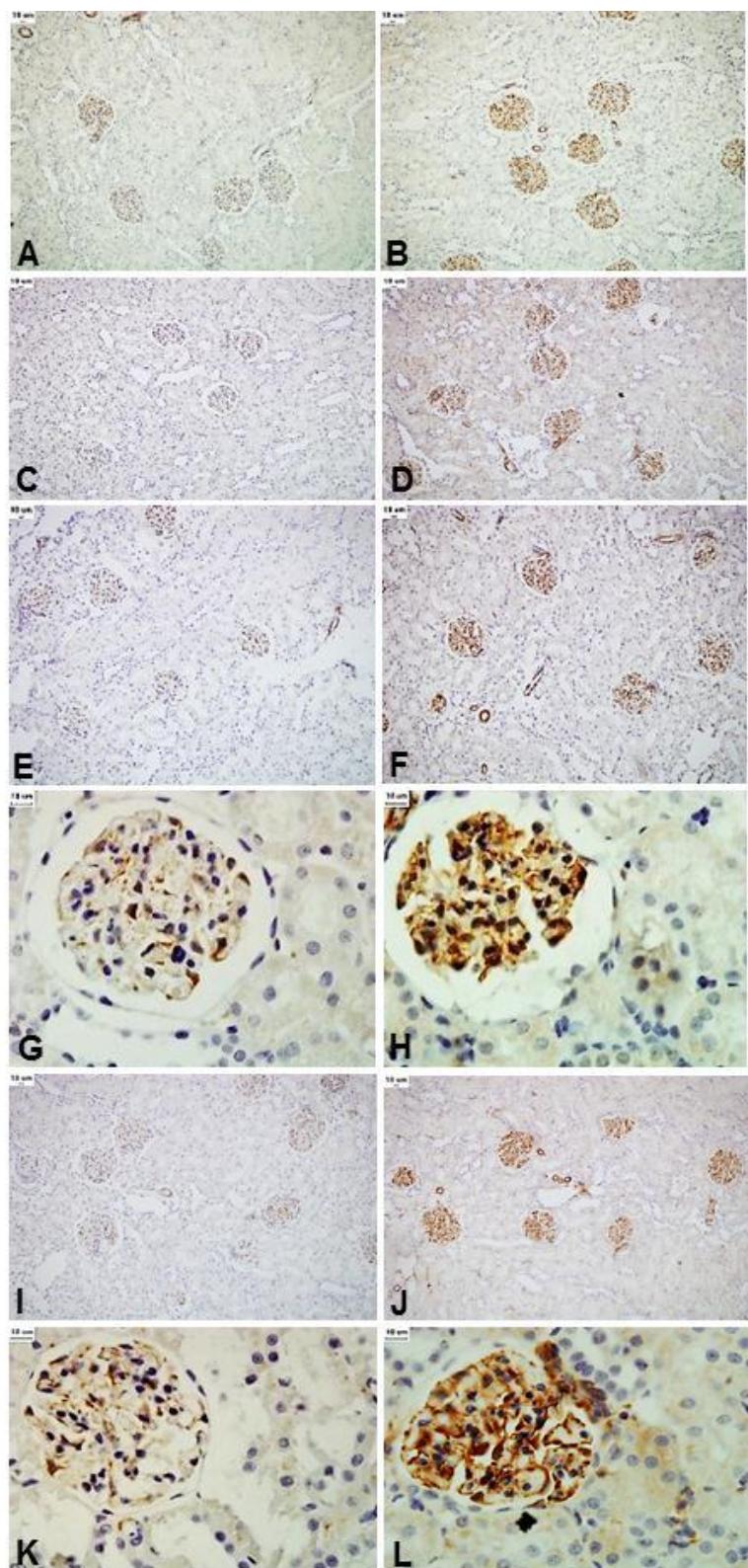


**Figura 25.** Imunomarcação para ZEB2 no córtex (A, B, E e F) e na medula (C e D) renais de animais Co9 (A e C) e HFD9 (B e D). G: glomérulo, asterisco: segmento pós-proximal.

Desmina é uma proteína do citoesqueleto presente nas células mesangiais e nas musculares lisas. Na figura 28 podemos observar a imunomarcação desta proteína em rins de animais do grupo Co. Em caso de lesão podocitária estas células passam a expressar desmina e, após todos os tempos estudados de dieta hiperlipídica, a expressão glomerular foi aumentada (Figura 27).



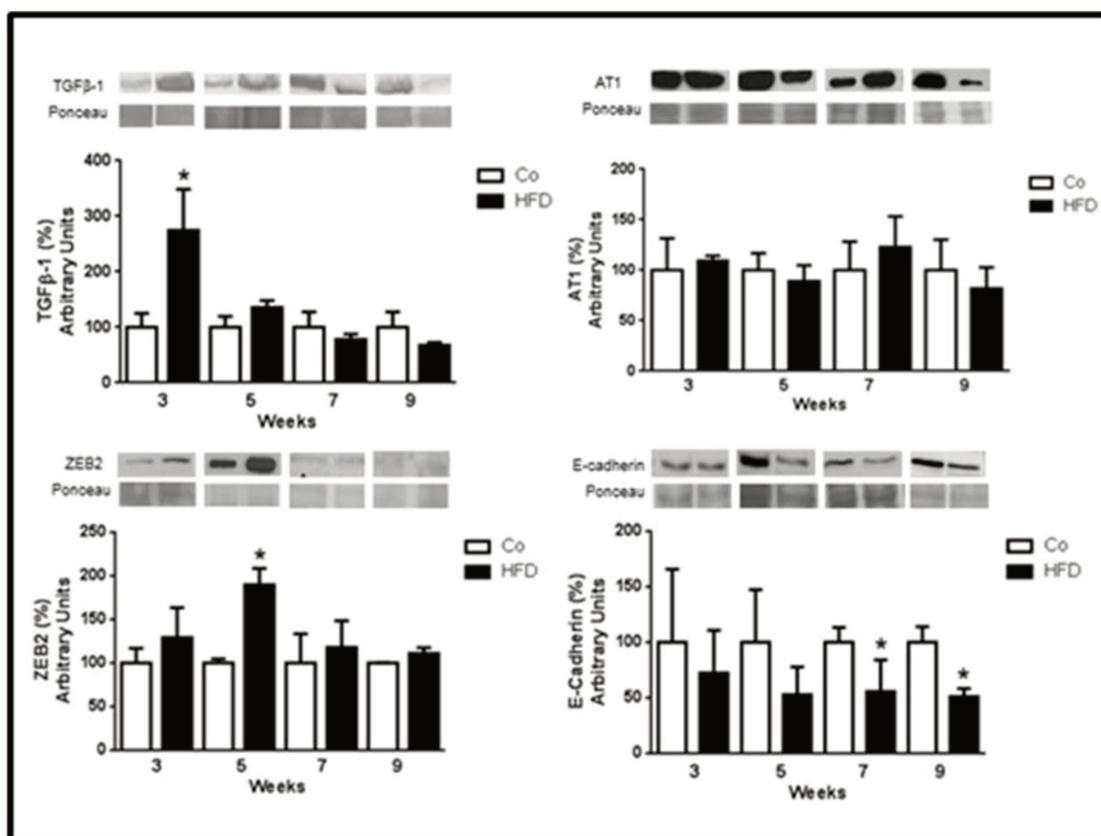
**Figura 26.** Imunomarcação para fibronectina no córtex renal de animais Co3 (A), Co5 (C), Co7 (E), Co9 (G e I), HFD3 (B), HFD5 (D), HFD7 (F), HFD9 (He J).



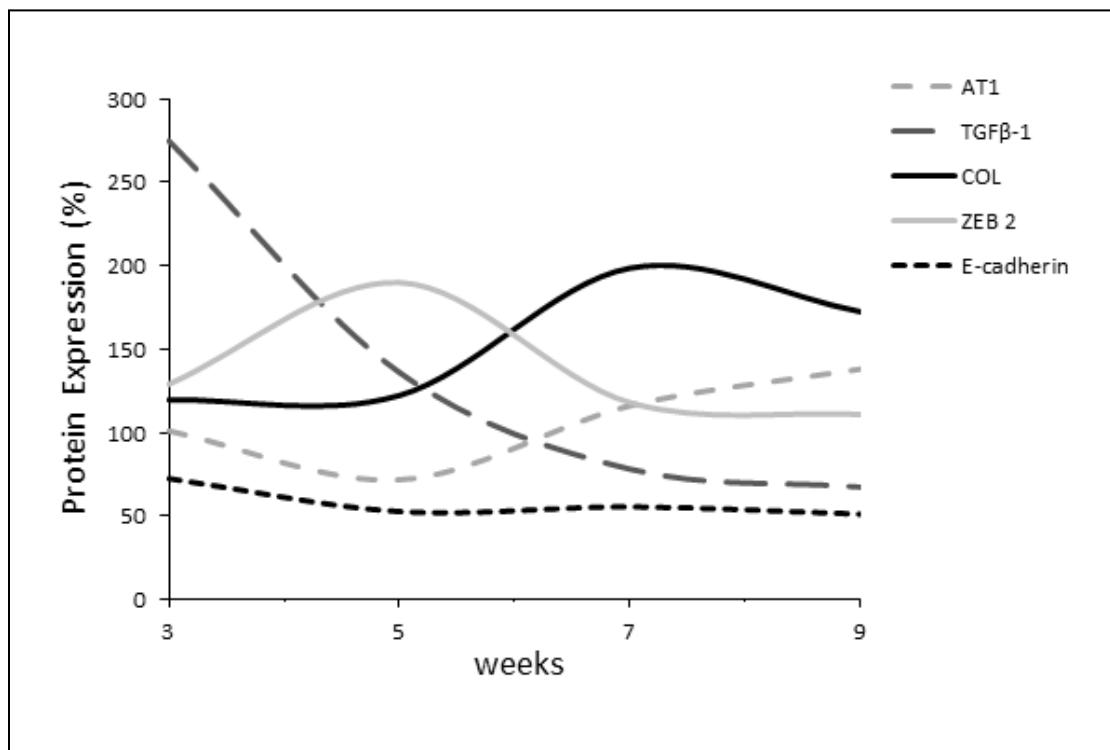
**Figura 27.** Imunomarcação para desmina no córtex renal de animais Co3 (A), Co5 (C), Co7 (E e G), Co9 (I e K), HFD3 (B), HFD5 (D), HFD7 (F e H), HFD9 (J e L).

#### 4.7. Western Blot

A análise semi-quantitativa pelo western blot confirmou a maioria dos resultados encontrados na imunohistoquímica. No grupo HFD a expressão renal de TGF $\beta$ -1 foi aumentada da terceira a quinta semana (174 e 35%, respectivamente) e foi reduzida da sétima a nona (22 e 33%, respectivamente) comparativamente aos grupos Co (Figuras 28 e 29). Contrariamente aos resultados da imunohistoquímica, não observamos alteração significativa na expressão do receptor AT1(Figuras 28 e 29). Comparativamente aos controles a expressão de ZEB2 foi aumentada em todos os tempos estudados mas a elevação só foi estatisticamente significativa no grupo HFD5( 90%) (Figuras 28 e 29). Contrariamente, a expressão de E-caderina foi reduzida nos animais HFD da 3<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> semana de dieta (28, 48, 45 e 50% respectivamente) comparativamente aos controles (Figuras 28 e 29).



**Figura 28.** Resultados das análises pelo Western blot da expressão de TGF $\beta$ -1, AT1, ZEB2 e E-caderina nos grupos HFD após 3, 5, 7 e 9 semanas comparativamente aos controles. Os resultados são representados pela média  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $P \leq 0,05$ .



**Figura 29.** Este gráfico representa uma visão geral das variações na expressão das diferentes proteínas avaliadas após 3, 5, 7 e 9 semanas de dieta hiperlipídica. Os valores obtidos para os respectivos controles foram considerados 100%.



# *5. Discussão*



## **5. Discussão**

Atualmente podemos observar mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares como sedentarismo e aumento da ingestão de alimentos hipercalóricos e ricos em gordura saturada. Essas mudanças são crescentes, principalmente em países ocidentais, e tornam-se preocupantes já que o sobrepeso e a obesidade são causas importantes de morbidades e mortalidade. Dentre as doenças relacionadas estão hipertensão, diabetes, doença renal crônica, glomeruloesclerose e litíase renal (Kopple & Feroze, 2011; Must, 1996; Praga & Morales, 2010; Stemmer *et al.*, 2012). O presente estudo abordou o efeito da dieta hiperlipídica na função renal e desenvolvimento de fibrose.

Nosso estudo demonstrou que a ingestão de dieta hiperlipídica, durante sete e nove semanas, provoca aumento significativo no peso corporal corroborando os resultados obtidos por Altunkaynak *et al.* (2008), Noeman *et al* (2011) e Townsend *et al* (2008). Recentemente Estrany *et al.* (2011), realizaram um estudo para avaliar, em ratos de ambos os sexos, o efeito da dieta hipercalórica durante 14 semanas de tratamento, sendo que os animais tratados apresentaram diferença significativa na menor quantidade ingerida da dieta hiperlipídica, porém maior consumo de calorias, comparado com os animais controle. Esses resultados referentes à quantidade da dieta ingerida *versus* calorias também foram verificados em nosso estudo.

Segundo WHO (World Health Organization, 1995), em humanos foram estabelecidos limites para diferenciar obesidade de sobrepeso, porém não encontramos na literatura tais limites para animais. No presente estudo, observamos que a dieta hiperlipídica promoveu aumento do peso corpóreo paralelamente ao aumento do índice de adiposidade, em animais que consumiram ração hiperlipídica durante cinco, sete e nove semanas. Nos estudos de Solomon *et al.* (2011) e Priego *et al.* (2008) foram encontrados resultados semelhantes ao nosso em relação ao índice de adiposidade e ao peso corpóreo. O índice de adiposidade foi calculado de acordo com outros estudos da literatura, usando a

soma dos depósitos de gordura dividido pelo peso corporal multiplicado por 100 (Fernandez *et al.*, 2011; Jeyakumar *et al.*, 2009).

Quanto ao peso renal não houve diferença significativa, resultado igualmente obtido em estudo realizado por Valente Gamba *et al.* (2001).

No estudo da função renal observamos que após nove semanas de dieta hiperlipídica, os animais apresentaram significativa redução na taxa de filtração glomerular, estimada pelo *clearance* de creatinina. Nossa análise imunoistoquímica demonstrou aumento de expressão de fibronectina na barreira de filtração glomerular e na expressão podocitária de desmina, um marcador de lesão destas células. Observamos ainda significativa perda de proteínas na urina, que resulta de lesão podocitária. Certamente a perda da função glomerular está relacionada aos achados estruturais e moleculares. Uma das causas para ocorrer a lesão podocitária é o aumento da hipertensão intraglomerular, ocasionando distensão do capilar, e assim, a lesão dos podócitos. A lesão podocitária pode ocorrer em casos de obesidade, hipertensão e/ou diabetes podendo resultar em insultos inflamatórios que são frequentemente envolvidos em danos glomerulares progressivos, induzindo a inflamações locais e fibrose (Durvasula *et al.* 2004; Shankland 2006; Wühl and Schaefer 2011). Observamos ainda, aumento na expressão glomerular de ZEB2, um indutor de EMT.

Outro resultado importante quanto à função renal foi a significativa redução na fração de excreção de sódio urinário. Embora não tenhamos resultados sobre a pressão arterial destes animais este resultado implica em aumento pressórico. A redução na excreção deste íons esteve relacionada ao aumento reabsortivo tanto no néfron próximo quanto no pós-proximal. Após 7 e 9 semanas de ingestão de dieta hipercalórica observamos aumento de receptores AT1 pós-proximais e, de certo, estes estão relacionados ao aumento na reabsorção de íons sódio nestes segmentos.

Segundo Wang *et al.* (2009), a obesidade induzida por uma dieta rica em lipídios aumenta a expressão de um fator transcricional (SREBP-1), que tem a função de acúmulo de lipídios no tecido renal, além de aumentar a atividade de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento profibróticos. Um dos fatores

de crescimento tido como indutor de fibrose renal é o TGF- $\beta$ 1, que pode levar à doença renal crônica (Border and Noble 1994). Na figura 14 e 15, que se refere a imunistoquímica para TGF- $\beta$ 1, pode-se observar aumento expressivo na marcação após três semanas de tratamento quando comparados com o grupo controle. Essa marcação foi mais visível na região glomerular (cortical) e entre os tubulos (medular). Na região glomerular visualizada, pode ocorrer a lesão ou apoptose dos podócitos pela hipertensão dos capilares glomerulares. Segundo Schiffer *et al.* (2001), o TGF- $\beta$ 1 está associado ao aumento da tensão capilar através de vários mecanismos incluindo acumulo de matriz extracelular e hipertrofia celular, entre outros, podendo ocasionar glomeruloescleroze focal e segmentar caracterizada pela morte podocitária. O receptor AT1 também é responsável por mediar efeitos deletérios da angiotensina II, e esta tem demonstrado ter o papel de apoptose podocitária (Durvasula *et al.*, 2004). Conforme já citamos, o TGF $\beta$ -1 é um indutor da fibrose renal, que leva à produção de proteínas da matriz extra celular (MEC) incluindo fibronectina e colágeno e inibe a degradação destas. O colágeno é um componente importante da MEC no rim, sendo que o colágeno tipo 1 é produzido por células mesangiais e seu aumento está relacionado às doenças renais (Kim *et al.*, 2012; Vu, 2000). Na análise morfométrica realizada pela coloração de picrossírius, para quantificação da área ocupada por colágeno, observamos valores significativamente maiores tanto na região cortical (cinco, sete e nove semanas de tratamento) quanto medular (três, sete e nove semanas de tratamento), quando comparado aos controles, podendo demonstrar lesão inflamatória em processo avançado ou até fibrose. Em estudo realizado em roedores, cujas mães se alimentam com ração hiperlipídica durante a lactação e, após o desmame, a dieta foi continua na prole observou-se lesão podocitária e fibrose túbulo intersticial nestes animais na vida adulta (Jackson *et al.*, 2012). Henegar *et al.* (2001), verificaram que cachorros que consumiram ração hiperlipídica por sete semanas apresentaram aumento da matriz mesangial e espessamento da membrana basal glomerular e tubular, demonstrando alterações renais estruturais e funcionais em estágios iniciais da obesidade.

Nossos resultados nos permitem supor que a dieta hiperlipídica durante 3 e 5 semanas leva ao aumento de TGF $\beta$ -1 levando ao aumento na expressão de ZEB2 e contenção da síntese de colágeno e E-caderina. Após 7 semanas temos redução na expressão de TGF $\beta$ 1 e, consequentemente, de ZEB2 permitindo aumento da expressão do gene para colágeno (Figura 28).

Nossos resultados nos permitem concluir que a dieta hiperlipídica em ratas produz efeitos deletérios aos rins a partir da 3<sup>a</sup> semana de consumo que são agravados em tempos maiores de exposição desencadeando alterações funcionais, inflamatórias e pró-fibróticas.

# *6. Conclusão*



## **6. Conclusão**

A partir dos nossos resultados podemos concluir que, em ratas Wistar, o consumo de dieta hiperlipídica provoca:

- Aumento significativo do peso corporal e do índice de adiposidade após 5 e 9 semanas;
- Após 9 semanas, redução significativa na taxa de filtração glomerular, na fração de excreção de sódio , devido a redução na excreção deste íon tanto pelo nefron proximal quanto pelo pós-proximal, e na fração de excreção de potássio;
- Proteinúria, somente após 9 semanas de ingestão de dieta;
- Grande aumento na expressão renal de TGF $\beta$ -1, na terceira semana, com gradativa redução nos tempos avaliados posteriormente;
- Aumento na expressão renal de ZEB2, a partir da terceira semana, que se intensificou na quinta semana;
- Aumento no conteúdo renal de colágeno, a partir da terceira semana, que se intensificou a partir da sétima semana;
- Redução na expressão renal de E-caderina a partir da terceira semana;
- Aumento na imunorreatividade glomerular de fibronectina e desmina intensificado após a sétima semana.

Assim, concluímos que, no modelo experimental utilizado, o consumo de dieta hiperlipídica provoca alterações renais compatíveis com processo de fibrose e EMT que levam ao comprometimento funcional deste órgão.



# *7. Referências*



## **7. Referências**

- Al-Rejaie SS, Abuhashish HM, Alkhamees OA, Aleisa AM, Alroujayee AS. Gender difference following high cholesterol diet induced renal injury and the protective role of rutin and ascorbic acid combination in Wistar albino rats. *Lipids Health Dis.* 2012; 16:11-41.
- Altunkaynak ME, Ozbek E, Altunkaynak BZ, Can I, Unal D, Unal B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *Journal of anatomy.* 2008; 212(6):845-52.
- Associação Brasileira para estudo da obesidade e síndrome metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. São Paulo, 2009.
- Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 2011;10:819-828.
- Bobulescu IA, Dubree M, Zhang J, McLero YP, Moe OW. Effect of renal lipid accumulation on proximal tubule  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and ammonium secretion. *Am. J. Physiol. Renal.* 2008;294:1315-1322.
- Bobulescu IA. Renal lipid metabolism and lipotoxicity. *Curr. Opin.Nephrol. Hypertens.* 2010;19:393-402.
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331:1286–1292.
- Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010;7:195-203.
- Carvajal G, Rodriguez-Vita J, Rodrigues-Diez R, Sanchez-Lopez E, Ruperez M, Cartier C, et al. Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int.* 2008;74: 585–595.

Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. Am J Pathol 2003; 162: 1937–1949.

Cindik N, Baskin E, Agras PI, Kinik ST, Turan M, Saatci U. Effect of obesity on inflammatory markers and renal functions. Acta Pediatr. 2005;94: 1732-1737.

Da Silva, L., Nascimento Gomes, G., & Zaladek Gil, F. Effects of dietary lipids on renal function of aged rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica*. 2001; 34(2): 265-9.

Daniels D, Yee DK, Fluharty SJ. Angiotensin II receptor signalling. Exp Physiol. 2007, 92: 523–527.

Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. Kidney internationa.2004; 65(1):30-9.

Eddy AA. Neilson EG: Chronic kidney disease progression. J Am Soc Nephrol.2006; 17: 2964–2966.

Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E- cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. Oncogene 2005; 24: 2375-2385.

Estrany ME, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M. Isocaloric intake of a high-fat diet modifies adiposity and lipid handling in a sex dependent manner in rats. *Lipids in health and disease*. 2011;10(1): 52. BioMed Central Ltd.

Fernandez CDB, Bellentani, F. F., Fernandes, G. S. A, Perobelli, J. E., Favareto, A. P. A, Nascimento, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. Reproductive biology and endocrinology. 2011; 9(1): 32. BioMed Central Ltd.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980, systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011; 377:557-567.

Guedes, AM, Cabrita A, Pinho AT, Silva AP, Lopes A, Santos V, et al. O risco renal da obesidade. *Acta Med Port*. 2010; 23:853-858.

Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med*. 2006;57:365–380.

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005 366,1197-1209.

Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK., Tyagi SC, Hall JE. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *Journal of the American Society of Nephrology*.2001; 12(6):1211-7.

Hertig A, Anglicheau D, Verine J, PalleT N, Touzot M, Ancel PY. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19:1584–1591.

Higuchi S; Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD. Eguchi, S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: Novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)*. 2007, 112:417–428.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002;110:341–350, 2002

Jackson CM, Alexander BT, Roach L, Haggerty D, Marbury DC, Hutchens Z M, et al. Exposure to maternal overnutrition and a high-fat diet during early postnatal

development increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. American Journal of Physiology, Renal Physiology. 2012;302(6): 774-83.

Jeyakumar SM, Lopamudra P, Padmini S, Balakrishna N, Giridharan NV, Vajreswari A. Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rat strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob. Nutrition & metabolism. 2009; 6: 27.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picosirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue sections. J Histochem. 1979;11:447–455.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. J Clin Invest. 1994;93:2431–2437.

Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. Kidney International. 2001;59:1498-1509.

Kato M, Wang L, Putta S, Wang M, Yuan H, Sun G, Lanting L, Todorov I, Rossi JJ, Natarajan R. Posttranscriptional upregulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF-{beta}-induced collagen expression in kidney cells. J Biol Chem 2010; 285: 34004–34015.

Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, Natarajan R. microRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta- induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104: 3432-3437.

Kim SI, Na HJ, Ding Y, Wang Z, Lee SJ, Choi ME. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1. The Journal of biological chemistry. 2012;287(15):11677-88.

Kimura K, Iwano M. Molecular mechanisms of tissue fibrosis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2009;32:160–167.

Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26:141–146.

Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in Spontaneously Hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension.* 2008;51:352-359.

Kopple JD, FEROZE U. The effect of obesity on chronic kidney disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation.* 2011;21(1): 66-71

Kume, S. et al. Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008;18: 2715-2723.

Lacorte LM, Seiva FRF, Rinaldi JC, Delella FK, Moroz A, Sarobo C, et al. Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis. *Reproductive toxicology,* 2012.

Lan HY, Mu W, Tomita N, Huang XR, Li JH, Zhu HJ, et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1535–1548.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:137–161.

Lin J, Judd S, Le A, Ard J, Newsome BB, Howard G, et al. Associations of dietary fat with albuminuria and kidney dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:897-904.

Liu Y. New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephro* 2010; 21: 212–222.

Liu Y., Wang Z, Yin W, Li Q, Cai M, Zhang C, Xiao J, et al. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat / high-sucrose / high-cholesterol diet. *2007;56(1)11-20.*

Liu BC, Sun J, Chen Q, Ma KL, Ruan XZ, Phillips AO. Role of connective tissue growth factor in mediating hypertrophy of human proximal tubular cells induced by angiotensin II. Am J Nephrol. 2003;23:429–437.

Mezzano AS, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension. 2001;38:635–638.

Montell, E. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. Am J Physiol

Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. Lancet. 1982 Dec 11;2:1309-11.

Murray D, Precht P, Balakir R, Horton WEJr. The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes. J Biol Chem 2000; 275: 3610– 3618.

Must A. Morbidity and mortality associated with elevated body weight in children and adolescents. The American Journal of Clinical Nutrition. 1996;63(3):445-447.

Neilson EG. Mechanisms of disease: Fibroblasts - a new look at an old problem. Nat Clin Pract Nephrol. 2006;2:101-108.

Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. Kidney Int 1998; 54: 864-876.

Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;2:155-166.

Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biomechanical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. Diabetology and Metabolic Syndrome. 2011;3(1):17.

Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21<sup>st</sup> century. *N Engl J Med.* 2005;352:1138-1145.

Oppermann M, Gess B, Schweda F, Castrop H. Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:468-477.

Pape L, Mengel M, Offner M, Melter M, Ehrich JHH, Strehlau J. Renal arterial resistance index and computerized quantification of fibrosis as a combined predictive tool in chronic allograft nephrology. *Pediatric Transplantation.* 2004;8(6):565-70.

Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE. expression of transforming growth factor-beta and type iv collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 473–480.

Parker DR. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the normative aging study. *Am J Clin Nutr.* 1993;58(2):129-136.

Paula RB, Fernandes N, Carmo VMP, Andrade LCF, Bastos MG. Obesidade e Doença renal crônica. *J. Bras. Nefrol.* 2006;28(3):158-164.

Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, Lancha AH. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes, Metabolics Syndrme and Obesity: targets and therapy.* 2012;5:75-87.

Perico N, Benign IA, Remuzzi G. Present and future drug treatments for chronic kidneys disease: envolving targets in renoprotection. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:936-953.

Ponticos M, Partridge T, Black CM, Abraham DJ, Bou-Gharios G. Regulation of collagen type i in vascular smooth muscle cells by competition between nkx2.5 and deltaef1/zeb1. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 6151–6161.

Praga M, Morales E. Obesity-related renal damage: changing diet to avoid progression. *Kidney International*. 2010;78(7):633-5.

Priego T, Sanchez J, Pico C, Palou A. Sex-differential expression of metabolism-related genes in response to a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring Md)*. 2008;16(4):819-26.

Quaggin ES, Kapus A. scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Intern*. 2011; 80:41-50.

Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'antonio G, Grillo C, Grillo P, et al. epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney intern*. 2002; 62: 137–146.

Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7667- 7669.

Roberts AB. Molecular and cell biology of tgf-beta. *Miner electrolyte metab*. 1998;24:111–119.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry* 2010; 401: 318–320

Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med*. 2010;152:159-166.

Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int*. 1997;52:1497-1510.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10:321-329.

Runyan CE, Hayashida T, Hubchak S, Curley JF, Schnaper HW. Role of sara (smad anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype. *J Biol Chem* 2009;284:25181-25189.

Ruster C, Bondeva I, Franke S, Tanaka N, Yamamoto H, Wol FG. Angiotensin II upregulates RAGE expression on podocytes: role of AT2 receptors. *Am J Nephrol*. 2009;29:538-550.

Ruster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(7):1189-99.

Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2985-2991.

Sakai N, Wada I, Matsushima K, Bucala R, Iwai M, Hortuchi M, et al. The renin – angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens*. 2008;26:780-790.

Sakhaee K. Recent Advances in the pathophysiology of nephrolithiasis. *Kidney International*. 2009;75:585-595.

Sanchez-Lopez E, Rodrigues DR, Rodriguez VJ, Rayego MS, Rodrigues DRR, Rodriguez GE, et al. Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage. *Nefrologia*. 2009;29:382-391.

Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, Ten Dijke P, Mundel P, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and Smad7. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(6): 807-816.

Sekido R, Murai K, Funahashi J, Kamachi Y, Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Kondoh H. The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5692- 5700.

Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International*. 2006;69(12):2131-47.

Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor beta in kidney diseases. Am J Physiol.1994;266:829-842.

Solomon MB, Jankord R, Flak JN, Herman JP. Chronic stress, energy balance and adiposity in female rats. Phisiol. and Behav.2011;102(1):84-90.

Stemmer K, Perez-Tilve D, Ananthakrishnan G, Bort A, Seeley RJ, Tschöp MH, et al. High-fat-diet-induced obesity causes an inflammatory and tumor-promoting microenvironment in the rat kidney. Diseases models & mechanisms. 2012;1-9.

Strutz F, Okada H, Lo C.W., Danoff T, Carone R.L., Tomaszewski J.E. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. J Cell Biol 1995; 130: 393-405.

Townsend KL, Lorenzi MM, Widmaier EP. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. Endoc. 2008; 33:176–188.

Tsai RY, Kittappa R, McKay RD. Plasticity, niches, and the use of stem cells. Dev Cell 2002; 2: 707–712.

Valente Gamba, C., Zeraib Caraviello, a, Matsushita, a, Alves, G. M., Nunes Da Silva, L., Nascimento Gomes, G., & Zaladek Gil, F. Effects of dietary lipids on renal function of aged rats. *Brazilian journal of medical and biological research*.2001; 34(2), 265-9.

Van-Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. Physiology & Behavior. 2008; 94(2):231-241.

Verschueren K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, et al. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. J Biol Chem.1999; 274: 20489-20498.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development*. 2000;14:2123–2133.

Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Choi PCL, Chow KM, Li PKT, Szeto CC. Intrarenal expression of miRNAs in Patients with hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertension* 2010; 23: 78-84.

Wang G, Kwan BC, Lai FM, Choi PC, Chow KM, Li PK, Szeto CC. Intrarenal expression of miRNAs in patients with hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens*. 2010;23(1):78-84.

Wang S, Skorczewski J, Feng X, Mei L, Murphy-Ullrich JE. Glucose up- regulates thrombospondin 1 gene transcription and transforming growth factor- beta activity through antagonism of cGMP-dependent protein kinase repression via upstream stimulatory factor 2. *J Biol Chem* 2004; 279: 34311-34322.

Wang T, Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol*. 1996;271(1):143-9

Wang XX, Jiang T, Shen Y, Adorini L, Pruzanski M, Frank J, et al. The farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism and diet-induced renal inflammation, fibrosis, and proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009; 297:1587-1596.

Weigert C, Brodbeck K, Sawadogo M, Häring HU, Schleicher ED. Upstream stimulatory factor (USF) proteins induce human TGF-beta1 gene activation via the glucose-response element-1013/-1002 in mesangial cells: up-regulation of USF activity by the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 15908–15915.

Wenzel U. Aldosterone and progression of renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008; 17(1):44-50.

Wenzel U. The angiotensin II type 2 receptor in renal disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010;11:37-41.

WHO- World Health Organization. Who- Phisical status the use and interpretation of antromometry. Geneva. 1995.

Willis BC, Borok Z. TGF-beta induced EMT:mechanisms and implications for fibrotic lung disease, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;293(3):525-34.

Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. Am J Physiol. 1990;259(5):768-77.

Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. Am J Pathol. 1992;140(1):95-107.

Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. J Clin Invest. 1993;92(3):1366-72.

Wolf G, Zahner G, Schroeder R, Stahl RA. Transforming growth factor beta mediates the angiotensin-II-induced stimulation of collagen type IV synthesis in cultured murine proximal tubular cells. Nephrol Dial Transplant. 1996;11(2):263-9.

Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. J Mol Med. 1999;77(7):556-64.

Wolf G, Ziyadeh FN, Zahner G, Stahl RA. Angiotensin II-stimulated expression of transforming growth factor beta in renal proximal tubular cells: attenuation after stable transfection with the c-mas oncogene. Kidney Int. 1995;48(6):1818-27.

Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. Cell Regul. 1991;2(3):219-27.

Wolf G. Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury. Nephrol Dial Transplant. 2000;15(6):61-3.

Wühl E, Schaefer F. Managing kidney disease with blood-pressure control. *Nat Rev Nephrol*. 2011;21;7(8):434-44.

Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 1814–1818.

Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 1465-1475.

Zavadil J, Bottinger EP. TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774.

Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119:1429-1437.

Zeisberg M, Neilson EG: Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 21: 1819-1834, 2010.

Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8015–8020



# *8. Apêndices*



# **Kidney time-course morphological and functional disorders induced by long-term high fat diet intake in female rats**

**Short title: Kidney disorders and high fat diet intake**

**Carolina Staut Pinhal<sup>1</sup>, Agnes Lopes<sup>1</sup>, Daniele Bráz Torres<sup>1</sup>, Sergio Luis Felisbino<sup>2</sup>, José Antônio Rocha Gontijo<sup>1</sup> and Patrícia Aline Boer<sup>3</sup>.**

**<sup>1</sup> Renal Function Laboratory, Campinas State University, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil**

**<sup>2</sup>Laboratory of Extracellular Matrix, Morphology Department, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil**

**<sup>3</sup> Fetal Programming Laboratory, Morphology Department, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil**

**Correspondence.** Patricia Aline Boer, Ph.D., Morphology Department, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil. E-mail: boer@ibb.unesp.br

**Conflict of interest:** We affirm that there is no conflict of interest

## ABSTRACT

**Background.** Evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of high fat diet (HFD) on kidney morphology and function disorders. **Methods.** The present study was performed in 3, 5, 7 and 9 week-old HFD female rats compared to appropriated gender and age-matched animals evaluating the kidney expression of AngII receptor and fibrotic and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers, by immunoblotting, immunohistochemical and histological techniques, in parallel with kidney function. **Results.** In the current study, the time-course HFD-treated group showed, by immunoblotting and immunohistochemical analysis, a significant early time-course increase in the expression of TGF $\beta$ -1 in the entire kidney of HFD-treated rats, compared to that observed in control group. Simultaneously, the study shows a transient increase in the expression of ZEB2 in HFD whole kidney accompanied by fall in the E-cadherin expression and increased collagen and fibronectin deposition. Also demonstrated a pronounced decrease in fractional urinary sodium excretion in long-term HFD-treated rats. The decreased FE<sub>Na+</sub> was accompanied by a fall in FEP<sub>Na<sup>+</sup></sub> and FEPP<sub>Na<sup>+</sup></sub> and occurred associated with significant decreased C<sub>Cr</sub> and, certainly on the sodium filtered load. The reduction in the glomerular filtration rate occurred in parallel to proteinuria and glomerular desmin overexpression. **Conclusion.** In conclusion, from our present knowledge, these are the first showing that long-term HFD intake, enhance the susceptibility for adult renal disease and increased renal collagen expression and, subsequently should cause tubular and glomeruli EMT and renal failure at later time points in rats.

**Keywords:** High fat diet, kidney fibrosis, renal function, TGF $\beta$ -1, epithelial-to-mesenchymal transition.

## INTRODUCTION

Worldwide epidemiological study recently showed that near to 1460 million adult people were overweight, body mass index (BMI) above to 25 and, 502 million were considered obese with BMI above to 30 [1]. Obesity, a public health problem of the first order for industrialized and non-industrialized countries dramatically cause a reduction in overall life expectancy [2]. The prevalence of obesity in different populations is related to environmental factors, such as reduced physical activity and diet, mainly. Nowadays, with growing industrialization and modern lifestyle, the access to high fat and carbohydrate diets has changed the eating habits of the population. These aspects interact with genetic factors, which may explain the excessive body fat throughout the world [3]. The obesity and the high fat diet (HFD) intake are related to increased prevalence of cardiovascular disease, dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus, Alzheimer's disease, chronic kidney disease and certain cancers [4-8].

Wang et al. [9] correlated, at first time, the consumption of high fat diet with decreased glomerular filtration rate, increased blood pressure, increased concentrations of plasma creatinine and enhanced tubule reabsorption of sodium. An early hypothesis to delineate the lipid nephrotoxicity was made for Moorhead et al. [10] proposing that dyslipidemia may contribute to the progression of renal disease. Lately animal study using normotensive and spontaneously hypertensive rats showed that the high fat diet causes changes on kidney function, that beginning with inflammatory response followed by endothelial dysfunction, with rupture of the renal filtration barrier [11] and proteinuria [12].

However, the most of pathophysiology mechanisms and humoral factors involved in the excessive fat ingestion and obesity on kidney disorders remain not well known. By the way, transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) is a key regulator of extracellular matrix (ECM) protein deposition in renal tissue [13]. Podocyte increased expression of TGF- $\beta$  mRNA and glomeruli ECM protein deposition have been associated to focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) [14], membranous nephropathy [15,16] and diabetic nephropathy [17] Renal TGF $\beta$ -1 expression is implicated in the pathogenesis

of fibrosis in both glomerular and interstitial compartments [19,19]. Additionally, TGF $\beta$ -1 inhibits the expression of ZEB1/2, widely recognized E-box repressors of genes such as E-cadherin [20-24]. It is clear that well-described phenomenon of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) type II plays pivotal role in organ fibrosis progression (25). EMT describes phonotypical changes in epithelial cells that lose their defined cell-cell and cell-basement membrane contacts and their structural polarity to become spindle-shaped and morphologically similar to mesenchymal/myofibroblast cells [26-28].

Also, the classical vasoactive view of angiotensin II (AngII) action has been extended due to its properties as cytokine that actively participates in the renal physiopathology [29-31]. On this way, has been demonstrated that AngII stimulates the proliferation of kidney fibroblasts in culture and increases expression of mRNA encoding TGF $\beta$ , fibronectin and collagen type I [32]. Subsequently the TGF $\beta$  may stimulate the accumulation of matrix and inflammation [32-38]. In the current study, we hypothesized that long-term high fat diet treatment of female rats, could induce at time-dependent fashion, molecular pathways interactions involved in the kidney disorder process that may results in loss of organ function and early occurrence of chronic kidney disease. Thus, the present study was performed in 3, 5, 7 and 9 week-old HFD female rats compared to appropriated gender and age-matched animals evaluating the kidney expression of AngII receptor type I (AT1), fibrotic and EMT markers in parallel with kidney function.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals and diets** – The experiments were approved by the ethical committee for experimental research at Institute of Biosciences (371-CEUA) at São Paulo State University. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. The assays were conducted on age-matched, female offspring of sibling-mated Wistar Hannover rats (250-300 kg) allowed free access to water and standard rodent chow (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil). Our local colonies originated from a breeding stock supplied by CEMIB/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil. Immediately after weaning at 3 weeks of

age, animals were maintained under controlled temperature (25°C) and lighting conditions (07:00h-19:00h), with free access to tap water and standard rodent laboratory chow, and followed up to 8 weeks of age. The dams were maintained on standard rodent laboratory diet (Co) or long-term high fat diet (HFD) by 3 (Co3, n=5 and HFD3, n=5), 5 (Co5, n=5 and HFD5, n=5), 7 (Co7, n=5 and HFD7, n=5) and 9 weeks (Co9, n=5 and HFD9, n=5) of age. Daily, 30g of chow were offered and the residual amount was weighed to calculate the consumption. The rat weight was assessed 3 times per week. One group of 9-wk-old HFD-treated compared with appropriate age-matched control rats, were submitted to renal function test. The rats were euthanized at end of, 3, 5, 7 and 9 weeks of diet and pelvic, gonadal and retroperitoneal adipose tissue was removed and weighted. The adiposity index was calculated by ratio of total adipose tissue weight to body weight. The kidneys were weighed and tissues samples were collected for histology, immunohistochemistry and western blot.

***Renal Function Evaluation*** - The renal function tests were performed and estimated by creatinine and lithium clearance in unanesthetized, unrestrained 9-wk-old control and HFD-treated rats. Briefly, fourteen hours before the renal test, 60 $\mu$ mol LiCl 100g<sup>-1</sup> body weight was given by gavage. After an overnight fast, each animal received a load of tap water by gavage (5% of the body weight), followed by a second load of the same volume, 1-hour later and, spontaneously voided urine was collected over 120-min period into a graduated centrifuge tube. At the end of the experiment, blood samples were drawn through the cardiac puncture in anesthetized rats and urine and plasma samples were collected for analysis [39-41].

***Measurement of proteinuria*** – Nine-week-old female rats from control and HFD groups received a load of tap water by gavage (5% of the body weight) and twenty minutes after were housed individually in metabolic cages, and spontaneously voided urine was collected over a 2-h period and immediately stored at -20°C until processing. The proteinuria was detected using the Sensiprot Kit (*Labtest*).

***Histology and Immunohistochemistry*** - Kidneys were removed and placed in the fixative (paraformaldehyde 4% in 0.1M phosphate buffer pH 7.4) for 15-h, followed 70% alcohol until be processed for paraffin inclusion. The paraffin blocks were cut into 5- $\mu$ m-thick sections. Picosirius staining evaluated the density of collagen. Ten cortical

and ten medullar fields of each histological section (n=5 for each group) were analyzed and the average of the readings determined the density of collagen. Images were captured with photomicroscope and analyzed by the Leica Qwin 3.1 for windows. For immunohistochemistry paraffin sections were, overnight at 4°C, incubated with primary antibodies for TGF $\beta$ -1, AT1 receptor, ZEB-2, fibronectin and desmin (Santa Cruz). Secondary antibodies were used according to the primary antibody. Finally, sections were revealed with DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted. No immunoreactivity was seen in control experiments in which one of the primary antibodies was omitted.

**Western Blot** – Whole kidneys were obtained from Co and HFD groups. The tissue was minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilization buffer (10 ml/L Triton-X 100, 100mM Tris [hydroxymethyl] amino-methane (Tris) pH 7.4, 10mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA), 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF) and 0.1 mg/ml aprotinin at 4°C, using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA) operated at maximum speed for 20 s. The tissue extracts were centrifuged at 11000 rpm at 4°C for 40 min, and the supernatants used as sample. Protein quantification was performed using the Bradford method. For quantification, both tissue and total extract samples (250 $\mu$ g of protein) were subjected to SDS-PAGE. After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then blotted with specific antibody. The samples were treated with Laemmli buffer containing 100 mM dithiothreitol (DTT), heated in a boiling water bath for 4 min and subjected to 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Bio-Rad minigel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membranes was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean). The non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2-h at 22°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10mM Tris, 150mM NaCl, and 0.02% Tween 20). Nitrocellulose blots were then incubated at 4°C overnight with primary antibodies (TGF $\beta$ -1, AT1R, ZEB-2 and E-cadherin) diluted in blocking buffer (3% non-fat dry milk,

10mM Tris, 150mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The bands immunoreactivity was detected using the enhanced chemiluminescence method (RPN 2108 ECL Western blotting analysis system; Amersham Biosciences). Images of the developed radiographs were scanned (Epson Stylus 3500) and band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image Corporation). To ensure equal loading, membranes were stained with reversible Ponceau to discard possible inequalities in protein loading and/or transfer, in Western blots [42]. Only homogeneously stained membranes were employed in the study.

**Data presentation and statistical analysis** - Data obtained from this study are expressed as the mean  $\pm$  SEM or median and quartile deviation when appropriated. Creatinine clearance was used to estimate glomerular filtration rate (GFR) and lithium clearance ( $C_{Li}$ ) was used to assess proximal tubule output [24,27,28]. Fractional sodium excretion ( $FE_{Na}$ ) was calculated as  $C_{Na}/C_{Cr} \times 100$ , where  $C_{Na}$  is sodium clearance and  $C_{Cr}$  is creatinine clearance. The fractional proximal ( $FEP_{Na}$ ) and post-proximal ( $FEPP_{Na}$ ) sodium excretion was calculated as  $C_{Li}/C_{Cr} \times 100$  and  $C_{Na}/C_{Li} \times 100$ , respectively. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis, ANOVA one-way or Student *t*-test when appropriated from GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA). *Post hoc* comparisons between selected means were performed with Neuman-Keuls-Student contrast test when initial ANOVA indicated statistical differences between experimental groups. Comparisons involving only two means within or between groups were carried out using a Student *t*-test. The level of significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

The HFD group presented significant reduction of the food intake from 3 to 9 week of age (Figure 1A) despite of enhanced caloric intake (Figure 1B). The body weight was increased from the 7<sup>th</sup> week in high fat diet intake group (Figure 2A) and the adiposity index was elevated beyond of the 5<sup>th</sup> week (Figure 2B) when compared to control age-matched rats.

At three, five and seven weeks-old HFD rats we do not verify any change in urinary protein excretion however, in HFD-treated rats with was observed a significant increased urinary protein excretion when compared to control group (Figure 3).

**Renal Function Data** - The data for renal function in the 9-wk-old rats of both (Co and long-term HFD) groups are summarized in Figure 4. The urinary flow rates did not significantly differ among the groups during the renal tubule sodium handling studies. The glomerular filtration rate, estimated by  $CC_r$ , after oral water load and fractional urinary sodium excretion ( $FE_{Na}$ ) were significantly lower in high fat diet intake rats, beyond 9-wk-old, when compared with the standard diet intake age-matched group, as follows: HFD 9-wk:  $0.19 \pm 0.043\%$  versus Co 9-wk:  $0.33 \pm 0.043\%$  ( $P=0.0335$ ) and HFD 9-wk:  $396.6 \pm 37.6\text{ml/min}/100\text{g b.w.}$  vs. Co 9-wk:  $539.3 \pm 42.6\text{ml/min}/100\text{g b.w.}$  ( $P=0.0366$ ), respectively. The decreased  $FE_{Na}$  in HFD intake rats was accompanied by a significant decrease in proximal ( $FEP_{Na}$ ) and post-proximal sodium excretion, compared with the standard diet intake age-paired control group (Figure 4). This consistent fall in  $FE_{Na}$ ,  $FEP_{Na}$  and in  $FEPP_{Na}$ , produced by long-term HFD intake, was followed by decreased kaliuresis in the entire experimental group of the present investigation.

**Histology and Immunohistochemistry** - The density of collagen evaluated by Picosirius staining was significantly enhanced from 5 to 9 weeks of diet intake in the cortical zone of HFD group kidneys comparatively control (Figure 5). In the medullar zone the elevated collagen content was observed beyond 3-wk of age (Figure 5). The immunohistochemical analysis presented that TGF $\beta$ -1 is located preferably in both peritubular and mesangial extracellular matrix in control animals (Figure 6A, C, E and G). However, after 3 weeks of high fat diet intake, TGF $\beta$ -1 immunoreactivity was increased all over the whole kidney tissue, in both cortex and medulla (Figure 6A and B), decreasing progressively beyond 5 week of high-fat diet ingestion (Figure 6C-F). Only a 9-wk-old high fat diet rats, we observed again increased TGF $\beta$ -1 expression in the renal cortical zone (Figure 6G and H). The immunostaining for AT1 receptor was verified in Co3 renal cortical portion with more intensive marker in glomerular cells, brush border of the tubule proximal cells and in the renal vascular walls (Figure 7A). The same pattern of immunostaining distribution was also observed in the HFD3

group, however, this staining was more accentuated (Figure 7B). This increased intensity of immunostaining was also found in HFD medullary portion when compared to age-matched Co3 group (Figure 7A and B inserts). In the animals of group HFD5 renal AT1 receptors are preferentially observed in the nucleus and brush border of the proximal segments of the nephron (Figure 7C and D). We verified enhanced expression of this receptor in the renal medulla of HFD5 (Figure 7C and D inserts). After 7 weeks of consumption of high fat diet there was an increase in the immunoreactivity for AT1 receptor in post-proximal segments of the nephron, in both cortical and medullar, with a significant reduction in the glomeruli (Figure 7E and F). Beyond 9 weeks of high fat diet intake there was an increase of AT1 receptors throughout the kidney tissue (Figure 7G and H). By kidney immunostaining of the transcription factor ZEB2, we verified a predominant glomeruli, post-proximal nephron and collector cells location (Figure 8). After 3 weeks of high fat diet consumption the immunoreactivity was higher to ZEB2 and can be best evidenced in the medullary region of HFD group (Figure 8A and B). This increase was more intense after 5 weeks of high fat diet (Figure 8C and D). The HFD7 group also showed increased expression of ZEB2 in both cytosol and nuclei of post-proximal segment cells (Figure 8E and F). In the group HFD9 we do not verify overexpression of ZEB2 in glomeruli cells but, that was more expressed mainly, in post-proximal and collector tubule (Figure 8G and H). After 3 and 5 weeks of high fat diet treatment, we do not found significant difference in renal fibronectin and desmin immunostaining but, beyond 7-wk HFD treatment, we found enhanced glomerular expression when compared to observed in age-matched Co7 (Figure 9). This enhance was more expressive in HFD9 when fibronectin appeared in glomerular filtration membrane and surrounding of the glomerular capillaries (Figure 10).

**Western blot analysis** – The western blot analyses confirm the most findings observed in the immunohistochemical studies as shown in the Figure 11. In HFD group the renal TGF $\beta$ -1 expression was enhanced from 3 to 5 weeks (174 and 35% respectively) and was reduced from 7 to 9 weeks (22 and 33% respectively) when compared to that observed in Co groups (Figures 11 and 12). We do not observe significant alterations in HFD group AT1 receptor expression (Figures 11 and 12), by

immunoblotting. When compared to control, ZEB2 expression was enhanced in all times studied but the significant rise (90%) occurred after 5 weeks of high fat diet (Figures 11 and 12). Conversely, E-cadherin expression was reduced in HFD from 3 to 9 weeks (28, 48, 45, and 50% respectively) when compared to appropriate age-matched control group (Figures 11 and 12).

## DISCUSSION

More and more evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of high fat diet on kidney morphology and function disorders. Lin et al. [12] demonstrated that a diet rich in saturated fats is directly associated with the presence of albuminuria in middle-aged adults and elderly by proposing the hypothesis that saturated fat intake may be related to elevated albuminuria due to increased inflammation markers. Here, in long-term HFD-treated female rats model, we focus on epithelial to mesenchymal transdifferentiation process as novel mechanism that promotes renal fibrosis. Also, in the present study we investigated whether known causes of renal fibrosis angiotensin II and transforming growth factor beta-1 act through this pathway. We may state that, at least in part, the time-dependent kidney expression of fibrotic and EMT markers are associated with adult later renal function disorder as an outcome suggesting that the kidney is an particular organ in which prolonged fat diet intake may be underlie to the early loss of organ function and occurrence of chronic kidney disease.

In the current study, the time-course HFD-treated group showed a decreased food ingestion, in grams, despite a greater caloric intake which in turn was associated with significant enhance of the body weight and adipose tissue deposition, mainly, beyond 7-wk of age when compared to age-matched control animals. Further and interestingly, the immunoblotting and immunohistochemical analysis in the present study demonstrated a significant early time-course increase in the expression of TGF $\beta$  in the entire kidney of HFD-treated rats, compared to that observed in control group. Simultaneously, the study shows a transient increase in the expression of ZEB2 in HFD whole kidney by immunoblotting between 3<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> week of age accompanied

by fall in the E-cadherin expression and followed beyond 7<sup>th</sup> week by increased collagen deposition.

By the immunohistochemistry, the present study verified beyond 7<sup>th</sup> week of diet in HFD group a striking enhance of the glomerular expression of TGFβ-1, desmin, fibronectin and collagen, intrinsically related to fibrotic process. These results in the current study confirm the recent findings indicating that glomerular cells, particularly the podocytes, undergo phenotypic conversion, characterized by loss of podocyte-specific markers and gain of transitional features, a process reminiscent of EMT [43]. In this study, we observed an enhanced expression of collagen that was accompanied by enhanced glomerular expression of desmin, and reduced E-cadherin. Using culture of immortalized mouse podocyte, Li et al., [43] showed that after TGFβ-1 stimulation also occurred loss of epithelial markers how ZO-1 and acquisition of mesenchymal markers how desmin, collagen I and fibronectin. The production of interstitial matrix compounds suggests that podocytes have adapted a mesenchymal phenotype after injury, which could profoundly change their functions [43]. TGFβ-1 triggers tubular EMT, and its expression are up-regulated in virtually every type of chronic kidney disease [44,45]. By the present data, we may affirm that EMT may be an early and predominant response of renal, particularly, of podocytes in most pathophysiological conditions. TGFβ-1 protein expression, in whole kidney, is enhanced in the similar pattern that observed to type I collagen. Thus, in parallel to enhanced expression of TGFβ-1, a major inducer of EMT in epithelial cells [46,47], we found upregulation of ZEB2, an EMT-inducing transcriptional factor [47-51],which in turn, underregulated E-cadherin renal expression. Additionally, the current study shows an increased expression of proteins considered mesenchymal markers, including desmin, fibronectin and collagen. Corroborating to the current findings, Liu [52] speculates that transition of podocytes and others renal epithelial cells, after injury may play a critical role in causing dedifferentiation e cells dysfunction, which ultimately leads to defective glomerular filtration with proteinuria and glomerulosclerosis and, tubule transport disorder. The tubule cells and particularly, podocytes are highly terminally differentiated cells that are incapable of regenerative postnatal replication, thus, the loss of podocytes represent potential starting points for irreversible glomerular injury [53]. Thus, as demonstrated in

the our study, the podocyte injury underlies most forms of proteinuric kidney diseases [54] and is an essential feature of progressive glomerular diseases [55].

Studies have been showed that AngII plays a key role in the progression of chronic kidney damage, contributing to renal fibrosis. Many *in vitro* and experimental studies have demonstrated that AngII activates renal cells to produce profibrotic factors and extracellular matrix proteins (ECM) [56,57]. The interrelation between AngII and TGF $\beta$  is well established. AngII and TGF $\beta$  share many, profibrotic mediators and intracellular signaling systems [58,59]. Therefore, in this study, an increased immunohistochemical renal expression of AngII receptors could be driven-force that initiated profibrotic process by enhanced TGF $\beta$ -1 renal expression. The unchanged immunoblotting response to AT1 receptors in HFD-treated compared to control rats, may results of the utilization of whole kidney extract by this technique.

In rats, the HFD causes renal injury that was preceded by endothelial dysfunction and hypertension, both induced by increasing oxidative stress, powerful inflammatory response and disruption of the renal filtration barrier [11,60] The present investigation also demonstrated a pronounced decrease in fractional urinary sodium excretion in long-term HFD-treated rats. The decreased FE<sub>Na+</sub> was accompanied by a fall in FEP<sub>Na<sup>+</sup></sub> and FEPP<sub>Na<sup>+</sup></sub> and occurred associated with significant decreased C<sub>Cr</sub> and, certainly on the sodium filtered load. The precise mechanism of these phenomena remains unknown. Although the precise mechanism by which renal sodium excretion decline in HFD rats remain to be elucidated, the loss of organ function, the sympathetic neural and renin-angiotensin activity and renal non-control of the fluid and electrolyte balance is thought to play a dominant role in the long-term sodium and water retention. Studies in dogs who became obese due to a high fat diet showed that five weeks after starting the diet, there was a 30% increase in glomerular filtration relative to baseline, and in this same model, nine weeks after induction of obesity, was observed expansion of Bowman's capsule and increased mesangial matrix [61]. This was associated with increased expression of TGF $\beta$ -1 and glomerular increase in the concentration of glycosaminoglycans in tubular basement membranes. Factors, such as leptin [62] and oxidative stress [63-64], may contribute to sympathetic drive in high fat diet intake animals. Our results may suggest the participation of increasing oxidative stress and

inflammation associated to renal alterations in HFD-induced rats. Although we were not able to demonstrate by immunoblotting, the tissue renin–angiotensin system may be upregulated in HFD-rats as demonstrated by immunostaining; thus, increased renal angiotensin may induce ROS production by NAD(P)H oxidases [65]. In this way, confirmatory experiments are needed before this conclusion can be wholly made. In conclusion, from our present knowledge, these are the first data showing kidney progressive dysfunction, induced by HFD treatment, particularly, showing a striking structural disorder **associated with** enhanced glomerular expression of proteins intrinsically related to fibrotic process. This results led us to hypothesize that enhanced ZEB2, a recognized E-box repressors of E-cadherin gene would be prior induced by TGF $\beta$ -1 action resulting rise in fibronectin and type I collagen expression. Additionally, we suggested that presumable podocyte injury in parallel with observed proteinuria and evidences of EMT transformation are associated with long-term loss of kidney function and to renal sodium and water retention. In this way, the long-term HFD intake, enhance the susceptibility for adult renal disease and increased renal collagen expression and, subsequently should cause tubular and glomeruli EMT and renal failure at later time points in rats.

## REFERENCES

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. *Lancet* 2011; 377:557-67
2. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med* 2005; 352: 1138-1145
3. Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, Lancha AH Jr. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2012; 5:75-87
4. Parker DR. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 199; 58:129-136
5. Montell E. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:229-237
6. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197-1209
7. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 195-203
8. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 2011; 10: 819-828
9. Wang T, Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J of Physiol Society* 1996; 271:143-149
10. Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubule-interstitial disease. *Lancet* 1982; 8311:1309-11.
11. Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in

- Spontaneously Hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension* 2008; 51:352-359
12. Lin J, Judd S, Le A, et al. Associations of dietary fat with albuminuria and kidney dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2010; 92:897-904
13. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 129-140
14. Kim JH, Kim BK, Moon KC, et al. Activation of the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2003; 64:1715–1721
15. Kim TS, Kim JY, Hong HK, et al. mRNA expression of glomerular basement membrane proteins and TGF- $\beta$ 1 in human membranous nephropathy. *J Pathol* 1999; 189:425–430
16. Shankland SJ, Hugo C, Coats SR, et al. Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50:1230-1239
17. Wahab NA, Schaefer L, Weston BS, et al. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. *Diabetologia* 2005; 48: 2650–2660
18. Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995; 44:1139–1146
19. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, et al. Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 854–859
20. Sekido R, Murai K, Funahashi J, et al. The delta-crystalline enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5692-5700

21. Verschueren K, Remacle JE, Collart C, et al. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 1999; 274: 20489-20498
22. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 375-2385
23. Ponticos M, Partridge T, Black CM, et al. Regulation of collagen type I in vascular smooth muscle cells by competition between Nkx2.5 and deltaEF1/ZEB1. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 6151–6161
24. Murray D, Precht P, Balakir R, et al. The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 3610–3618
25. Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 103–116
26. Badid C, Desmouliere A, Babici D, et al. Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1993–1998
27. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, et al. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277:C1–9
28. Roberts IS, Burrows C, Shanks JH, et al. Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol* 1997; 50:123–127
29. Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:141–146.
30. Mezzano AS, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001; 38:635–638

- 31.Oppermann M, Gess B, Schweda F, Castrop, H. Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:468–477
- 32.Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93:2431–2437
- 33.Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997; 52: 1497–1510
- 34.Wolf G, Zahne, G, Schroeder R, Stahl RA. Transforming growth factor beta mediates the angiotensin-II-induced stimulation of collagen type IV synthesis in cultured murine proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 263–269
- 35.Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110:341–350
- 36.Sanchez-Lopez E, Rodrigues Diez R, Rodriguez Vita J, et al. Connective tissue growth factor (CTGF): A key factor in the onset and progression of kidney damage. *Nefrologia* 2009; 29: 382–391
- 37.Wolf G. Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15[Suppl 6]: 61–63,
- 38.Wolf G, Haberstroh U. Neilson, E.G. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 1992; 140: 95–107
- 39.Michelotto JB, Carvalheira JB, Saad MJ, Gontijo JA. Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull* 2002; 57: 613–618
- 40.Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA. Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): Role of renal nerves. *Life Sci* 2005; 76: 1805-1815

- 41.Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signaling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(2): 380-388
42. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry* 2010; 401: 318–320
- 43.Li Y, Kang YS, Dai C. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* 2008; 172: 299-308
- 44.Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 1465–1475
- 45.Böttlinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600-2610
- 46.Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, et al. Transforming growth factor-beta and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 157–161
- 47.Chung ACK, Huang XR, Meng X, et al. miR-192 Mediates TGF- $\beta$ /Smad3-Driven Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1317–1325
- 48.Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The mir-200 family and mir-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting Zeb1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 593-601
- 49.Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, et al. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008; 7: 3112–3118
- 50.Korpal M, Lee ES, Hu G, et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cells by targeting the E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283: 14910-14914.

- 51.Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008; 68: 7846-7854
- 52.Liu Y. New insights into Epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:212-22.
- 53.Fan Q, Xing Y, Ding J, Guan N, Zhang J. The relationship among nephrin, podocin, CD2AP, and alpha-actin might not be a true 'interaction' in podocyte. *Kidney Int* 2006; 69:1207-1215
- 54.Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)* 1995;192: 385-397
- 55.Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F213-229
- 56.Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, et al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21:16-20
- 57.Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int* 2006; 70:1914-9
- 58.Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 2007; 74:196-206
- 59.Daniel C. Blocking of angiotensin II is more than blocking of transforming growth factor-beta. *Kidney Int* 2008; 74:551-553
- 60.Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M, Francis J: Diet-induced Renal Changes in Zucker Rats Are Ameliorated by the Superoxide Dismutase Mimetic TEMPOL. *Obesity* 2009; 17: 1994–2002
- 61.Paula RB, Fernandes N, Carmo VMP, Andrade LCF, Bastos MG. Obesidade e Doença Renal Crônica. *J Bras Nefrol* 2006; 28:158-164
- 62.Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG: Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 2005; 54:2012–2018
- 63.Vincent HK, Taylor AG: Biomarkers and potential mechanisms of obesity-

- induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:400–418
64. Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T. Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 2005; 45:1165–1172
65. Coughlan MT, Thallas-Bonke V, Pete J, et al. Combination therapy with the advanced glycation end product cross-link breaker, alagebrium, and angiotensin converting enzyme inhibitors in diabetes: synergy or redundancy? *Endocrinology* 2007; 148: 886–895

## LEGEND OF FIGURES

**Figure 1.** Representation of food (**A**) and caloric (**B**) intake after 3, 5, 7 and 9 weeks of standard (Co) and high fat diet (HFD). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5).

**Figure 2.** In **A** we have the representation of body weight and in **B** the adiposity index after 3, 5, 7 and 9 weeks of standard (Co) and high fat diet (HFD). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5).

**Figure 3.** Urinary protein excretion in HFD after 3, 5, 7 and 9 weeks compared to appropriated age-matched controls. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5).

**Figure 4.** Urinary flow, Creatinine clearance ( $C_{Cr}$ ), fractional sodium excretion (FENa), proximal (FEPNa) and post-proximal (FEPPNa) fractional sodium excretion and fractional potassium excretion (FEK) in Co and HFD groups after 9 weeks of diet. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis; The data are expressed as the median and quartile deviation. \* $P \leq 0.05$  versus control.

**Figure 5.** Graphic representation of cortical (on left) and medullar (on right) renal collagen content after 3, 5, 7 and 9 weeks of standard (Co) and high fat diet (HFD). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5).

**Figure 6.** Renal TGF $\beta$ -1 immunostaining in the cortex and medulla (inserts). In the left we have control groups after 3 (A), 5 (C), 7 (E) and 9 (G) weeks of standard diet. In the right are the groups submitted to high fat diet for 3 (B), 5 (D), 7 (F) and 9 (H) weeks. G: glomerulus.

**Figure 7.** Renal AT1 receptor immunostaining in the cortex and medulla (inserts). In the left we have control groups after 3 (A), 5 (C), 7 (E) and 9 (G) weeks of standard diet. In the right are the groups submitted to high fat diet for 3 (B), 5 (D), 7 (F) and 9 (H) weeks. G: glomerulus, V: vasa, arrows: brush border, \*post-proximal segments.

**Figure 8.** Renal ZEB2 immunostaining in the cortex and medulla (inserts). In the left we have control groups after 3 (A), 5 (C), 7 (E) and 9 (G) weeks of standard diet. In the right are the groups submitted to high fat diet for 3 (B), 5 (D), 7 (F) and 9 (H) weeks. G: glomerulus, \*post-proximal segments.

**Figure 9.** The figures show the representative glomerular immunoreactivity pattern after 7 weeks in both studied groups. In A (Co) and B (HFD) we have fibronectin and in C (Co) and D (HFD) desmin immunostaining. Fibronectin immunoreactivity is accentuated in HFD glomeruli (B) as well as desmin (D). Arrows: glomerular basement membrane.

**Figure 10.** In A (Co) and B (HFD) we have fibronectin and in C (Co) and D (HFD) desmin immunostaining. The figures show the representative glomerular immunoreactivity pattern after 9 weeks in both studied groups. Fibronectin as well as desmin immunoreactivity is more accentuated than that observed in HFD7 glomeruli. Arrows: glomerular basement membrane.

**Figure 11.** Western blot kidney analysis to TGF $\beta$ -1, AT1, ZEB2 and E-cadherin in HFD after 3, 5, 7 and 9 weeks compared to appropriated age-matched controls (Co). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ).

**Figure 12.** This graphic represents an overview of the variation in the expression of studied proteins from 3 to 9 weeks after high fat diet. Here we consider the values obtained in the controls as 100%.

Figure 1

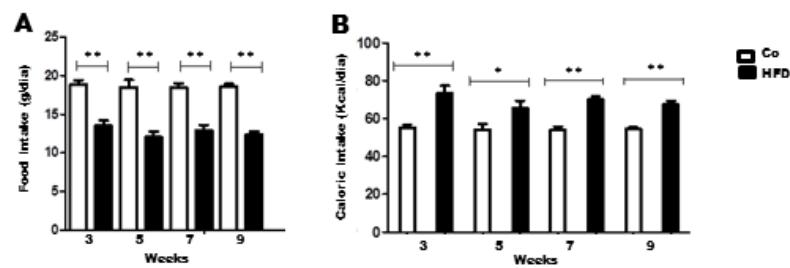


Figure 2

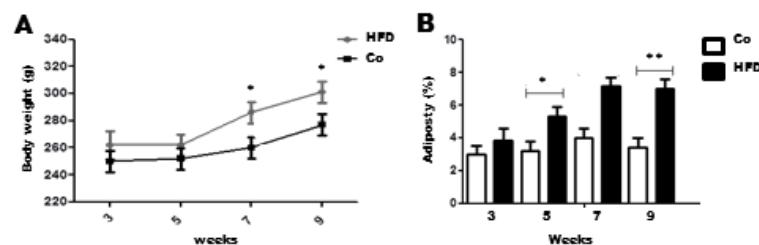


Figure 3

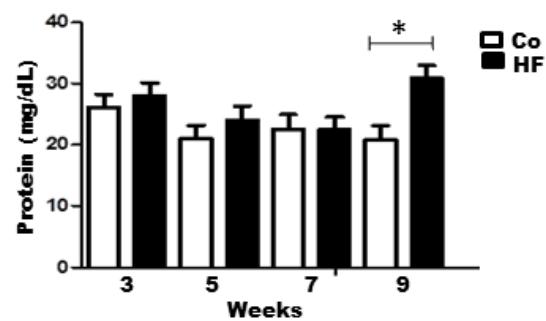


FIGURE 4

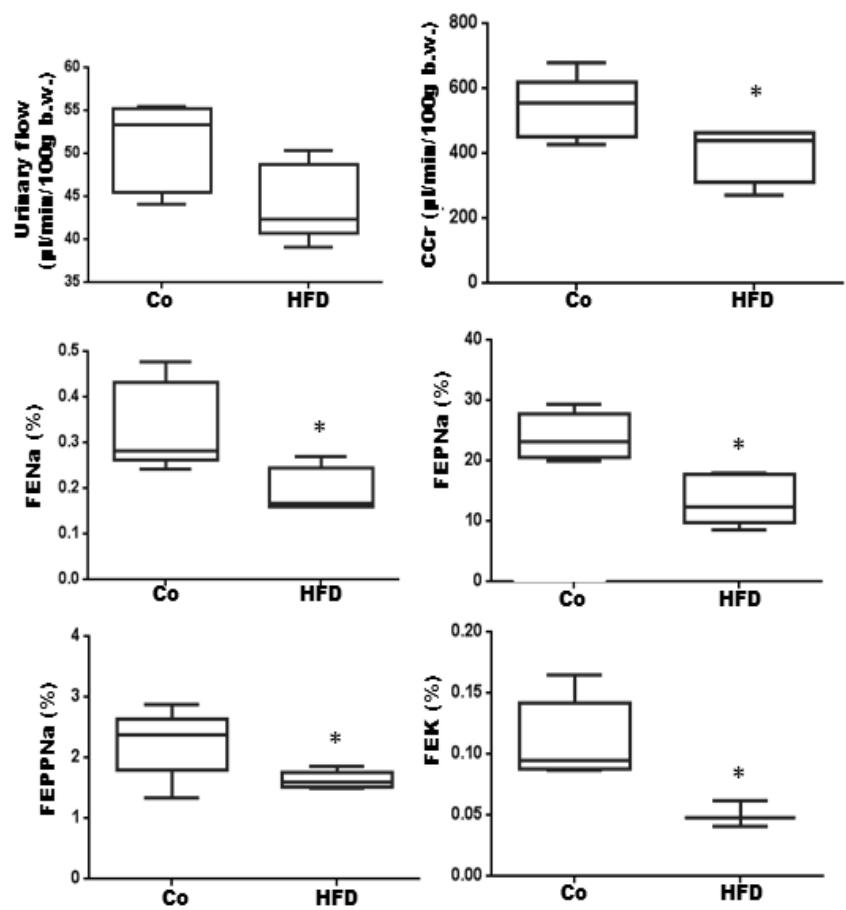


Figure 5

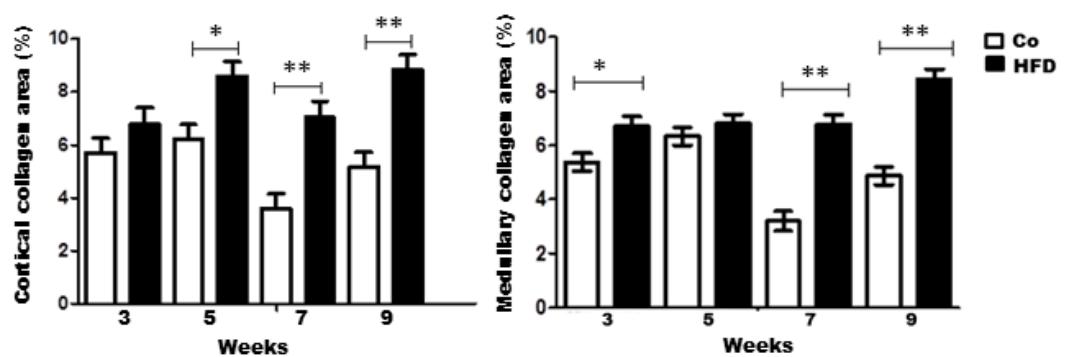


FIGURE 6

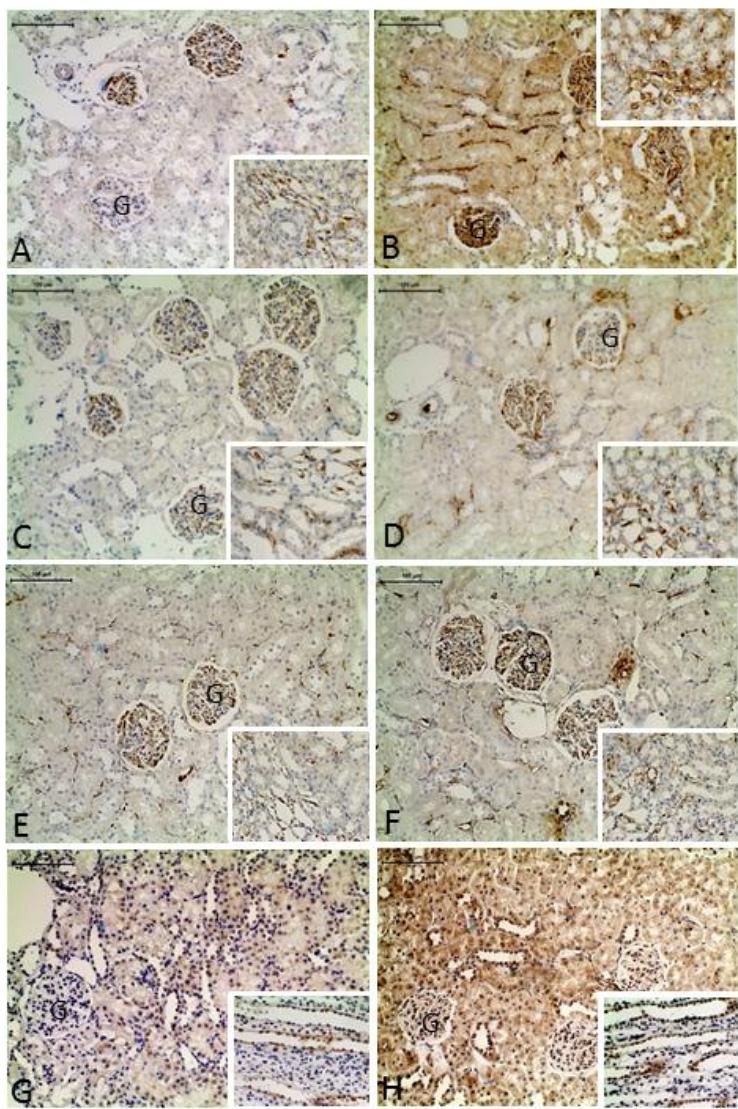
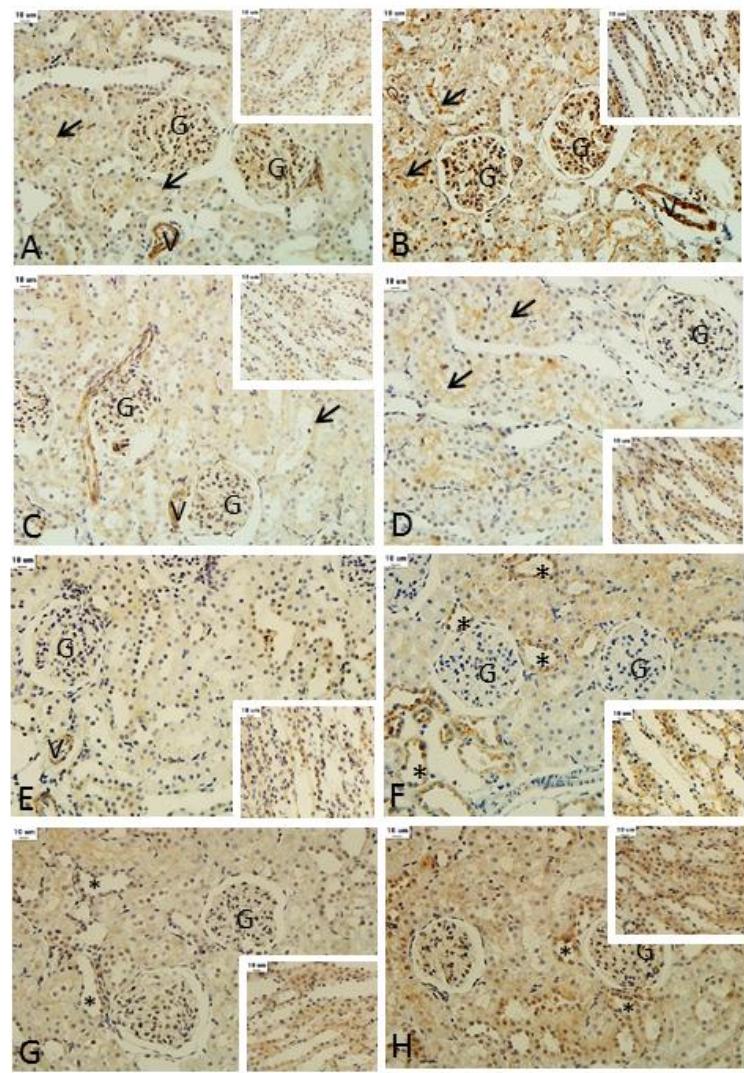


FIGURE 7



**FIGURE 8**

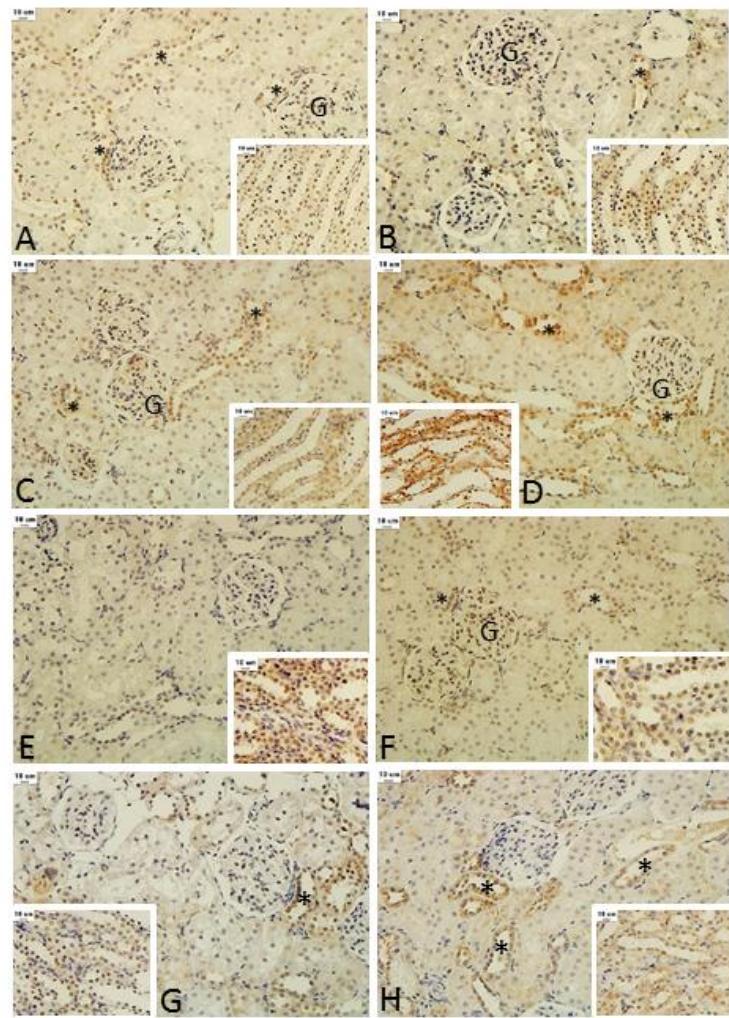


FIGURE 9

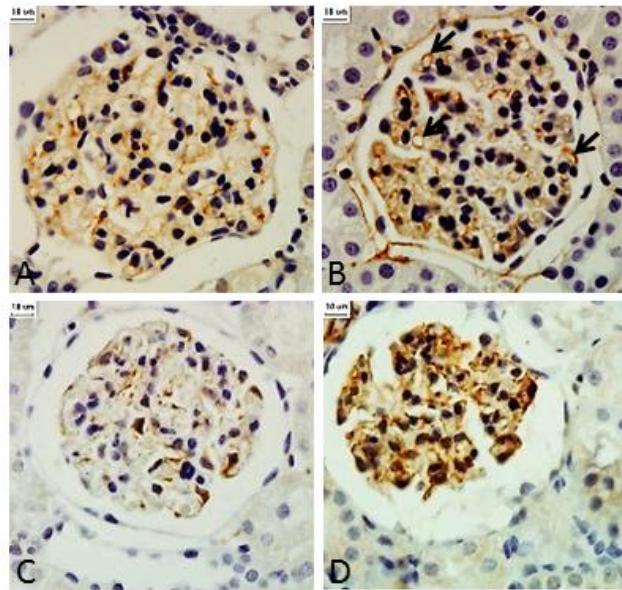


FIGURE 10

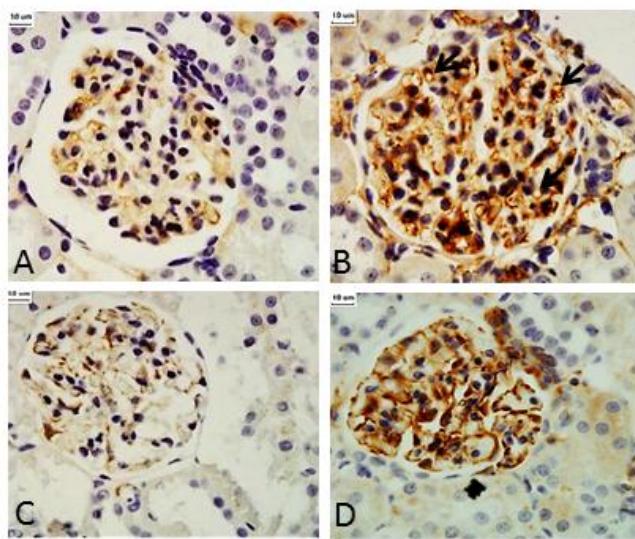


FIGURE 11

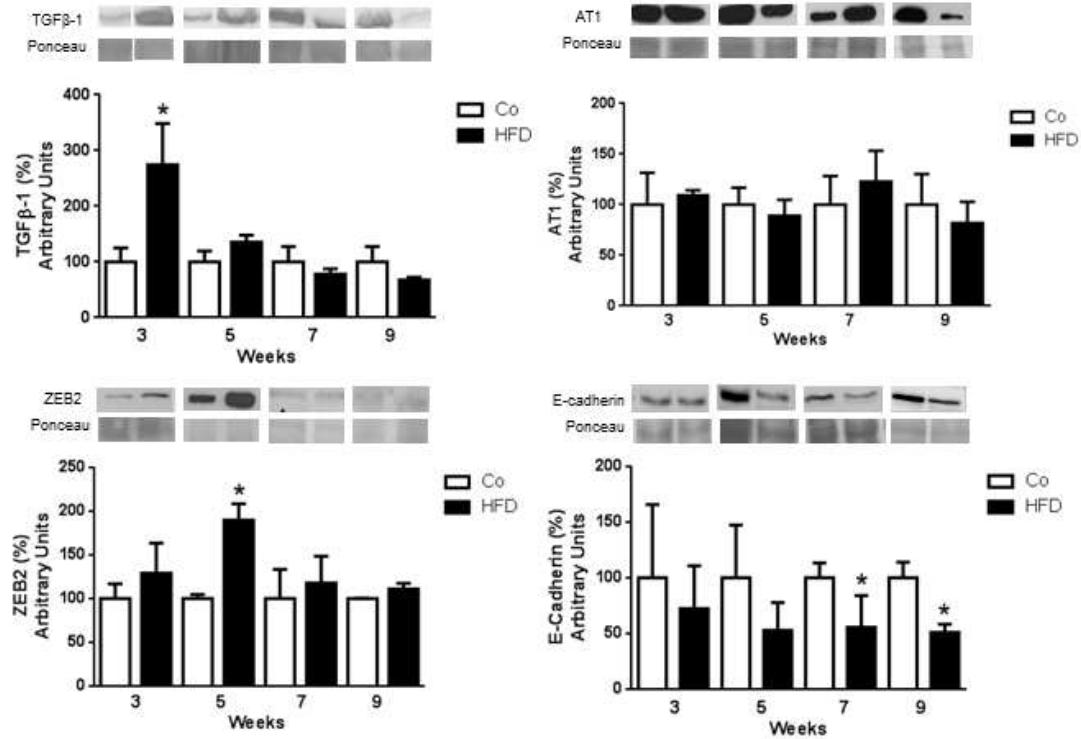


FIGURE 12

