

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/02/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Amanda de Menezes Figueiredo

Participação do fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) no estresse oxidativo, no metabolismo energético, alterações morfológicas e funcionais cardíacas associadas à suplementação de vitamina D em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Dra. Priscila Portugal dos Santos

Botucatu

2020

Amanda de Menezes Figueiredo

Participação do fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) no estresse oxidativo, no metabolismo energético, alterações morfológicas e funcionais cardíacas associadas à suplementação de vitamina D em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Dra. Priscila Portugal dos Santos

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Figueiredo, Amanda de Menezes.
Participação do fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) no estresse oxidativo, no metabolismo energético, alterações morfológicas e funcionais cardíacas associadas à suplementação de vitamina D em ratos / Amanda de Menezes Figueiredo. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva
Coorientador: Priscila Portugal dos Santos
Capes: 40101002

1. Fator 2 de Crescimento de Fibroblastos. 2. Vitamina D.
3. Remodelação ventricular. 4. Estresse oxidativo.
5. Metabolismo energético. 6. Hiperfosfatemia.

Palavras-chave: Fator de crescimento de fibroblasto-23; Hiperfosfatemia; Remodelação cardíaca; Vitamina D.

Aos meus pais Wilson e Nilcilene

Por serem meu porto seguro e sempre me incentivarem a não desistir dos meus sonhos. Serei eternamente grata a tudo o que fazem por mim!

Ao meu irmão Rodrigo

Por sempre me entender e amparar, mesmo com a distância.

Amo vocês.

A **Deus**, por me fortalecer a cada dia e me dar exatamente o que eu preciso na hora certa.

Ao meu orientador **Prof. Titular Sergio A. R. Paiva**, por toda paciência, competência e dedicação. Por me acolher quando necessário e por confiar em meu trabalho. Muito obrigada por tudo o que fez por mim ao longo desses anos, o sr. foi essencial para meu crescimento pessoal e profissional!

À minha co-orientadora **Dr^a. Priscila Portugal**, pelo suporte na realização deste projeto.

Aos docentes do departamento de Clínica Médica, **Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci**, **Prof^a. Dr^a. Paula S. Azevedo Gaiolla**, **Prof. Dr. Katashi Okoshi**, **Prof. Dr. Leonardo Antonio M. Zornoff** e **Prof^a. Dr^a. Bertha Furlan Polegato**, pelos ensinamentos e contribuições no decorrer de todo o projeto.

À **Prof^a. Dr^a. Ana Angélica H. Fernandes**, do Instituto de Biociências – UNESP, pela realização de análises bioquímicas.

À **Dr^a. Camila Renata Corrêa**, do departamento de Patologia da FMB/UNESP, pelo companheirismo, incentivo e suporte na realização deste projeto.

A todos os funcionários da Biblioteca e da seção de Pós-Graduação, por toda competência. A todos os funcionários do Departamento e Laboratório Experimental da Clínica Médica, por todo apoio no transcorrer do projeto, pela atenção e disponibilidade.

À Prof^a. Dr^a. Bruna Paola, por ter me incentivado e acreditado no meu trabalho desde o início. A quem serei eternamente grata por tudo o que me ajudou e ajuda até hoje. Muito obrigada!

Às minhas amigas: Carol, pela parceria que me proporcionou no mestrado e desde então sempre estar presente em minha vida. Tati, por sempre me ajudar e partilhar os conhecimentos adquiridos. Obrigada pela parceria neste projeto e em minha vida. Bruna Letícia, por sempre me ajudar, aconselhar e me motivar, mesmo à distância. Amanda, que mesmo não sendo do mesmo grupo de pesquisa, sempre me auxiliou no que foi necessário. Aos amigos e companheiros de Laboratório Renata, Bruna Twix, Renan e Dani, pela amizade, apoio e auxílio em todas as etapas do projeto. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento pessoal. Muito obrigada por cada momento!

À Marina Ansolin, representante técnica da Waters, por me auxiliar na padronização da metodologia do 25(OH)D₃ no HPLC.

Aos meus primos Giovani, Duda, Arthur e Bê, por serem minha maior motivação e por me ensinarem a enxergar a vida de forma simples.

Aos meus **primos Maraisa, Diego, Mariana e Rafa**, por tornarem nossos encontros únicos e mesmo com a distância, se fazerem presentes.

Aos meus **primos Rafael** (in memorian) e **Baby** (in memorian), por serem meu maior exemplo de luta e fé. Amo vocês meus anjinhos!

Aos meus **tios Mário, Nilva, Nena e Vilma**, por estarem sempre presentes. Em especial a Nilva, por estar disponível nos momentos em que mais preciso e a Nena, por sempre estar disposta a ajudar com um sorriso no rosto.

À minha **madrasta Tuca** e **irmã postiça Adhara**, por se preocuparem comigo, sempre me ajudar e me ouvir.

Às minhas **avós Maria e Diva**, pelas orações diárias e todos os ensinamentos.

Aos **amigos que o Crossfit me proporcionou**, muito obrigada por tornarem este período mais leve e divertido.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo suporte financeiro com o auxílio de pesquisa (FAPESP 2016/19375-2 e CNPq 409682/2016-0).

FIGUEIREDO, A. M. Participação do fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) no estresse oxidativo, no metabolismo energético, alterações morfológicas e funcionais cardíacas associadas à suplementação de vitamina D em ratos. 2020. 101 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

A deficiência/insuficiência de vitamina D tem aumentado nos últimos anos e tornou-se problema mundial de saúde pública. Além do raquitismo, a deficiência de vitamina D também está associada com maior risco de desenvolver câncer, doenças imunológicas e, inclusive, doenças cardiovasculares. Estes fatores têm incentivado o uso indiscriminado da suplementação de vitamina D na população saudável. Suplementação de vitamina D, em altas doses, promove estresse oxidativo, inflamação, apoptose, altera o metabolismo energético, morfologia e função cardíaca. Adicionalmente, esta suplementação aumenta a concentração sérica de fósforo, que pode estimular a liberação do fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23). Esta maior concentração sérica de FGF-23 pode estar associada à remodelação cardíaca. Outros autores sugerem que a ação do FGF-23 no coração ocorre por meio da via de sinalização calcineurina/fator nuclear das células T ativadas (NFAT). Desta maneira, a menor fosfatemia, promovida pelo uso de sevelamer, poderia atenuar as alterações cardíacas provocadas pela suplementação de vitamina D. Assim, o objetivo deste trabalho é verificar se o tratamento com sevelamer diminui a concentração de FGF-23 e, conseqüentemente, atenua a remodelação cardíaca, decorrente da suplementação de vitamina colecalciferol, em altas doses. Foram utilizados 169 ratos machos da raça Wistar alocados em seis grupos: 1) Grupo controle alimentado com ração padrão (C, n=27); 2) Grupo controle + 3% de sevelamer (C+S, n=26); 3) Grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração (VitD 3, n=29); 4) Grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração + 3% de sevelamer (VitD 3+S, n=29); 5) Grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração (VitD 10, n=29); 6) Grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração + 3% de sevelamer (VitD 10+S, n=29). Após quatro meses, os animais foram submetidos à dosagem de fósforo urinário e avaliação ecocardiográfica. Em seguida foram eutanasiados para coleta de material biológico para realização das análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Os dados foram apresentados em média $\pm$ desvio ou erro padrão. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de duas vias e, para avaliar resposta dose dependente da suplementação de vitamina D, foi realizado o teste de Correlação de Spearman (corrigido por *Bonferroni*). O nível de significância adotado foi de 5%. Os animais suplementados com colecalciferol apresentaram maior concentração sérica de cálcio, fósforo e 25(OH)D₃. Adicionalmente, no miocárdio destes animais, verificamos maior expressão de proteína de interação com a tioredoxina (TXNIP), menor atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase), modificações no metabolismo energético e alterações morfológicas (maior área seccional do miócito e porcentagem de colágeno). Nos animais que receberam adição de sevelamer observamos maior concentração sérica de cálcio, menor concentração de FGF-23 e menor excreção urinária de fósforo. Também verificamos maior expressão de calcineurina, menor estresse oxidativo (menor concentração de hidróperóxido de lipídeo e maior catalase) e modificação no metabolismo energético no miocárdio destes animais. Além disso, os animais tratados com sevelamer apresentaram alterações morfológicas (maior diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e maior índice de massa do ventrículo esquerdo) e funcionais (menor tempo de desaceleração da onda E mitral)

observadas no estudo ecocardiográfico. Assim, podemos concluir que a suplementação com colecalciferol promoveu, como esperado, alterações cardíacas morfológicas, além de alterações no estresse oxidativo e no metabolismo energético. No entanto, o mecanismo envolvido neste processo não foi via FGF-23 e calcineurina/NFAT. Além disso, o uso do sevelamer, em ratos normofosfatêmicos, promoveu alterações cardíacas morfológicas e funcionais, além de modificar o metabolismo energético. O mecanismo envolvido neste processo pode ter sido via calcineurina/NFAT.

Palavras-chave: vitamina D; fator de crescimento de fibroblasto-23; hiperfosfatemia; remodelação cardíaca.

FIGUEIREDO, A. M. Participation of fibroblast growth factor-23 (FGF-23) in oxidative stress, energy metabolism, cardiac morphological and functional changes associated with vitamin D supplementation in rats. 2020. 101 f. Thesis (doctoral) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

Vitamin D deficiency/insufficiency has increased in recent years and has become a worldwide public health problem. In addition to rickets, vitamin D deficiency is also associated with increased risk of developing cancer, immune diseases and even cardiovascular diseases. These factors have encouraged the indiscriminate use of vitamin D supplementation in the healthy population. High-dose of vitamin D supplementation promotes oxidative stress, inflammation, apoptosis, changes in energy metabolism, morphology and cardiac function. In addition, this supplementation increases the serum phosphorus concentration which can stimulate the release of fibroblast growth factor-23 (FGF-23). Higher serum concentration of FGF-23 can be associated with cardiac remodeling. Other authors suggest that the action of FGF-23 in heart occurs through the signaling pathway calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT). Thus, decrease in phosphatemia, promoted by the use of sevelamer, can attenuate the cardiac changes promoted by vitamin D supplementation. The aim of this study is to verify whether treatment with sevelamer decreases the concentration of FGF-23 and, consequently, attenuates cardiac remodeling, due to supplementation of cholecalciferol vitamin, in high doses. 169 male Wistar rats were allocated in six groups: 1) Control group fed standard chow (C, n=27); 2) Control group + 3% sevelamer (C+S, n=26); 3) Group supplemented with 3,000 IU cholecalciferol/kg of chow (VitD 3, n=29); 4) Group supplemented with 3,000 IU cholecalciferol/kg of chow + 3% sevelamer (VitD 3+S, n=29); 5) Group supplemented with 10,000 IU cholecalciferol/kg of chow (VitD 10, n=29); 6) Group supplemented with 10,000 IU cholecalciferol/kg of chow + 3% sevelamer (VitD 10+S, n=29). After four months, the animals were submitted to urinary phosphorus dosage and echocardiographic were performed. Then, the animals were euthanized for collection of biological material to histological, biochemical and molecular analyzes. The values are presented as mean $\pm$ SEM. For statistical analysis, the two-way ANOVA test was used and, to assess dose response depending on vitamin D supplementation, Spearman's Correlation test (corrected by Bonferroni) was performed. The level of significance adopted was 5%. The animals supplemented with cholecalciferol showed a higher serum concentration of calcium, phosphorus and 25(OH)D₃. In addition, in the myocardium of these animals, we verified a higher expression of protein interacting with thioredoxin, less activity of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase), changes in energy metabolism and morphological changes (larger sectional area of myocyte and percentage of collagen. In animals treated with sevelamer, we observed a higher serum calcium concentration, lower FGF-23 concentration and lower urinary phosphorus excretion. We also verified a higher expression of calcineurin, lower oxidative stress (lower concentration of lipid hydroperoxide and higher catalase) and changes in energy metabolism in the myocardium of these animals. In addition, the animals that received sevelamer showed morphological alterations (higher diastolic diameter of the left ventricle and mass index of the left ventricle) and functional alterations (shorter deceleration time of the mitral E wave) observed in the echocardiographic study. Thus, we concluded that supplementation with cholecalciferol promoted, as expected, morphological cardiac changes, in addition to changes in oxidative stress and energy metabolism. However, the mechanism involved in this process was not via FGF-23 and calcineurin/NFAT. In addition, the use of sevelamer, in normophosphatemic rats, promoted

morphological and functional cardiac alterations and, also, modified energy metabolism. The mechanism involved in this process may have been via calcineurin/NFAT.

Keywords: vitamin D; fibroblast growth factor-23; hyperphosphatemia; cardiac remodeling.

Introdução	18
Hipótese e objetivo.....	24
Material e Métodos.....	26
Delineamento Experimental	27
Cálculo do tamanho amostral.....	28
Doses de vitamina D e sevelamer.....	28
Preparo das rações.....	29
Coleta de material biológico	29
Dosagem de cálcio e fósforo séricos, fósforo urinário	30
Dosagem sérica de PTH e 1,25(OH)D₂ e 25(OH)D₃.....	30
Determinação sérica de FGF-23	31
Análise imunohistoquímica.....	31
Determinação da expressão proteica da TXNIP	32
Determinação do estresse oxidativo no tecido cardíaco	33
Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético no tecido cardíaco	34
Avaliação ecocardiográfica	35
Análise histológica	36
Análise estatística.....	36
Resultados	38
Dosagem de cálcio e fósforo	43
Dosagem sérica de 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃, PTH e FGF-23	47
Via calcineurina/NFAT e TXNIP	51
Marcadores do estresse oxidativo.....	54
Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético	59
Estudo ecocardiográfico	70
Estudo morfométrico, área seccional do miócito e colágeno intersticial	76
Discussão	79
Conclusão	89
Referências	91

A vitamina D é composto lipossolúvel e apresenta duas principais formas: D₂ (ergocalciferol) e a D₃ (colecalfiferol). A principal maneira de obter a vitamina D é por meio da síntese cutânea, que produz apenas o colecalfiferol ¹. Outra forma de obter a vitamina D é por meio do seu consumo alimentar. Entretanto, as fontes alimentares fornecem somente de 10 a 20% da necessidade diária para humanos. O ergocalciferol é de origem vegetal e está presente em plantas e cogumelos. Já o colecalfiferol é de origem animal e encontra-se, principalmente, na gema de ovo, em peixes (atum e sardinha), na carne de boi, no fígado e nos rins ^{2; 3}. Em algumas situações é necessário suplementação de vitamina D, que também pode ser realizada em suas duas formas ^{4; 5}. No entanto, no Brasil, é comum encontrarmos a suplementação de colecalfiferol ^{6; 7; 8}.

Após a síntese cutânea, ingestão alimentar e/ou medicamentosa, a vitamina D é transportada ao fígado e metabolizada, formando o 25 hidroxivitamina D [25(OH)D₃]. Posteriormente, nos rins, a vitamina D é transformada em seu metabólito mais ativo, o 1,25 diidroxivitamina D [1,25(OH)₂D₃] ⁹. Por sua vez, o 1,25(OH)₂D₃ pode atuar nas células alvo por meio do receptor de vitamina D (VDR). Este receptor é membro da superfamília de receptores nucleares para hormônios esteróides e atua como fator de transcrição nuclear ^{10; 11}. A vitamina D também pode agir por meio da via de ativação da proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) ¹². A TXNIP se liga ao centro catalítico da tiorredoxina (Trx) reduzida, por meio de pontes dissulfeto, formando um complexo estável que bloqueia a ligação da Trx com outras substâncias, diminuindo sua atividade redutora ¹³. O complexo TXNIP/Trx, além de exercer importante função antioxidante, também regula diferentes vias de sinalização, como: anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e modula o metabolismo energético ^{14; 15}.

Como a síntese de vitamina D ocorre, principalmente, por meio da exposição da pele aos raios solares, sua deficiência aumentou e se tornou problema mundial de saúde pública ¹⁶. Além do raquitismo, a deficiência de vitamina D está associada ao maior risco de desenvolver câncer, doenças imunológicas e doenças cardiovasculares ^{17; 18; 19}. Em estudo experimental, após quatro meses de deficiência de vitamina D, os autores verificaram alterações cardíacas como hipertrofia ventricular esquerda e disfunção sistólica ¹⁷. Neste contexto, atualmente é comum encontrarmos, na população saudável, situações de eventos adversos e consumo de doses tóxicas de suplementação de vitamina D ²⁰. Adicionalmente, suplementação medicamentosa de vitamina D é de fácil acesso à população e está associada, de forma equivocada, que quanto maior a suplementação desta vitamina, maior será seu efeito

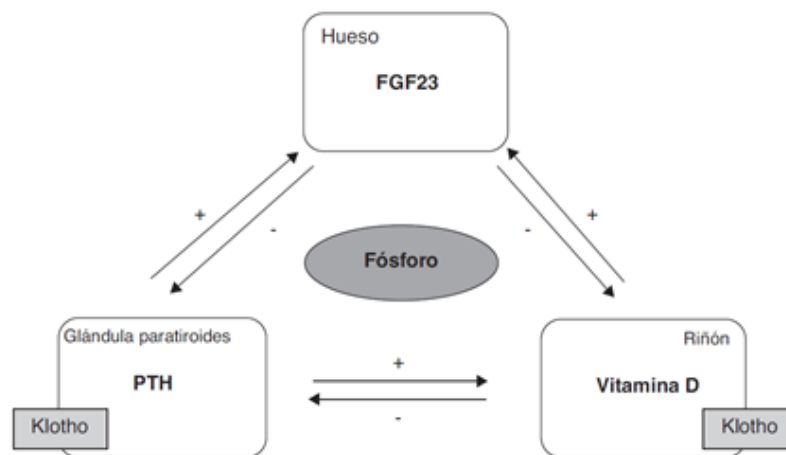
milagroso²⁰. Além disso, a maior concentração sérica de vitamina D também está associada ao maior risco de mortalidade e de eventos cardiovasculares^{21; 22}. Estudos experimentais verificaram que a suplementação de colecalciferol em altas doses, porém não hipercalcêmicas, teve efeito cardiovascular prejudicial^{23; 24}. Adicionalmente, em estudo anterior realizado em nosso laboratório, a suplementação com colecalciferol em ratos saudáveis, por dois meses, promoveu maior estresse oxidativo no miocárdio [maior concentração de hidroperóxido de lipídeo (HL), menor atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx)]. Neste estudo também verificamos modificações importantes no metabolismo energético do miocárdio destes animais, como: menor oxidação de ácidos graxos como substrato energético, maior uso da glicose e menor atividade da citrato sintase e complexo II²³. Quando esta suplementação foi realizada por quatro meses, observamos hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica²⁵.

Portanto, no coração, a vitamina D exerce curva "dose-resposta" bifásica, ou seja, menores e maiores concentrações séricas de 25(OH)D₃ estão associados a maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares²¹. Estas alterações cardíacas são desencadeadas por alguma agressão ao coração que promove alterações celulares, intersticiais e moleculares, denominadas remodelação cardíaca. Inicialmente, as alterações morfológicas são importantes para a manutenção da função cardíaca. No entanto, cronicamente essas alterações podem modificar a forma, a geometria e a massa cardíaca, promovendo disfunção diastólica e/ou sistólica^{26; 27}. Entre as alterações celulares e moleculares que ocorrem no processo de remodelação cardíaca estão o estresse oxidativo, a inflamação, a apoptose, e alterações no metabolismo energético cardíaco, as quais podem progredir com hipertrofia e disfunção ventricular^{24; 28; 29}.

A vitamina D atua na homeostase da concentração sérica de cálcio e fósforo por meio de órgãos com o intestino, rins e ossos. No intestino, esta vitamina pode aumentar a absorção destes eletrólitos por mecanismos genômicos e não genômicos^{30; 31; 32}. Nos rins, ela pode agir na reabsorção de cálcio e fósforo nos túbulos renais^{33; 34} e nos ossos, pode atuar por meio da mineralização óssea^{35; 36}. Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, animais suplementados com colecalciferol apresentaram maiores concentrações séricas de fósforo²³. Nestas situações de hiperfosfatemia, há consequências para metabolismo mineral e ósseo, como: hiperplasia na paratireoide, maior rigidez arterial periférica, maior calcificação vascular, além de maior risco de doenças cardiovasculares, de infecções, maior taxa de

fragilidade do osso e maior risco de mortalidade ^{37; 38}. Neste contexto, um dos principais hormônios que contribuem para regular a homeostase do fósforo é o fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) (Figura 1) ³⁹.

Figura 1. Reguladores de Fósforo.



Fonte: Donate-Correa, et al., 2013 ⁴⁰

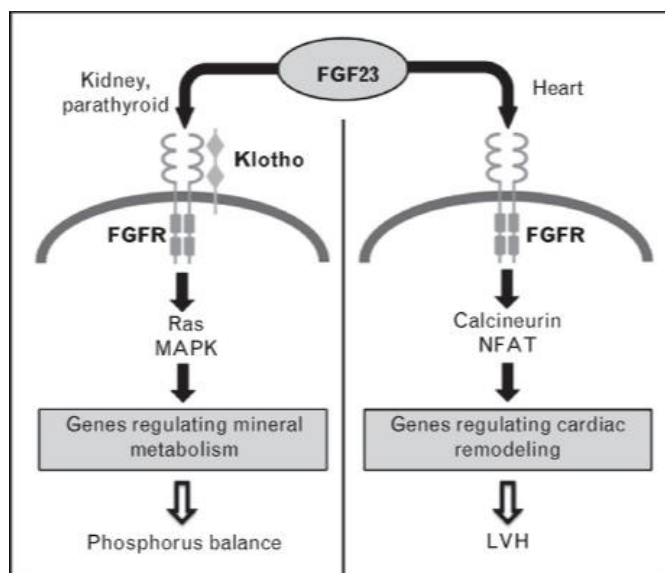
Os principais reguladores de fósforo são: fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23), vitamina D e paratormônio (PTH). Quando a concentração sérica de fósforo aumenta, o FGF-23 também aumenta para realizar sua ação fosfatúrica e regular a concentração de fósforo. Além disso, FGF-23 suprime a concentração de vitamina D de forma direta e indireta (suprimindo a concentração de PTH). Por sua vez, concentração de vitamina D e do PTH aumentam a concentração de FGF-23. O PTH aumenta a concentração de vitamina D e esta suprime a concentração de PTH. Desta maneira, conseguimos observar a complexidade destes mecanismos e seus feedbacks negativos e positivos.

O FGF-23 foi recentemente descoberto, sendo secretado principalmente pelos osteócitos e osteoblastos ^{41; 42}. Este hormônio contém 251 aminoácidos e pertence ao subgrupo de FGFs endócrinos, ou seja, ele pode atuar na circulação sistêmica por meio de um de seus quatro receptores da família dos FGF (FGFRs) ⁴³. O FGF-23 exerce como função: regular a homeostase de fósforo, o metabolismo da vitamina D e a mineralização óssea ^{36; 41; 44}. Especificamente, ele induz a excreção urinária de fósforo, inibe a formação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, e suprime a síntese de paratormônio (PTH) ^{45; 46}. A maior concentração sérica de FGF-23 pode ocorrer em resposta a diferentes situações, como: aumento do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sérico, elevada concentração de fósforo extracelular e/ou na dieta, na remodelação cardíaca, na fibrose cardíaca, dentre outras ^{47; 48; 49; 50; 51}. Este aumento da concentração sérica de FGF-23 está associado a maior frequência de eventos cardiovasculares, não apenas em pacientes com doença renal, mas também em pacientes com função renal preservada ^{52; 53; 54}. Desta

maneira, FGF-23 pode ter efeitos adicionais sobre o coração e pode estar relacionado à hipercalcemia e contratilidade cardíaca⁵⁵.

Como ilustrado na figura 2, para que o FGF-23 exerça seu efeito fosfatúrico é necessário que se ligue a um dos FGFRs^{56; 57}. Nesta ligação atuam como co-receptores os proteoglicanos heparan-sulfato e a proteína *Klotho*. Esta proteína é expressa, principalmente, nos túbulos proximais renais, glândula paratireoide e no plexo coróide do cérebro⁵⁸. No entanto, no coração não se encontrou a expressão de *Klotho*^{59; 60}. Desta maneira, outros autores sugerem que o FGF-23 promove sua ação no coração por meio da via de sinalização calcineurina/ fator nuclear de células T ativadas (NFAT)^{61; 62}. Nesta via de sinalização, a calcineurina desfosforila o fator de transcrição NFAT presente no citoplasma e promove sua translocação para o núcleo celular. No núcleo, ele se liga ao DNA e aumenta a transcrição gênica, além de interagir com o fator de transcrição GATA-4. Este fator de transcrição é regulador chave de genes cardíacos, que estão relacionados à remodelação cardíaca e, consequentemente, associados à insuficiência cardíaca^{63; 64}.

Figura 2. Vias de sinalização do FGF-23 em células-alvo, ação clássica e no cardiomiócito.



Fonte: Faul, 2012⁵⁰

Esquerda: Nas glândulas renais e na paratireoide, a sinalização do fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) ocorre por meio dos receptores da família dos FGF (FGFRs) e do co-receptor *Klotho*. A ligação de FGF-23/ *Klotho* ao FGFR estimula a autofosforilação do receptor tirosina-quinase e induz a sinalização, principalmente, da via das proteínas do sarcoma vírus (RAS) e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Assim, ocorre maior expressão de genes que regulam o metabolismo mineral e, consequentemente, regulam a homeostase de fósforo.

Direita: No coração, FGF-23 se liga ao FGFR e estimula a via de sinalização independente de *Klotho*, levando em conta que esta proteína não está expressa nos cardiomiócitos. Nesta via, encontra-se calcineurina e fator nuclear de células T ativadas (NFAT). Calcineurina/NFAT aumentam a expressão de genes que regulam a remodelação cardíaca e promovem hipertrofia do ventrículo esquerdo.

Neste contexto, tanto a suplementação de vitamina D como a elevada concentração de fósforo na dieta promovem maior concentração sérica de FGF-23^{47; 65}. A restrição de fósforo na dieta é uma prática difícil, devido ao seu elevado consumo nas dietas ocidentais. Assim, pacientes que necessitam desta restrição fazem uso de inibidores de absorção de fósforo. Dentre estes inibidores, tem-se utilizado o sevelamer. Este medicamento é polímero catiônico (polialilamina-hidroclorada), exerce sua função sem que seja absorvido pelo organismo, além de ser livre de alumínio e cálcio^{66; 67}. O sevelamer é composto por múltiplas aminas espaçadas por moléculas de carbono que, no intestino, interagem com moléculas de ânion fosfato, inibindo sua absorção e promovendo sua excreção fecal⁶⁸. Em apenas 5% dos pacientes que fazem uso do sevelamer foi possível observar reações adversas como: vômitos, náusea, diarreia, dispepsia, dor abdominal, flatulência e constipação⁶⁹. Adicionalmente, o tratamento com sevelamer foi benéfico em marcadores de calcificação coronária e aórtica. Em tratamento de longo prazo, o uso de sevelamer promoveu reduções sustentadas no fósforo sérico e na relação Ca x P, além de menor concentração sérica de FGF-23 e de PTH^{70; 71; 72}.

A suplementação com colecalciferol por 4 meses promoveu alterações cardíacas morfológicas, além de alterações no estresse oxidativo e no metabolismo energético. No entanto, o mecanismo envolvido neste processo de remodelação cardíaca não foi via hiperfosfatemia, FGF-23 e calcineurina/NFAT miocárdica. Adicionalmente, o uso do sevelamer em ratos normofosfatêmicos, promoveu alterações cardíacas morfológicas e funcionais, além de modificar o metabolismo energético. Possível mecanismo seria via calcineurina.

1. Holick, M. F., Lu, Z. & Chen, T. C. (1992). Aging on the photobiology of vitamin D3. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **Spec No**, 236-9.
2. Borel, P., Caillaud, D. & Cano, N. J. (2015). Vitamin D bioavailability: state of the art. *Crit Rev Food Sci Nutr* **55**, 1193-205.
3. Wilson, L. R., Tripkovic, L., Hart, K. H. & Lanham-New, S. A. (2017). Vitamin D deficiency as a public health issue: using vitamin D2 or vitamin D3 in future fortification strategies. *Proc Nutr Soc* **76**, 392-399.
4. Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* **357**, 266-81.
5. Macdonald, H. M. (2013). Contributions of sunlight and diet to vitamin D status. *Calcif Tissue Int* **92**, 163-76.
6. Ferreira, P. P., Cangussu, L., Bueloni-Dias, F. N., Orsatti, C. L., Schmitt, E. B., Nahas-Neto, J. & Nahas, E. A. P. (2020). Vitamin D supplementation improves the metabolic syndrome risk profile in postmenopausal women. *Climacteric* **23**, 24-31.
7. Fajardo, V. C., de Oliveira, F. L. P., Machado-Coelho, G. L. L., Pimenta, F. A. P., de Freitas, S. N., Ribeiro, A. L. P., Soares, M. M. S., Lauria, M. W., Farias, R. D. C., Franca, I. B. & do Nascimento Neto, R. M. (2019). Effects of vitamin D supplementation on cardiovascular risk factors in shift workers: Study protocol for randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Medicine (Baltimore)* **98**, e15417.
8. Cocate, P. G., Kac, G., Heitmann, B. L., Nadanovsky, P., da Veiga Soares Carvalho, M. C., Benaim, C., Schlussek, M. M., de Castro, M. B. T., Alves-Santos, N. H., Baptista, A. F., Holick, M. F., Mokhtar, R. R., Bomfim, A. R. & Adegboye, A. R. A. (2019). Calcium and vitamin D supplementation and/or periodontal therapy in the treatment of periodontitis among Brazilian pregnant women: protocol of a feasibility randomised controlled trial (the IMPROVE trial). *Pilot Feasibility Stud* **5**, 38.
9. Jones, G. (2012). Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **243**, 7-13.
10. Lips, P. (2006). Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* **92**, 4-8.
11. Mizwicki, M. T. & Norman, A. W. (2009). The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal* **2**, re4.
12. Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y. & Yodoi, J. (1999). Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* **274**, 21645-50.
13. Patwari, P., Higgins, L. J., Chutkow, W. A., Yoshioka, J. & Lee, R. T. (2006). The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem* **281**, 21884-91.
14. Ahsan, M. K., Lekli, I., Ray, D., Yodoi, J. & Das, D. K. (2009). Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2741-58.
15. Yu, Y., Xing, K., Badamas, R., Kuszynski, C. A., Wu, H. & Lou, M. F. (2013). Overexpression of thioredoxin-binding protein 2 increases oxidation sensitivity and apoptosis in human lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med* **57**, 92-104.
16. Pludowski, P., Grant, W. B., Konstantynowicz, J. & Holick, M. F. (2019). Editorial: Classic and Pleiotropic Actions of Vitamin D. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 341.
17. Assalin, H. B., Rafacho, B. P., dos Santos, P. P., Ardisson, L. P., Roscani, M. G., Chiuso-Minicucci, F., Barbisan, L. F., Fernandes, A. A., Azevedo, P. S., Minicucci,

- M. F., Zornoff, L. A. & de Paiva, S. A. (2013). Impact of the length of vitamin D deficiency on cardiac remodeling. *Circ Heart Fail* **6**, 809-16.
18. Andrukhova, O., Slavic, S., Zeitz, U., Riesen, S. C., Heppelmann, M. S., Ambrisko, T. D., Markovic, M., Kuebler, W. M. & Erben, R. G. (2014). Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol Endocrinol* **28**, 53-64.
19. Pludowski, P., Holick, M. F., Pilz, S., Wagner, C. L., Hollis, B. W., Grant, W. B., Shoenfeld, Y., Lerchbaum, E., Llewellyn, D. J., Kienreich, K. & Soni, M. (2013). Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. *Autoimmun Rev* **12**, 976-89.
20. Pludowski, P., Holick, M. F., Grant, W. B., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M. R., Haq, A., Povoroznyuk, V., Balatska, N., Barbosa, A. P., Karonova, T., Rudenka, E., Misiorowski, W., Zakharova, I., Rudenka, A., Lukaszkiwicz, J., Marciniowska-Suchowierska, E., Laszcz, N., Abramowicz, P., Bhattoa, H. P. & Wimalawansa, S. J. (2018). Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol* **175**, 125-135.
21. Dror, Y., Givon, S. M., Hoshen, M., Feldhamer, I., Balicer, R. D. & Feldman, B. S. (2013). Vitamin D levels for preventing acute coronary syndrome and mortality: evidence of a nonlinear association. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, 2160-7.
22. Zittermann, A., Schleithoff, S. S. & Koerfer, R. (2007). Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* **18**, 41-6.
23. Santos, P. P., Rafacho, B. P., Goncalves Ade, F., Jaldin, R. G., Nascimento, T. B., Silva, M. A., Cau, S. B., Roscani, M. G., Azevedo, P. S., Minicucci, M. F., Tostes Rde, C., Zornoff, L. A. & Paiva, S. A. (2014). Vitamin D induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties. *PLoS One* **9**, e98895.
24. Goncalves, A. F., Santos, P. P., Rafacho, B. P., Batista, D. F., Azevedo, P. S., Minicucci, M. F., Polegato, B. F., Chiuso-Minicucci, F., Okoshi, K., Fernandes, A. A., Paiva, S. A. & Zornoff, L. A. (2014). Vitamin D supplementation intensifies cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol* **176**, 1225-6.
25. Santos, P. P. (2015). Influência da Suplementação da Ração com Diferentes Doses de Vitamina D sobre a Proteína de Interação com a Tiorredoxina (TXNIP) no Coração e suas Vias de Sinalização, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
26. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* **35**, 569-82.
27. Swynghedauw, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**, 215-62.
28. Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J. & Pfeffer, M. A. (2006). Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* **367**, 356-67.
29. Stanley, W. C., Recchia, F. A. & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* **85**, 1093-129.
30. Norman, A. W. (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* **147**, 5542-8.

31. Castro, L. C. (2011). [The vitamin D endocrine system]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **55**, 566-75.
32. Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Fukumoto, S. & Yamashita, T. (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* **19**, 429-35.
33. Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C. & Demay, M. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* **29**, 726-76.
34. Qin, X. & Wang, X. (2019). Role of vitamin D receptor in the regulation of CYP3A gene expression. *Acta Pharm Sin B* **9**, 1087-1098.
35. Christakos, S., Li, S., DeLa Cruz, J., Verlinden, L. & Carmeliet, G. (2019). Vitamin D and Bone. *Handb Exp Pharmacol*.
36. Bergwitz, C. & Juppner, H. (2010). Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* **61**, 91-104.
37. Roman-Garcia, P., Carrillo-Lopez, N., Fernandez-Martin, J. L., Naves-Diaz, M., Ruiz-Torres, M. P. & Cannata-Andia, J. B. (2010). High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. *Bone* **46**, 121-8.
38. Hruska, K., Mathew, S., Lund, R., Fang, Y. & Sugatani, T. (2011). Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: does phosphate qualify? *Kidney Int Suppl*, S9-13.
39. Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S. & Yamashita, T. (2001). Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6500-5.
40. Donate-Correa, J., Muros-de-Fuentes, M., Mora-Fernandez, C. & Navarro-Gonzalez, J. F. (2013). [Fibroblast growth factor 23/Klotho system in the context of cardiovascular damage]. *Med Clin (Barc)* **140**, 420-3.
41. Hu, M. C., Shiizaki, K., Kuro-o, M. & Moe, O. W. (2013). Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol* **75**, 503-33.
42. Donate-Correa, J., Muros-de-Fuentes, M., Mora-Fernandez, C. & Navarro-Gonzalez, J. F. (2012). FGF23/Klotho axis: phosphorus, mineral metabolism and beyond. *Cytokine Growth Factor Rev* **23**, 37-46.
43. Kuro-o, M. (2010). Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol* **25**, 583-90.
44. Bonewald, L. F. & Wacker, M. J. (2013). FGF23 production by osteocytes. *Pediatr Nephrol* **28**, 563-8.
45. Wolf, M. (2012). Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int* **82**, 737-47.
46. Heine, G. H., Seiler, S. & Fliser, D. (2012). FGF-23: the rise of a novel cardiovascular risk marker in CKD. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 3072-81.
47. Kagi, L., Bettoni, C., Pastor-Arroyo, E. M., Schnitzbauer, U., Hernando, N. & Wagner, C. A. (2018). Regulation of vitamin D metabolizing enzymes in murine renal and extrarenal tissues by dietary phosphate, FGF23, and 1,25(OH)2D3. *PLoS One* **13**, e0195427.
48. Barthel, T. K., Mathern, D. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Hopper, H. A. t., Hsieh, J. C., Slater, S. A., Hsieh, G., Kaczmarek, M., Jurutka, P. W., Kolek, O. I., Ghishan, F. K. & Haussler, M. R. (2007). 1,25-Dihydroxyvitamin D3/VDR-mediated

- induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**, 381-8.
49. Hori, M., Kinoshita, Y., Taguchi, M. & Fukumoto, S. (2016). Phosphate enhances Fgf23 expression through reactive oxygen species in UMR-106 cells. *J Bone Miner Metab* **34**, 132-9.
 50. Faul, C. (2012). Fibroblast growth factor 23 and the heart. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **21**, 369-75.
 51. Perwad, F., Azam, N., Zhang, M. Y., Yamashita, T., Tenenhouse, H. S. & Portale, A. A. (2005). Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology* **146**, 5358-64.
 52. Ix, J. H., Katz, R., Kestenbaum, B. R., de Boer, I. H., Chonchol, M., Mukamal, K. J., Rifkin, D., Siscovick, D. S., Sarnak, M. J. & Shlipak, M. G. (2012). Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *J Am Coll Cardiol* **60**, 200-7.
 53. Lutsey, P. L., Alonso, A., Selvin, E., Pankow, J. S., Michos, E. D., Agarwal, S. K., Loefer, L. R., Eckfeldt, J. H. & Coresh, J. (2014). Fibroblast growth factor-23 and incident coronary heart disease, heart failure, and cardiovascular mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *J Am Heart Assoc* **3**, e000936.
 54. Mathew, J. S., Sachs, M. C., Katz, R., Patton, K. K., Heckbert, S. R., Hoofnagle, A. N., Alonso, A., Chonchol, M., Deo, R., Ix, J. H., Siscovick, D. S., Kestenbaum, B. & de Boer, I. H. (2014). Fibroblast growth factor-23 and incident atrial fibrillation: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and the Cardiovascular Health Study (CHS). *Circulation* **130**, 298-307.
 55. Touchberry, C. D., Green, T. M., Tchikrizov, V., Mannix, J. E., Mao, T. F., Carney, B. W., Girgis, M., Vincent, R. J., Wetmore, L. A., Dawn, B., Bonewald, L. F., Stubbs, J. R. & Wacker, M. J. (2013). FGF23 is a novel regulator of intracellular calcium and cardiac contractility in addition to cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**, E863-73.
 56. Kocelak, P., Olszanecka-Glinianowicz, M. & Chudek, J. (2012). Fibroblast growth factor 23--structure, function and role in kidney diseases. *Adv Clin Exp Med* **21**, 391-401.
 57. Liu, S. & Quarles, L. D. (2007). How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol* **18**, 1637-47.
 58. Matsumura, Y., Aizawa, H., Shiraki-Iida, T., Nagai, R., Kuro-o, M. & Nabeshima, Y. (1998). Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 626-30.
 59. Leifheit-Nestler, M. & Haffner, D. (2018). Paracrine Effects of FGF23 on the Heart. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 278.
 60. Leifheit-Nestler, M., Grosse Siemer, R., Flasbart, K., Richter, B., Kirchhoff, F., Ziegler, W. H., Klintschar, M., Becker, J. U., Erbersdobler, A., Aufricht, C., Seeman, T., Fischer, D. C., Faul, C. & Haffner, D. (2016). Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **31**, 1088-99.
 61. Itoh, N. & Ohta, H. (2013). Pathophysiological roles of FGF signaling in the heart. *Front Physiol* **4**, 247.

62. Grabner, A., Amaral, A. P., Schramm, K., Singh, S., Sloan, A., Yanucil, C., Li, J., Shehadeh, L. A., Hare, J. M., David, V., Martin, A., Fornoni, A., Di Marco, G. S., Kentrup, D., Reuter, S., Mayer, A. B., Pavenstadt, H., Stypmann, J., Kuhn, C., Hille, S., Frey, N., Leifheit-Nestler, M., Richter, B., Haffner, D., Abraham, R., Bange, J., Sperl, B., Ullrich, A., Brand, M., Wolf, M. & Faul, C. (2015). Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab* **22**, 1020-32.
63. Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. & Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-28.
64. Vega, R. B., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. (2003). Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem* **278**, 36981-4.
65. Raya, A. I., Rios, R., Pineda, C., Rodriguez-Ortiz, M. E., Diez, E., Almaden, Y., Munoz-Castaneda, J. R., Rodriguez, M., Aguilera-Tejero, E. & Lopez, I. (2016). Energy-dense diets increase FGF23, lead to phosphorus retention and promote vascular calcifications in rats. *Sci Rep* **6**, 36881.
66. Burke, S. K., Slatopolsky, E. A. & Goldberg, D. I. (1997). RenaGel, a novel calcium- and aluminium-free phosphate binder, inhibits phosphate absorption in normal volunteers. *Nephrol Dial Transplant* **12**, 1640-4.
67. Slatopolsky, E. A., Burke, S. K. & Dillon, M. A. (1999). RenaGel, a nonabsorbed calcium- and aluminum-free phosphate binder, lowers serum phosphorus and parathyroid hormone. The RenaGel Study Group. *Kidney Int* **55**, 299-307.
68. Bronden, A., Hansen, M., Sonne, D. P., Rohde, U., Vilsboll, T. & Knop, F. K. (2015). Sevelamer in a diabetologist's perspective: a phosphate-binding resin with glucose-lowering potential. *Diabetes Obes Metab* **17**, 116-20.
69. (2011). Sevelamer. Initial US Approval: 2000. Revised May 2011. edit. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research
70. Cannata-Andia, J. B. & Martin, K. J. (2015). The challenge of controlling phosphorus in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*.
71. Chertow, G. M., Burke, S. K., Dillon, M. A. & Slatopolsky, E. (1999). Long-term effects of sevelamer hydrochloride on the calcium x phosphate product and lipid profile of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* **14**, 2907-14.
72. Chertow, G. M., Burke, S. K., Raggi, P. & Treat to Goal Working, G. (2002). Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* **62**, 245-52.
73. Hrubec, Z. & Neel, J. V. (1978). The National Academy of Sciences--National Research Council Twin Registry: ten years of operation. *Prog Clin Biol Res* **24 Pt B**, 153-72.
74. (IOM), I. o. M. (2011). In *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D* (Ross, A. C., Taylor, C. L., Yaktine, A. L. & Del Valle, H. B., eds.), Washington (DC).
75. Shephard, R. M. & Deluca, H. F. (1980). Plasma concentrations of vitamin D3 and its metabolites in the rat as influenced by vitamin D3 or 25-hydroxyvitamin D3 intakes. *Arch Biochem Biophys* **202**, 43-53.
76. Nagano, N., Miyata, S., Abe, M., Kobayashi, N., Wakita, S., Yamashita, T. & Wada, M. (2006). Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF23 in renal failure rats. *Kidney Int* **69**, 531-7.

77. Turpeinen, U., Hohenthal, U. & Stenman, U. H. (2003). Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay. *Clin Chem* **49**, 1521-4.
78. Zhang, Y., Huang, Y., Cantalupo, A., Azevedo, P. S., Siragusa, M., Bielawski, J., Giordano, F. J. & Di Lorenzo, A. (2016). Endothelial Nogo-B regulates sphingolipid biosynthesis to promote pathological cardiac hypertrophy during chronic pressure overload. *JCI Insight* **1**.
79. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
80. Robinson, K. M., Janes, M. S., Pehar, M., Monette, J. S., Ross, M. F., Hagen, T. M., Murphy, M. P. & Beckman, J. S. (2006). Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15038-43.
81. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., 2nd & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* **52**, 1-6.
82. Cassina, A. & Radi, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* **328**, 309-16.
83. Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. & Wolff, S. P. (1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**, 853-6.
84. Ewing, J. F. & Janero, D. R. (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem* **232**, 243-8.
85. Nakamura, M., Hojoda, S. & Hayashi, K. (1974). Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* **358**, 251-261.
86. Aebi, H. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. 2 edit, Verlag chemie Weinheim, New York.
87. Wilkinson, J. H. & Withycombe, W. A. (1965). Organ specificity and lactate-dehydrogenase activity. Some properties of human spermatozoal lactate dehydrogenase. *Biochem J* **97**, 663-8.
88. Bass, A., Brdiczka, D., Eyer, P., Hofer, S. & Pette, D. (1969). Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem* **10**, 198-206.
89. Singer, T. P. (1974). Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal* **22**, 123-75.
90. Desai, V. G., Weindruch, R., Hart, R. W. & Feuers, R. J. (1996). Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys* **333**, 145-51.
91. Sahn, D. J., DeMaria, A., Kisslo, J. & Weyman, A. (1978). Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* **58**, 1072-83.
92. Watson, L. E., Sheth, M., Denyer, R. F. & Dostal, D. E. (2004). Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr* **17**, 161-7.
93. Slama, M., Ahn, J., Peltier, M., Maizel, J., Chemla, D., Varagic, J., Susic, D., Tribouilloy, C. & Frohlich, E. D. (2005). Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1131-6.

94. Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S. & Stanley, W. C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 207-58.
95. Mahan, L. K. & Escott-Stump, M. (2005). *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*, 11, Rocca, São Paulo.
96. Norman, A. W. (1990). Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormone-mediated adaptive response. *Am J Clin Nutr* **51**, 290-300.
97. Vakiti, A. & Mewawalla, P. (2019). Malignancy-Related Hypercalcemia. In *StatPearls*, Treasure Island (FL).
98. Holick, M. F. (2015). Vitamin D Is Not as Toxic as Was Once Thought: A Historical and an Up-to-Date Perspective. *Mayo Clin Proc* **90**, 561-4.
99. O'Connell, T. D., Giacherio, D. A., Jarvis, A. K. & Simpson, R. U. (1995). Inhibition of cardiac myocyte maturation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* **136**, 482-8.
100. Foley, R. N., Collins, A. J., Herzog, C. A., Ishani, A. & Kalra, P. A. (2009). Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol* **20**, 397-404.
101. Navarro-Garcia, J. A., Fernandez-Velasco, M., Delgado, C., Delgado, J. F., Kuro, O. M., Ruilope, L. M. & Ruiz-Hurtado, G. (2018). PTH, vitamin D, and the FGF-23-klotho axis and heart: Going beyond the confines of nephrology. *Eur J Clin Invest* **48**.
102. Hagenau, T., Vest, R., Gissel, T. N., Poulsen, C. S., Erlandsen, M., Mosekilde, L. & Vestergaard, P. (2009). Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int* **20**, 133-40.
103. Schuch, N. J., Garcia, V. C. & Martini, L. A. (2009). [Vitamin D and endocrine diseases]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **53**, 625-33.
104. Banerjee, S., Basu, S., Akhtar, S., Sinha, R., Sen, A. & Sengupta, J. (2019). Free vitamin D levels in steroid-sensitive nephrotic syndrome and healthy controls. *Pediatr Nephrol*.
105. Heaney, R. P., Barger-Lux, M. J., Dowell, M. S., Chen, T. C. & Holick, M. F. (1997). Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4111-6.
106. Barger-Lux, M. J., Heaney, R. P., Lanspa, S. J., Healy, J. C. & DeLuca, H. F. (1995). An investigation of sources of variation in calcium absorption efficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 406-11.
107. Devine, A., Wilson, S. G., Dick, I. M. & Prince, R. L. (2002). Effects of vitamin D metabolites on intestinal calcium absorption and bone turnover in elderly women. *Am J Clin Nutr* **75**, 283-8.
108. Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., Fujita, T., Fukumoto, S. & Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* **444**, 770-4.
109. Kovesdy, C. P. & Quarles, L. D. (2013). Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol Dial Transplant* **28**, 2228-36.
110. Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Baum, M. G., Schiavi, S., Hu, M. C., Moe, O. W. & Kuro-o, M. (2006). Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* **281**, 6120-3.
111. Khuituan, P., Teerapornpuntakit, J., Wongdee, K., Suntornsaratoon, P., Konthapakdee, N., Sangsaksri, J., Sripong, C., Krishnamra, N. & Charoenphandhu, N. (2012).

- Fibroblast growth factor-23 abolishes 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-enhanced duodenal calcium transport in male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E903-13.
112. Khuituan, P., Wongdee, K., Jantarajit, W., Suntornsaratoon, P., Krishnamra, N. & Charoenphandhu, N. (2013). Fibroblast growth factor-23 negates 1,25(OH)₂D₃-induced intestinal calcium transport by reducing the transcellular and paracellular calcium fluxes. *Arch Biochem Biophys* **536**, 46-52.
 113. Quinn, S. J., Thomsen, A. R., Pang, J. L., Kantham, L., Brauner-Osborne, H., Pollak, M., Goltzman, D. & Brown, E. M. (2013). Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**, E310-20.
 114. Wongdee, K., Rodrat, M., Teerapornpuntakit, J., Krishnamra, N. & Charoenphandhu, N. (2019). Factors inhibiting intestinal calcium absorption: hormones and luminal factors that prevent excessive calcium uptake. *J Physiol Sci* **69**, 683-696.
 115. Lofrese, J. J., Basit, H. & Lappin, S. L. (2019). Physiology, Parathyroid. In *StatPearls*, Treasure Island (FL).
 116. Rudin, A. V., McKenzie, T. J., Wermer, R. A., Thompson, G. B. & Lyden, M. L. (2019). Primary Hyperparathyroidism: Redefining Cure. *Am Surg* **85**, 214-218.
 117. Khan, M. & Sharma, S. (2019). Physiology, Parathyroid Hormone (PTH). In *StatPearls*, Treasure Island (FL).
 118. Stemmer, P. M. & Klee, C. B. (1994). Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* **33**, 6859-66.
 119. Su, Q., Zhao, M., Weber, E., Eugster, H. P. & Ryffel, B. (1995). Distribution and activity of calcineurin in rat tissues. Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin B. *Eur J Biochem* **230**, 469-74.
 120. Yu, H., van Berkel, T. J. & Biessen, E. A. (2007). Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Rev* **25**, 175-87.
 121. van Rooij, E., Doevendans, P. A., Crijns, H. J., Heeneman, S., Lips, D. J., van Bilsen, M., Williams, R. S., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., Rothermel, B. A. & De Windt, L. J. (2004). MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* **94**, e18-26.
 122. Hill, J. A., Rothermel, B., Yoo, K. D., Cabuay, B., Demetroulis, E., Weiss, R. M., Kutschke, W., Bassel-Duby, R. & Williams, R. S. (2002). Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *J Biol Chem* **277**, 10251-5.
 123. Rao, A., Luo, C. & Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-47.
 124. Putt, M. E., Hannenhalli, S., Lu, Y., Haines, P., Chandrupatla, H. R., Morrissey, E. E., Margulies, K. B. & Cappola, T. P. (2009). Evidence for coregulation of myocardial gene expression by MEF2 and NFAT in human heart failure. *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 212-9.
 125. Das, K. C., Lewis-Molock, Y. & White, C. W. (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**, 713-26.
 126. Inarrea, P., Moini, H., Han, D., Rettori, D., Aguilo, I., Alava, M. A., Iturralde, M. & Cadenas, E. (2007). Mitochondrial respiratory chain and thioredoxin reductase regulate intermembrane Cu,Zn-superoxide dismutase activity: implications for mitochondrial energy metabolism and apoptosis. *Biochem J* **405**, 173-9.

127. Yoshioka, J., Chutkow, W. A., Lee, S., Kim, J. B., Yan, J., Tian, R., Lindsey, M. L., Feener, E. P., Seidman, C. E., Seidman, J. G. & Lee, R. T. (2012). Deletion of thioredoxin-interacting protein in mice impairs mitochondrial function but protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* **122**, 267-79.
128. Azevedo, P. S., Minicucci, M. F., Santos, P. P., Paiva, S. A. & Zornoff, L. A. (2013). Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev* **21**, 135-40.
129. Abe, M., Okada, K. & Soma, M. (2013). Mineral metabolic abnormalities and mortality in dialysis patients. *Nutrients* **5**, 1002-23.
130. Amiri, F. S. (2015). Contemporary management of phosphorus retention in chronic kidney disease: a review. *Clin Exp Nephrol* **19**, 985-99.
131. Ketteler, M., Liangos, O. & Biggar, P. H. (2016). Treating hyperphosphatemia - current and advancing drugs. *Expert Opin Pharmacother* **17**, 1873-9.
132. Sesso, R. & Ferraz, M. B. (2003). [Critical appraisal of sevelamer for the treatment of hyperphosphatemia in patients with chronic renal failure]. *Rev Assoc Med Bras (1992)* **49**, 103-8.
133. Antoniucci, D. M., Yamashita, T. & Portale, A. A. (2006). Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 3144-9.
134. Burnett, S. M., Gunawardene, S. C., Bringhurst, F. R., Juppner, H., Lee, H. & Finkelstein, J. S. (2006). Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res* **21**, 1187-96.
135. Rastogi, A. (2013). Sevelamer revisited: pleiotropic effects on endothelial and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* **7**, 322-42.
136. Chertow, G. M., Dillon, M., Burke, S. K., Steg, M., Bleyer, A. J., Garrett, B. N., Domoto, D. T., Wilkes, B. M., Wombolt, D. G. & Slatopolsky, E. (1999). A randomized trial of sevelamer hydrochloride (RenaGel) with and without supplemental calcium. Strategies for the control of hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* **51**, 18-26.
137. Susantitaphong, P. & Jaber, B. L. (2012). Potential interaction between sevelamer and fat-soluble vitamins: a hypothesis. *Am J Kidney Dis* **59**, 165-7.
138. Pierce, D., Hossack, S., Poole, L., Robinson, A., Van Heusen, H., Martin, P. & Smyth, M. (2011). The effect of sevelamer carbonate and lanthanum carbonate on the pharmacokinetics of oral calcitriol. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 1615-21.
139. Parra, V. & Rothermel, B. A. (2017). Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *J Mol Cell Cardiol* **103**, 121-136.
140. Witteles, R. M. & Fowler, M. B. (2008). Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J Am Coll Cardiol* **51**, 93-102.
141. Long, Q., Yang, K. & Yang, Q. (2015). Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis* **5**, 19-32.
142. Young, M. E. (2017). Circadian Control of Cardiac Metabolism: Physiologic Roles and Pathologic Implications. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **13**, 15-19.
143. Vlassara, H., Uribarri, J., Cai, W., Goodman, S., Pyzik, R., Post, J., Grosjean, F., Woodward, M. & Striker, G. E. (2012). Effects of sevelamer on HbA1c, inflammation, and advanced glycation end products in diabetic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **7**, 934-42.
144. Kakuta, T., Tanaka, R., Hyodo, T., Suzuki, H., Kanai, G., Nagaoka, M., Takahashi, H., Hirawa, N., Oogushi, Y., Miyata, T., Kobayashi, H., Fukagawa, M. & Saito, A.

- (2011). Effect of sevelamer and calcium-based phosphate binders on coronary artery calcification and accumulation of circulating advanced glycation end products in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* **57**, 422-31.
145. Vlassara, H., Cai, W., Goodman, S., Pyzik, R., Yong, A., Chen, X., Zhu, L., Neade, T., Beeri, M., Silverman, J. M., Ferrucci, L., Tansman, L., Striker, G. E. & Uribarri, J. (2009). Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 4483-91.
 146. Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M. & Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* **47 Suppl 1**, 3-27.
 147. Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-20.
 148. Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-25.
 149. Baynes, J. W. & Thorpe, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**, 1-9.
 150. Sun, Y. (2009). Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res* **81**, 482-90.