



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 TÈC. 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: Erisçila 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.

Agradecimientos

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 Giovanni, 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 fizerem 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 glutatona 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 hidroperóxido 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 colecalfiferol¹. 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 necessária 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 redutora¹³. 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 pública¹⁶. 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 sistólica¹⁷. Neste contexto, atualmente é comum encontrarmos, na população saudável, situações de eventos adversos e consumo de doses tóxicas de suplementação de vitamina D²⁰. 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

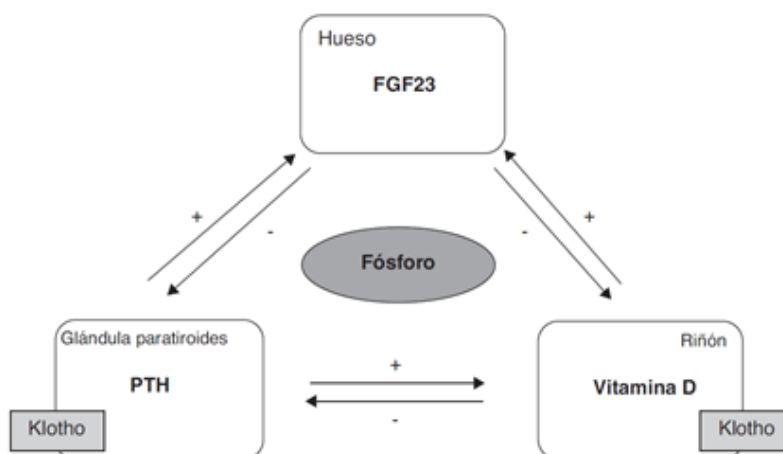
milagroso ²⁰. Além disso, a maior concentração sérica de vitamina D também está associada ao maior risco de mortalidade e de eventos cardiovasculares ^{21; 22}. Estudos experimentais verificaram que a suplementação de colecalciferol em altas doses, porém não hipercalcêmicas, teve efeito cardiovascular 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 II ²³. Quando esta suplementação foi realizada por quatro meses, observamos hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica ²⁵.

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 cardiovasculares ²¹. 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 fósforo ²³. 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

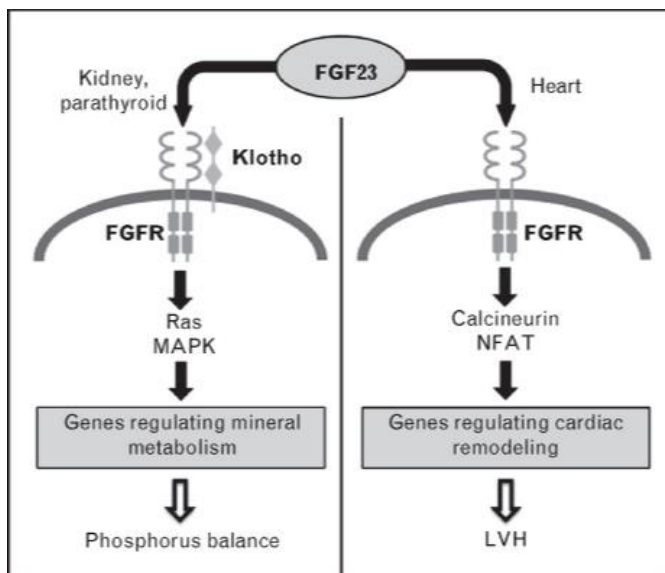
Os principais reguladores de fósforo são: fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23), vitamina D e paratormônio (PTH). Quando a concentração sérica de fósforo aumenta, o FGF-23 também aumenta para realizar sua ação fosfatúrica e regular a concentração de fósforo. Além disso, FGF-23 suprime a concentração 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(OH)₂D₃, 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(OH)₂D₃ 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, conseqüentemente, 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, conseqüentemente, 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}.

Hipótese e Objetivo

Hipótese

A suplementação de colecalciferol por 4 meses, em altas doses, porém não hipercalcêmicas, promove maior estresse oxidativo, alterações do metabolismo energético, na morfologia e função cardíaca. Essas alterações também promovem hiperfosfatemia e podem ser moduladas pelo FGF-23. Desta maneira, a menor concentração sérica de fósforo, promovida pelo tratamento de sevelamer, reverteria às alterações da remodelação cardíaca no modelo de suplementação com colecalciferol.

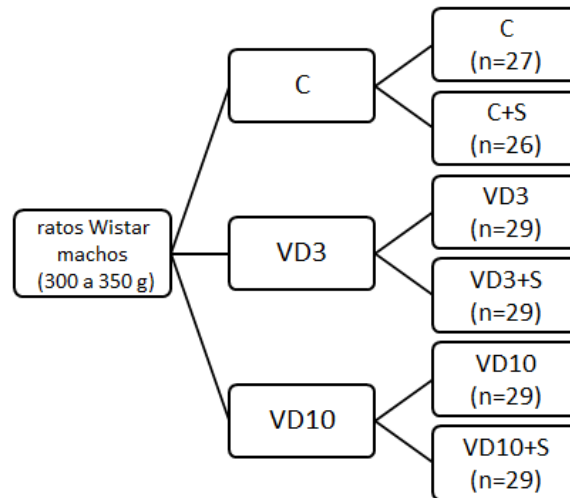
Objetivo

Verificar se o tratamento com sevelamer, ao reduzir a concentração sérica de fósforo, diminui a concentração de FGF-23 e, conseqüentemente, atenua o estresse oxidativo, alterações do metabolismo energético, na morfologia e função cardíaca, decorrentes da suplementação de colecalciferol, em altas doses, por 4 meses, em ratos

Delineamento Experimental

Foram utilizados 169 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 300 a 350 gramas acondicionados no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu. O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal de nossa instituição e está em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os animais foram expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura ambiente de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Permaneceram em gaiolas individuais, com livre acesso à água. A ingestão alimentar foi controlada diariamente e o peso corporal foi aferido semanalmente. Os animais foram alocados em seis grupos: 1) Grupo controle (C, n=27) – receberam ração sem suplementação de colecalciferol e sem adição de sevelamer; 2) Grupo sevelamer (C+S, n=26) – receberam ração sem suplementação de colecalciferol e com adição de 3% de sevelamer; 3) Grupo vitamina D 3.000UI (VD3, n=29) – receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e sem adição de sevelamer; 4) Grupo vitamina D 3.000UI com sevelamer (VD3+S, n=29) - receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol e 3% de sevelamer na ração; 5) Grupo vitamina D 10.000UI (VD10, n=29) – receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e sem adição de sevelamer; 6) Grupo vitamina D 10.000UI com sevelamer (VD10+S, n=29) - receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol e 3% de sevelamer na ração (Figura 3). Esta suplementação foi realizada por quatro meses. Após esse período, os animais foram submetidos à dosagem de fósforo urinário e avaliação ecocardiográfica, posteriormente foram eutanasiados para coleta de material biológico para realização das demais determinações.

Figura 3. Delineamento experimental.



g: gramas; C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer.

Cálculo do tamanho amostral

Para este cálculo dispomos de médias e dos desvios-padrão de estudo anterior realizado em nosso laboratório ²⁵. Como no estudo mencionado não foram realizadas muitas determinações no experimento realizado por 4 meses, escolhemos como variável o peso do átrio esquerdo. A diferença mínima detectável da média foi de 10 mg; o desvio padrão de 7 mg; o número de grupos de 6; o alfa utilizado foi de 0,01 e o poder de 0,8. O valor de alfa escolhido foi menor devido ao número de comparações realizados no teste ANOVA de duas vias. O resultado obtido foi de 19 animais por grupo.

Doses de vitamina D e sevelamer

De acordo com o National Research Council (NRC), a quantidade de vitamina D recomendada por kg de ração para ratos é de 1.000 UI ⁷³. Entretanto, não há definição de nível máximo de tolerância de ingestão para esta vitamina para estes animais. De acordo com a Dietary Reference Intakes (DRIs), realizada pelo Institute of Medicine, a necessidade média estimada de vitamina D para humanos é de 400 UI/dia e limite superior tolerável é de 4.000 UI/dia ⁷⁴. Assim, a quantidade máxima tolerável, para humanos, é dez vezes maior do que a

necessidade média estimada. Consideramos que alta dose de vitamina D para ratos é 10 vezes maior do que a dose recomendada para estes animais (10.000 UI/kg de ração). Ainda, utilizamos uma dose intermediária (3.000 UI/kg de ração) entre a recomendada pelo (NRC) e a nossa dose alta estimada.

Sinais de toxicidade como: irritabilidade, diarreia, perda de apetite, menor ganho de peso, e indicativos de calcificação foram observados em ratos suplementados com doses acima de 1.000 UI de vitamina D por dia (~ 30.000 UI/kg de ração) ⁷⁵. As doses de suplementação de colecalciferol utilizadas em nosso estudo não atingiram 1.000UI/dia. Assim, nossos animais não receberam suplementação considerada hipercalcêmica.

Em relação à dose de sevelamer, Nagano et. al, 2006, observaram que a dose de 3% de sevelamer na ração promoveu menor concentração sérica de fósforo e FGF-23 em relação a dose de 1% de sevelamer ⁷⁶. Com base neste estudo, também utilizamos a dose de 3% de sevelamer adicionado à ração.

Preparo das rações

A ração utilizada para o grupo controle e para a fabricação das rações suplementadas com colecalciferol e adição de sevelamer foi à ração comercial para ratos a base de cereais da Nuvilab® (Nuvital Nutrientes S/A, Brazil). A composição aproximada por kg de ração é de 220g de proteína, 40g de gordura, 100g de mineral, 80g de fibra, e 1.800UI de vitamina D. Para preparo da ração suplementada com colecalciferol, foram adicionados 3.000 e 10.000 UI/kg de ração, além da suplementação presente na composição da ração comercial. Levando em conta que a vitamina D é lipossolúvel, primeiramente foi diluído o colecalciferol (Sigma-Aldrich, MO, USA) em óleo de milho (10 ml/kg de ração). Adicionalmente, o óleo de milho utilizado não apresenta adição de vitamina D. Posteriormente, o colecalciferol diluído em óleo de milho foi adicionado ao farelo da ração. Em relação ao sevelamer, este foi triturado e adicionado ao farelo da ração. Em seguida, a ração foi misturada, peletizada e colocada para secar em temperatura ambiente. Após processo de secagem foi armazenada em freezer (-20°C). A ração para o grupo controle foi preparada da mesma forma, sendo adicionado apenas o óleo de milho (10 ml/kg ração).

Coleta de material biológico

Após o estudo ecocardiográfico, os animais foram eutanasiados para coleta do material biológico. Foram coletados o plasma e soro (em tubo com e sem heparina, respectivamente) e o coração dos animais.

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O soro e o plasma obtidos foram armazenados em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas. O coração foi dissecado em átrios (A), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). O VE foi seccionado em anéis, colocado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer a -80°C.

Dosagem de cálcio e fósforo séricos, fósforo urinário

As dosagens de cálcio e fósforo inorgânico foram realizadas no soro por método colorimétrico (teste kit Bioclin, Brasil). O cálcio foi dosado por meio da reação com arsenazo III, em pH neutro, formando um complexo cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade de cálcio na amostra. Em relação à determinação do fósforo, o fosfato inorgânico presente reage em meio ácido com molibdato e obtém-se o complexo fosfomolibdato, que foi reduzido pelo ácido ascórbico a azul de molibdeno, desenvolvendo-se a cor em meio arsenito/citrato. O arsenito/citrato combina-se com o excesso de molibdato impedindo sua reação posterior com o fosfato liberado dos estereis lábeis. A cor obtida foi medida entre 620 e 650 nm.

A dosagem urinária de fósforo foi realizada em apenas 12 animais (n=2, por grupo), com a finalidade de observamos modificações na excreção de fósforo nos animais que receberam suplementação de colecalciferol e/ou adição de sevelamer. Para coleta da urina, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais durante 24 horas, aproximadamente 3 dias antes da eutanásia. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para obter urina sem sedimentos. A dosagem foi realizada por meio do equipamento randômico e automático Cobas Mira (Roche Diagnostics, Switzerland), que permite mudança de vários comprimentos de onda de modo automático durante o mesmo ciclo de leitura, operando com fonte luminosa de lampejos de xenônio e com temperatura controlada através de banho de ar (20 à 40°C).

Dosagem sérica de PTH e 1,25(OH)D₂ e 25(OH)D₃

Estas determinações foram realizadas apenas no final do experimento (após 4 meses de suplementação). A dosagem de PTH e 1,25(OH)D₂ foram realizadas no soro pelo método de quimioluminescência. Neste método a reação química gera luminescência, sendo esta mensurada. A concentração de 25(OH)D₃ foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A extração de 25(OH)D₃ do soro foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Turpeinen et. al, 2003⁷⁷. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 75µl de fase móvel e 50µl foi injetado no HPLC. O método utilizado para separar os compostos também foi o descrito por Turpeinen et. al, 2003⁷⁷, porém este foi adaptado ao nosso sistema e coluna (C18 de fase reversa). A fase móvel foi composta por água e metanol (18:82, v/v), com fluxo de 1,0 ml/min, sendo o comprimento do detector de onda ultravioleta (UV) fixado em 265 nm. O aparelho empregado foi cromatógrafo Waters 2695, com detector Waters 2996-fotodiodo.

Determinação sérica de FGF-23

A determinação de FGF-23 intacto foi realizada no plasma. Para esta análise foi utilizado o método de ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (Immutopics, Inc.). A faixa de detecção do kit utilizado é de 6 - 2.500 pg/mL, sendo realizadas duas leituras (620nm e 450 nm).

Análise imunohistoquímica

O fragmento do VE foi desidratado por banhos progressivos em álcool 50%, álcool 70%, álcool absoluto e em solução de xilol, respectivamente. Em seguida foram embebidos em parafina quente e o fragmento foi incluído em um bloco de parafina por meio de um processador de tecidos (JUNG CM 1800 – Leica). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura com o uso de um micrótomo e montados sobre lâminas silanizadas de microscopia, sem a realização de coloração. Primeiramente os cortes foram desparafinados em estufa a 60°C, overnight. Após o processo de desparafinização, o tecido foi hidratado em álcool absoluto, álcool 70% e álcool 50%, respectivamente, e lavado em água destilada e deionizada. Em seguida foi realizado a recuperação antigênica, sendo as lâminas incubadas em solução de citrato 10mM, pH 6,0 à 95-100°C, por 20 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água destilada e foi realizado o bloqueio das

peroxidases endógenas com solução comercial durante 30 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2-7,4 (PBST) e foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com solução comercial durante 30 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas overnight à 4°C em anticorpos primários de calcineurina (rabbit polyclonal IgG, ab3673, diluição 1:500) e NFATc3 (rabbit polyclonal IgG, ab3447, diluição 1:500). Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em PBST e incubadas com o anticorpo secundário goat anti-rabbit por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas em PBST e incubadas com o cromógeno (3-3'-diaminobenzamida – DAB 100mg em 70mL de PBS + 3mL de água oxigenada; Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) por cinco minutos, lavadas em água destilada e contracoradas em hematoxilina de Harris (Sigma 17 Diagnostics, St. Louis, USA) por 2 minutos. Este procedimento também foi seguido de lavagens em água destilada. Em seguida os cortes foram desidratados (submersos em álcool 50%, álcool 70%, álcool absoluto e em solução de xilol, respectivamente). Para controle positivo utilizamos tecido cardíaco de rato (calcineurina) e camundongo (NFAT). Para controle negativo, utilizamos tecido cardíaco de ratos sem o anticorpo primário. Todas as lâminas foram montadas com lamínula e Entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas. A análise de imagens foi realizada com o auxílio de microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA), sendo a quantificação realizada por meio da razão entre a área positiva para coloração de calcineurina e NFAT, e a área total da seção cardíaca ⁷⁸.

Determinação da expressão proteica da TXNIP

Esta determinação foi realizada pela técnica Western Blot. A extração de proteínas totais foi realizada em amostras de VE e a concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford ⁷⁹. A quantidade de proteína utilizada foi de 50ug. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). Os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados em solução de 5% de leite em pó desnatado, por 90 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação. Após o bloqueio, as

membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico para a proteína analisada, overnight, à 4°C, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução basal e incubadas com o anticorpo secundário específico, durante 90 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente as membranas foram lavadas em solução basal e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA. As imagens foram fotografadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA). A expressão da proteína analisada foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Gel Pro.

Determinação do estresse oxidativo no tecido cardíaco

✓ Espécies reativas de oxigênio: para avaliação da produção *in situ* de espécies reativas do coração, foi utilizado dihidroetídio (DHE; Sigma) ^{80; 81}. Os cortes do VE foram encubados em DHE, WGA (marcação de membrana celular) e DAPI (marcação de núcleo). O DHE foi observado sob a fluorescência vermelha, o WGA Alexa Fluor® 488 em verde e o DAPI em azul. Os cortes foram lavados em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4. As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência e as imagens foram capturadas no aumento de 400x e analisadas no Programa ImageJ (National Institutes of Health).

Os demais marcadores de estresse oxidativo foram determinados por método colorimétrico. Primeiramente foi realizada a extração de proteína em amostras do VE, o sobrenadante foi coletado e utilizado para as determinações ⁸². As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (µQuant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software.

✓ Concentração de hidroperóxido de lipídio (HL): determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe_2^+) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90% ⁸³.

✓ Atividade da superóxido dismutase (SOD): foi determinada monitorando a inibição da redução do NBT por meio de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH2 e fenazina metassulfato ⁸⁴.

✓ Atividade da glutathiona peroxidase (GPx): foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio à mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutathiona reduzida, azida sódica, EDTA, glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada ⁸⁵.

✓ Atividade da Catalase (CAT): foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm ⁸⁶.

Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético no tecido cardíaco

As enzimas do metabolismo energético foram determinadas por método colorimétrico. Foi realizada extração de proteína em amostras do VE e o sobrenadante coletado foi utilizado para determinação da concentração de proteína total; da atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), fosfofrutoquinase (PFK), complexo piruvato desidrogenase (PDH), citrato sintase (CS) e β-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (OHADH). O pellet foi ressuspenso com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de sacarose e 2mM de EDTA, e centrifugado, para determinação da atividade da NADH-desidrogenase (Complexo I) e ATP sintase ⁸². As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μQuant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software.

✓ LDH: determinada com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH₂ ⁸⁷.

✓ PFK: determinada em meio contendo tampão TRIS-HCl (50mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂ ⁸⁸.

✓ PDH: determinado na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditiotreitól, MgCl₂, NBT, piruvato de sódio e fenazina metassulfato, onde foi medido a conversão do piruvato em acetil-CoA por meio da velocidade da redução do NAD ⁸⁸.

✓ CS: determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB, em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0 ⁸⁸.

✓ OHADH: determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH ⁸⁸.

✓ Complexo I: determinada pelo método de Singer ⁸⁹, em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80mM pH 7,4, EDTA e NADH, onde monitorou a velocidade de oxidação do NADH.

✓ ATP sintase: determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0), na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase ⁹⁰.

Avaliação ecocardiográfica

Após receberem ração durante quatro meses, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilidino. A pelagem dos animais foi raspada no tórax e estes foram posicionados em decúbito lateral para a realização do ecocardiograma. A avaliação ecocardiográfica foi realizada pelo mesmo examinador, sem que este tivesse conhecimento dos diferentes grupos dos animais.

O ecocardiógrafo utilizado foi o General Electric Medical System, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. As estruturas cardíacas foram medidas em pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos, obtendo-se a média aritmética em seguida ⁹¹.

As imagens da cavidade ventricular esquerda e da espessura da parede posterior (EDPP) foram obtidas posicionando-se o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral, entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com cursor de modo-M passando pela valva aórtica.

O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a EDPP foram medidos no momento correspondente ao seu diâmetro máximo. Já o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima de sua parede posterior. As medidas do diâmetro do átrio esquerdo (AE) e da aorta (AO) foram realizadas, especificamente, no final da sístole e diástole ventricular. A frequência cardíaca (FC) foi estimada pelo tempo entre dois batimentos cardíacos consecutivos. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o início do fluxo diastólico transmitral o final.

As outras variáveis foram derivadas das formulações descritas a seguir:

✓ Esp. Rel. VE= (2 x EDPP)/DDVE;

- ✓ Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) = $(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3$;
- ✓ Porcentagem de encurtamento (% Enc. Endo) = $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$;
- ✓ Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido para a frequência cardíaca (FC) $(TRIV/R-R) = TRIV / \sqrt{R-R}$, sendo que $R-R = 60/FC$.

Foram realizadas também algumas medidas por Doppler tissular, tais como a velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral e tricúspide (onda S'), pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral e tricúspide (E') e pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral e tricúspide (A')^{92,93}. Algumas variáveis ecocardiográficas foram normalizadas pelo peso corporal e pelo diâmetro da aorta.

Análise histológica

Os blocos de parafina foram cortados em 3-4 micrometros de espessura e os cortes foram capturados por lâminas histológicas (OCT – Tissue Tek Compound), permanecendo overnight a 60°C para a desparafinização. Após este processo, foram corados com hematoxilina e eosina para mensurar a área seccional do miócito (ASM) e com picro sirius-red para mensurar a fração intersticial de colágeno. Para estas análises, foi utilizado o microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador. O programa utilizado para analisar às imagens foi o Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Para mensurar a ASM, foram selecionadas de 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente, apresentaram forma redonda e núcleo visível no centro da célula. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular. A avaliação da fração de colágeno intersticial foi realizada pelo mesmo sistema de imagem computadorizado e programa que foram descritos anteriormente.

Análise estatística

Os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão. As variáveis com distribuição não normal foram normalizadas por meio da transformação matemática mais adequada para serem testadas no teste de ANOVA de duas vias (em que foram considerados os fatores suplementação de vitamina D e tratamento com sevelamer).

Para os dados que não conseguiram ser normalizados, foram utilizados os testes de *Kruskal-Wallis* (comparação entre os grupos: C, VD3 e VD10; e entre os grupos C+S, VD3+S e VD10+S) e *Mann-Whitney* (comparação entre os grupos C e C+S, VD3 e VD3+S, VD10 e VD10+S), sendo realizado a correção por *Bonferroni* (valor de p multiplicado por 5, visto que foram realizadas 5 comparações).

Foram analisados os efeitos da vitamina D (VitD), do sevelamer (S) e a interação entre os fatores (VitDxS) por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes. O teste ANOVA de duas vias avaliou os efeitos de cada fator sobre as variáveis estudadas, independentemente do efeito do outro fator, bem como a interação entre os dois fatores. Quando ocorre interação significativa entre os fatores ($p < 0,05$), torna-se importante identificar os grupos que apresentam diferença entre si. Para tanto, utilizamos o teste de comparações múltiplas Holm-Sidak. No caso de interação entre os fatores, os dados foram representados em gráficos de barra tridimensionais, no qual permite a visualização dos seis grupos experimentais avaliados, bem como a influência de cada fator sobre as variáveis estudadas.

Quando não houve interação entre os fatores, foram analisados os dados marginais. Neste caso foram comparados todos os animais suplementados ou não com colecalciferol (AC, AVitD3 e AVitD10). Também foram analisados os animais tratados ou não com sevelamer (comparação entre todos os animais que receberam sevelamer e todos os animais que não receberam este tratamento medicamentoso). Quando ocorreu diferença significativa na avaliação dos dados marginais, estas diferenças foram representadas em gráficos de barras e os dados expressos em média \neq desvio padrão.

Com a finalidade de avaliar se o efeito da suplementação de vitamina D foi dose dependente, foi realizado o teste de Correlação de Spearman, corrigido por *Bonferroni* (valor de p multiplicado por 2, visto que foram realizadas 2 comparações). O nível de significância adotado foi de 5%.

Para análise dos dados e a construção dos gráficos, foi utilizado software SigmaStat para Windows versão 14.0 da SPSS (Systat Software, Inc).

Peso corporal dos animais, consumo diário de ração e vitamina D

Os animais foram pesados semanalmente e os pesos corporais iniciais e finais não apresentaram diferença significativa (Tabela 1).

O consumo diário de vitamina D (UI/dia) estimado foi maior nos AVitD10 comparados aos AVitD3 e AC. Também observamos que os AVitD3 apresentaram maior consumo de vitamina D em relação aos AC (Tabela 1 e Figura 4). Este aumento do consumo diário de vitamina D estimado foi dose dependente ($p < 0,001$).

Em relação aos animais que receberam adição de sevelamer, verificamos maior consumo diário de ração (Tabela 1 e Figura 5). Levando em conta que a suplementação de vitamina D também foi realizada na ração, os animais que receberam adição de sevelamer também consumiram maior quantidade de vitamina D (Tabela 1 e Figura 6). O aumento do consumo diário de vitamina D nos animais que receberam adição de sevelamer também foi dose dependente ($p < 0,001$).

Não foi possível observar influência da suplementação de colecalciferol nos animais que receberam adição de sevelamer no consumo diário de vitamina D estimado e no consumo de ração.

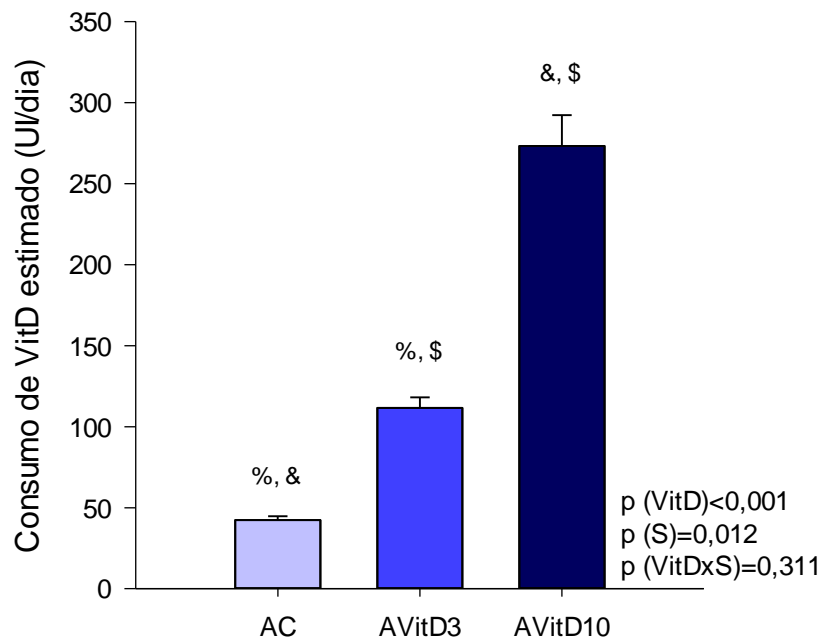
Tabela 1. Peso corporal dos animais, consumo diário de ração e vitamina D

Variável	C (n=27)	VitD 3 (n=29)	VitD 10 (n=29)	C+S (n=26)	VitD 3+S (n=29)	VitD 10+S (n=29)	p (VitD)	p (S)	p (VitDxS)
#Peso inicial (g)	305±50	308±48	310±51	316±45	311±53	309±47	0,938	0,397	0,772
Peso final (g)	483±57	476±50	473±45	470±47	465±39	470±42	0,755	0,210	0,802
Ração (g/dia)	23,1±1,3	23,2±1,3	22,8±1,7	24,7±1,3	24±1,5	24,3±1,5	0,321	<0,001 ²	0,312
Consumo de VitD* (UI/dia)	41,7±2,4	111±6,4	269±20	43,1±2,2	112±6,8	278±17	<0,001 ¹	0,012 ²	0,311

Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. # foi realizado teste de Mann-Whitney e de KruskalWallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. AC: todos os animais controle; AVitD 3: todos os animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD 10: todos os animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ¹ Comparações para o fator VitD: AC≠AVitD3, AC≠AVitD10, AVitD3≠AVitD10.

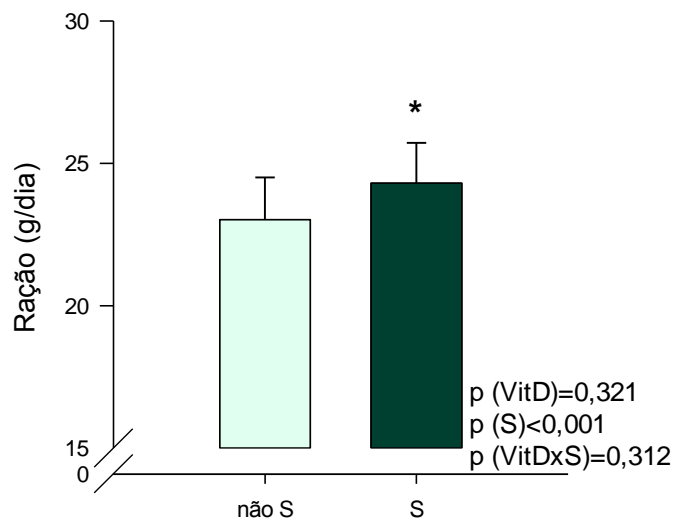
² Comparação para o fator S: todos os animais que foram tratados com sevelamer ≠ todos os animais que não receberam sevelamer.

Figura 4. Consumo diário de vitamina D estimado nos animais suplementados com vitamina D (UI/dia).



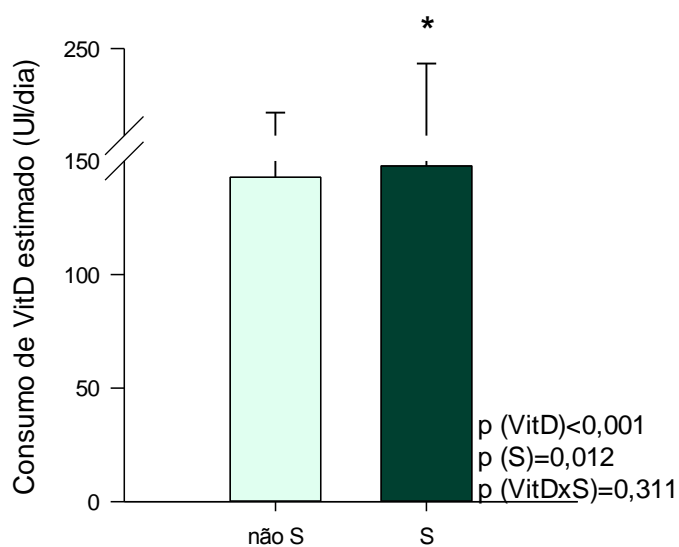
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 5. Consumo diário de ração (g/dia) dos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais tratados com sevelamer.

Figura 6. Consumo diário de vitamina D estimado (UI/dia) nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer.

Dosagem sérica de cálcio e fósforo, dosagem urinária de fósforo

Os resultados obtidos nas dosagens séricas de cálcio e fósforo estão representados na Tabela 2.

A suplementação com colecalciferol promoveu aumento sérico de cálcio (AC≠AVitD10; Figura 7) e fósforo (AC≠AVitD3=AVitD10; Figura 8). A maior concentração de cálcio sérico apresentou resposta dose dependente ($p=0,047$).

Em relação à adição de sevelamer, verificamos maior concentração sérica de cálcio nestes animais (Figura 9). Além disso, realizamos a dosagem de fósforo urinário. Como esta dosagem foi realizada em apenas dois animais por grupo, não foi possível realizar teste estatístico. Por outro lado, os dados marginais mostram menor excreção urinária de fósforo nos animais que receberam a adição de sevelamer (Tabela 2 e Figura 10).

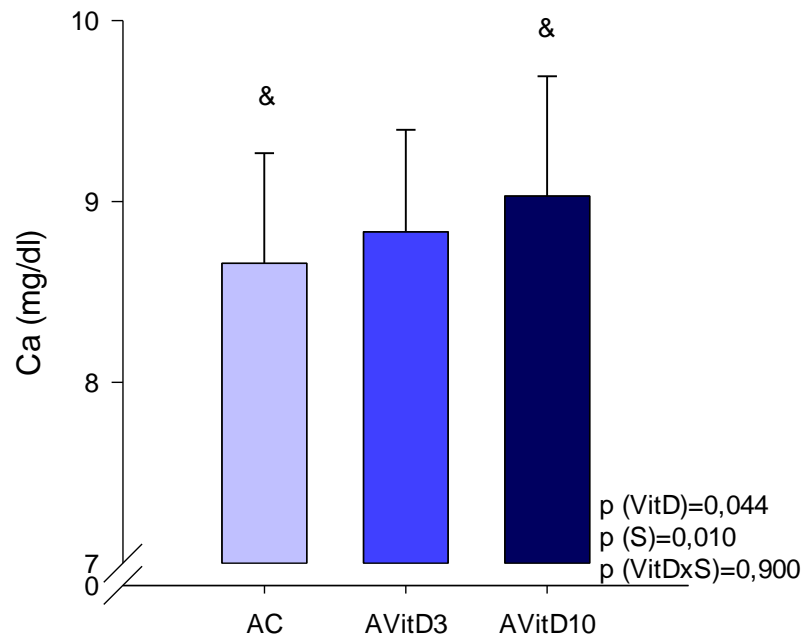
Não foi possível observar influência da suplementação de vitamina D nos animais que receberam adição de sevelamer na dosagem sérica de cálcio e fósforo.

Tabela 2. Dosagem sérica de cálcio e fósforo, dosagem urinária de fósforo.

Variável (mg/dl)	C (n=16)	VitD 3 (n=19)	VitD 10 (n=16)	C+S (n=17)	VitD 3+S (n=17)	VitD 10+S (n=17)	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
Ca	8,49±0,4	8,66±0,5	8,91±0,7	8,82±0,7	9,03±0,6	9,15±0,7	0,044¹	0,010²	0,900
P sérico	5,43±0,5	5,85±0,6	5,71±1	5,28±0,6	5,87±1	6,29±1	0,002¹	0,338	0,138
(n)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)			
P urinário	94	69	82	4	4,5	3,5			

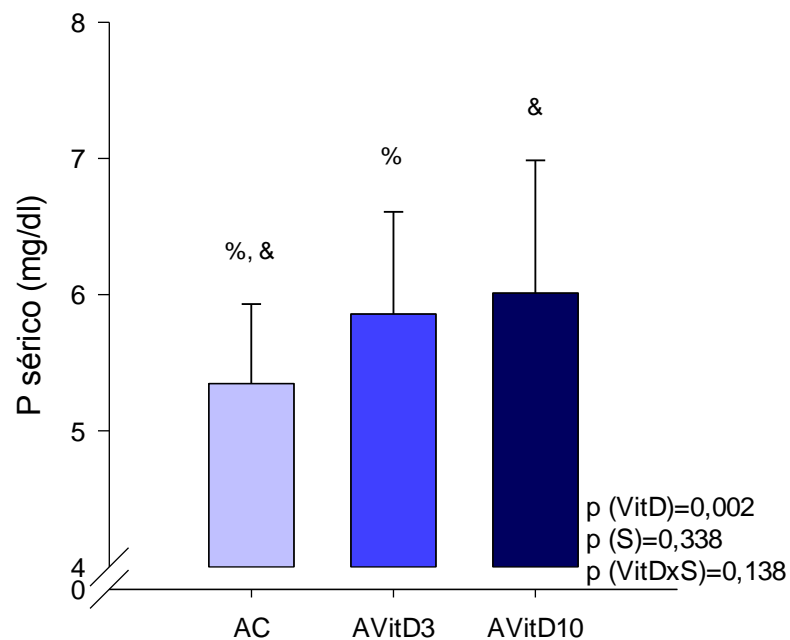
Dados expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. Ca: cálcio; P: fósforo. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ¹ Comparações para o fator VitD: Ca: AC≠AVitD10; P (sérico): AC≠AVitD3, AC≠AVitD10. ² Comparação para o fator S: todos os animais que foram tratados com sevelamer ≠ todos os animais que não receberam sevelamer.

Figura 7. Dosagem sérica de cálcio nos animais suplementados com vitamina D.



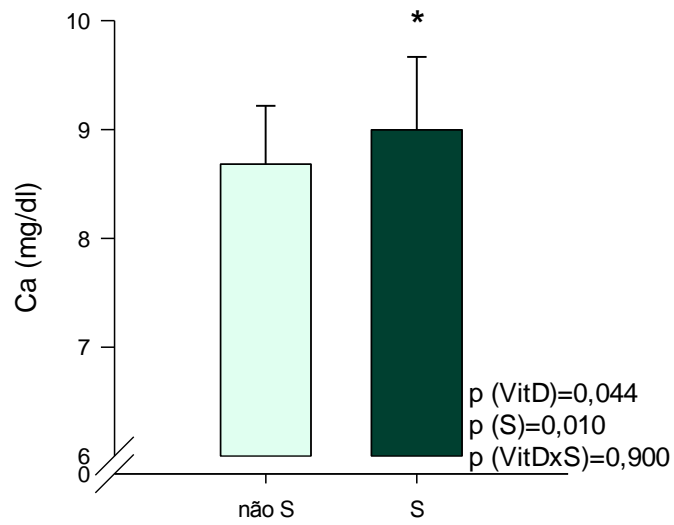
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Ca: cálcio. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 8. Dosagem sérica de fósforo nos animais suplementados com vitamina D.



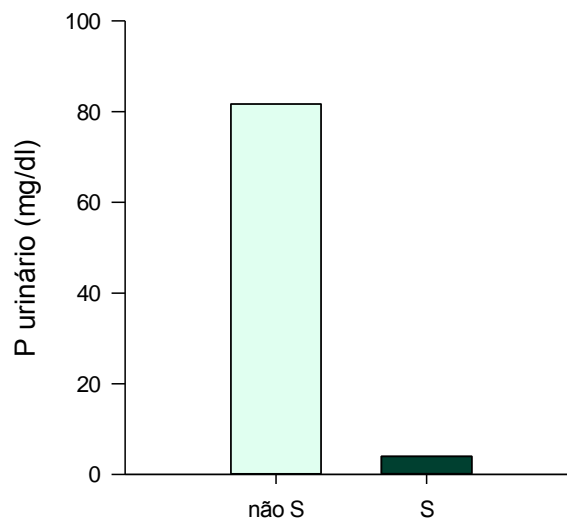
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. P: fósforo. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 9. Dosagem sérica de cálcio nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. Ca: cálcio.

Figura 10. Dosagem urinária de fósforo nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. P: fósforo.

Dosagem sérica de 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃, PTH e FGF-23

Os resultados obtidos nestas dosagens séricas estão representados na Tabela 3.

A suplementação de colecalciferol promoveu maior concentração sérica de 25(OH)D₃ (A0≠AVitD3≠AVitD10; Figura 11). Além disso, verificamos que este aumento foi dependente ($p < 0,001$).

Em relação aos animais que receberam adição de sevelamer, verificamos menor concentração de 25(OH)D₃ (Figura 12) e de FGF-23 (Figura 13).

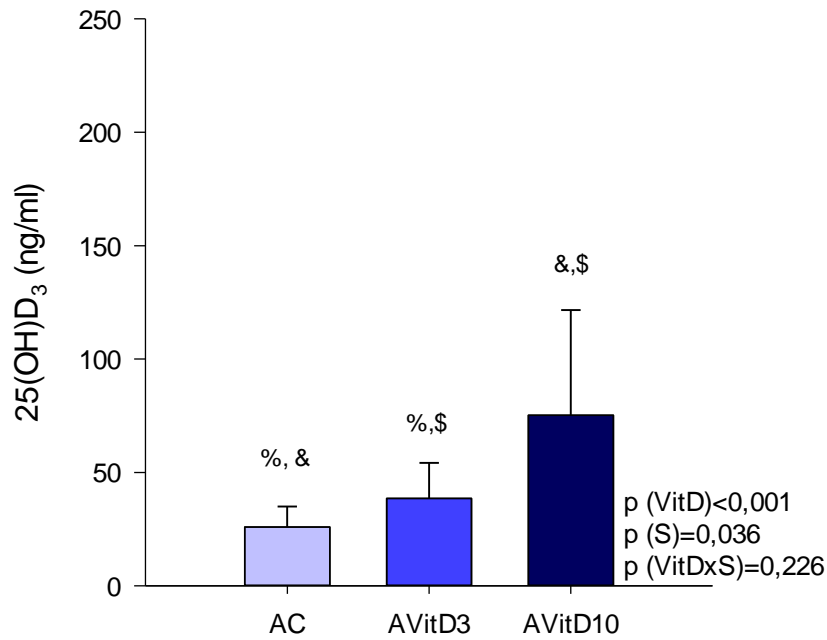
Não foi possível observar influência da suplementação de colecalciferol nos animais que receberam adição de sevelamer nas determinações séricas de 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃, PTH e FGF-23.

Tabela 3. Dosagem sérica de 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃, PTH e FGF-23.

Variável	C	VitD 3	VitD 10	C+S	VitD 3+S	VitD 10+S	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
(n) 25(OH)D₃* (ng/ml)	(19) 26,7±8,9	(21) 39,8±16	(19) 89,6±56	(17) 25,1±9,6	(19) 37,2±16	(18) 59,9±27	<0,001¹	0,036²	0,226
(n) #1,25(OH)₂D₃ (pg/ml)	(5) 15,6±10	(4) 10,7±4,3	(4) 9,25±2,2	(7) 6,57±6,8	(8) 8,41±9,3	(7) 7±5,2	0,378	0,150	0,714
(n) #PTH(pg/ml)	(5) 2,32±3,2	(4) 4,2±3,8	(4) 1,45±0,6	(7) 0,9±0,1	(8) 1,55±1,2	(6) 1,6±1,3	0,768	0,639	0,298
(n) FGF-23* (pg/ml)	(19) 131±51	(21) 165±48	(21) 155±59	(20) 132±43	(22) 138±79	(22) 125±56	0,375	0,041²	0,310

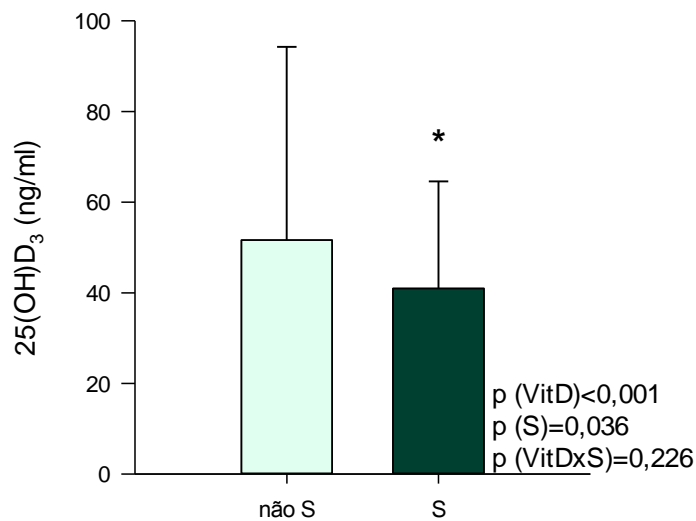
Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. # foi realizado teste de Mann-Whitney e de KruskalWallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. PTH: paratormônio, FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto-23. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ¹ Comparações para o fator VitD: AC≠AVitD3, AC≠AVitD10, AVitD3≠AVitD10. ² Comparação para o fator S: todos os animais que foram tratados com sevelamer ≠ todos os animais que não receberam sevelamer.

Figura 11. Dosagem sérica de 25(OH)D₃ nos animais suplementados com vitamina D.



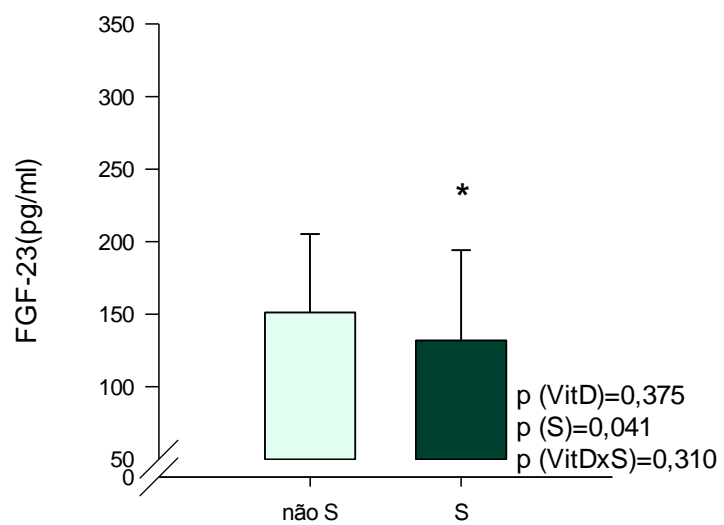
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 12. Dosagem sérica de 25(OH)D₃ nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer.

Figura 13. Dosagem sérica de fator de crescimento de fibroblasto-23 nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto-23.

Via calcineurina/NFAT e TXNIP

Os resultados obtidos na expressão de calcineurina, NFAT e TXNIP no miocárdio, estão representados na Tabela 4.

A suplementação de colecalciferol promoveu maior expressão de TXNIP (A0=AVitD3≠AVitD10; Figura 14).

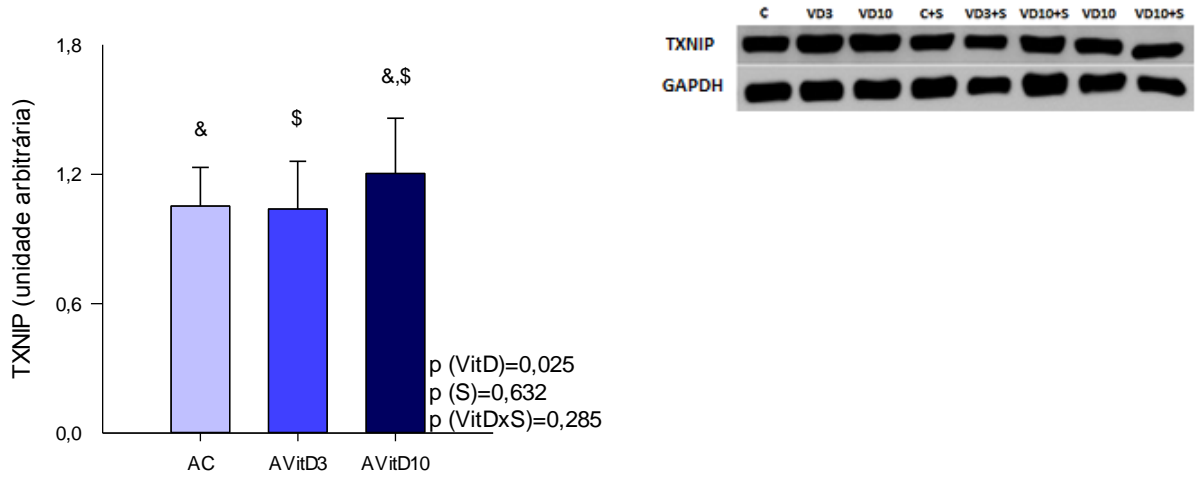
Em relação à adição de sevelamer, verificamos maior expressão de calcineurina nestes animais (Figura 15). Não foi possível observar influência da suplementação de colecalciferol nos animais que receberam adição de sevelamer na expressão de calcineurina, NFAT e TXNIP no miocárdio.

Tabela 4. Via calcineurina/NFAT e TXNIP

Variável (unidade arbitrária)	C	VitD 3	VitD 10	C+S	VitD 3+S	VitD 10+S	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
(n) Calcineurina	(11) 12,9±9,2 ^A	(12) 21,8±13	(14) 22±12	(10) 22,9±8,7 ^A	(14) 14,9±7,5	(14) 16,2±8,1	0,910	0,694	0,010³
(n) NFAT	(7) 0,4±0,4	(3) 0,46±0,2	(4) 0,9±0,2	(6) 0,59±0,5	(3) 0,82±0,5	(3) 0,99±0,7	0,221	0,174	0,937
(n) TXNIP	(12) 1,03±0,2	(12) 0,98±0,2	(11) 1,25±0,3	(12) 1,08±0,2	(12) 1,1±0,2	(11) 1,16±0,3	0,025¹	0,632	0,285

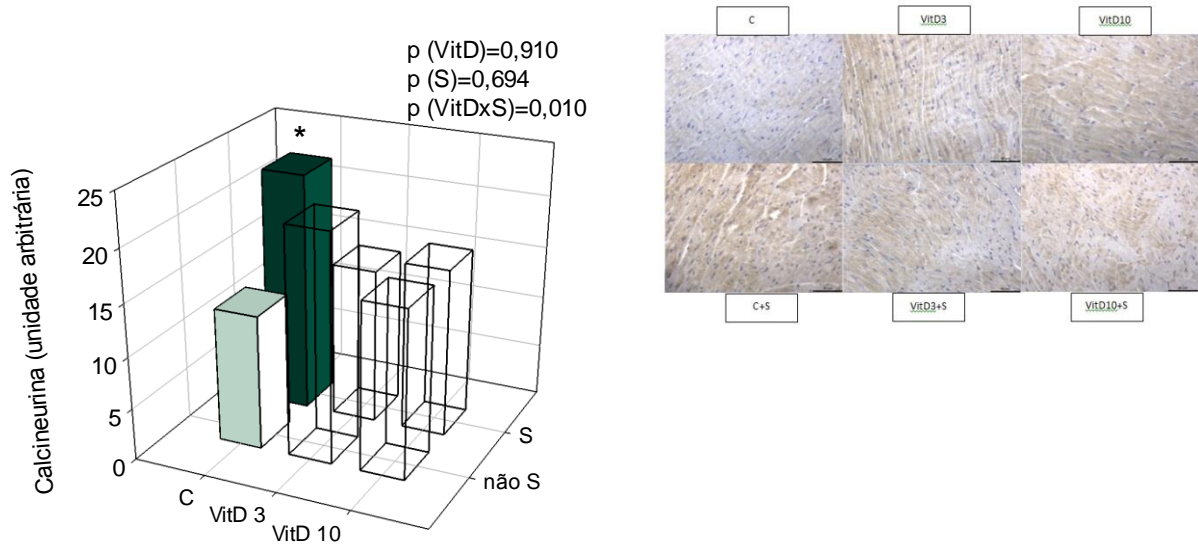
Dados expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. NFAT: fator nuclear de células T ativadas, TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ¹ Comparações para o fator VitD: AC≠AVitD10, AVitD3≠AVitD10. ³ Diferenças entre os grupos estão representadas por letras, sendo que letras iguais designam as diferenças.

Figura 14. Expressão de proteína de interação com a tiorredoxina nos animais suplementados com vitamina D.



Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 15. Expressão de calcineurina nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer.

Marcadores do estresse oxidativo no miocárdio

Os resultados obtidos nestes marcadores estão representados na Tabela 5.

A suplementação de colecalciferol promoveu menor atividade da catalase (A0≠AVitD3=AVitD10; Figura 16) e da GPx (A0≠AVitD3=AVitD10; Figura 17). Além disso, verificamos resposta dose dependente entre as doses de colecalciferol e a menor atividade da catalase ($p < 0,001$) e da GPx ($p < 0,001$). Em relação à SOD, o teste ANOVA de duas vias mostrou que os grupos que receberam suplementação de colecalciferol são diferentes, porém ele não teve o poder de identificar estes grupos (Figura 18).

Os animais que receberam adição de sevelamer apresentaram menor concentração de HL (Figura 19) e maior atividade da catalase (Figura 20).

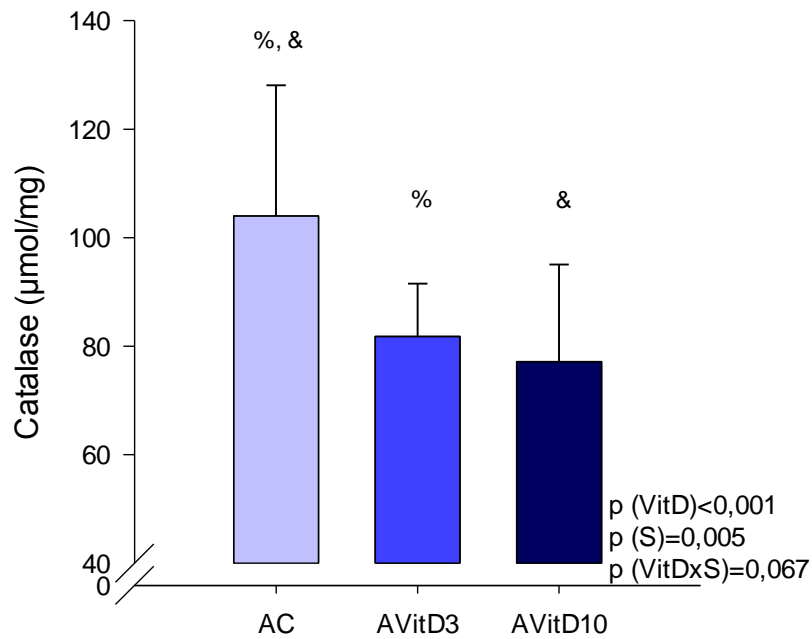
Não foi possível observar influência da suplementação de colecalciferol nos animais que receberam adição de sevelamer na atividade de catalase, SOD e GPx, além da % de DHE no miocárdio.

Tabela 5. Marcadores do estresse oxidativo no miocárdio

Variável	C (n=10)	VitD 3 (n=10)	VitD 10 (n=10)	C+S (n=10)	VitD 3+S (n=10)	VitD 10+S (n=10)	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
HL (nmol/mg)	134±24	132±21	156±35 ^C	136±27	136±23	120±13 ^C	0,855	0,124	0,021³
Catalase (µmol/mg)	93±13	82,6±9,8	68,4±13,9	115±28	81±10	85,9±18	<0,001¹	0,005²	0,067
SOD (nmol/mg)	7,18±1	6,12±1	6,73±1	7,28±1,4	6,79±1,1	6,2±1	0,042⁴	0,771	0,229
GPx (nmol/mg)	39,3±8,6	29,6±6,7	23,9±3,5	34,9±7,5	24,5±7,1	24,6±6,3	<0,001¹	0,102	0,350
(n)	(10)	(10)	(11)	(9)	(11)	(9)			
% DHE*	1,5±1,5	1,97±1	1,8±0,9	1,05±0,6	1,56±1,1	1,82±1,4	0,206	0,377	0,922

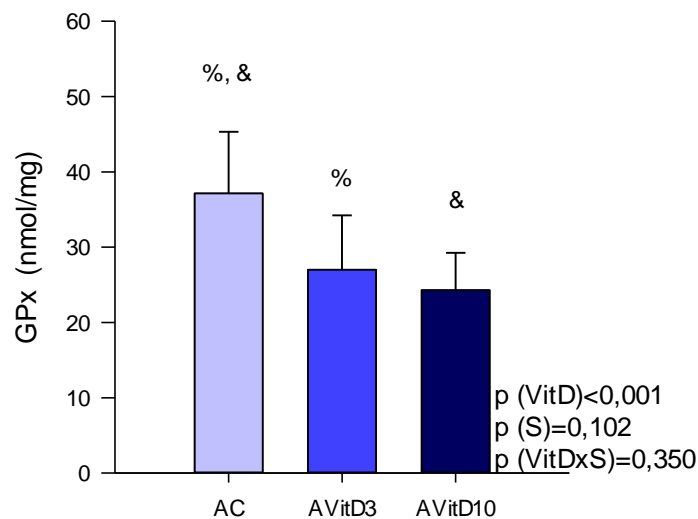
Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. HL: hidroperóxido de lipídeo; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutaciona peroxidase; DHE: dihidroetídio. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ¹ Comparações para o fator VitD: Catalase: AC≠AVitD3, AC≠AVitD10; GPx: AC≠AVitD3, AC≠AVitD10. ² Comparação para o fator S: todos os animais que foram tratados com sevelamer ≠ todos os animais que não receberam sevelamer. ³ Diferenças entre os grupos estão representadas por letras, sendo que letras iguais designam as diferenças. ⁴ Teste não identificou quais grupos são diferentes.

Figura 16. Atividade da catalase nos animais suplementados com vitamina D.



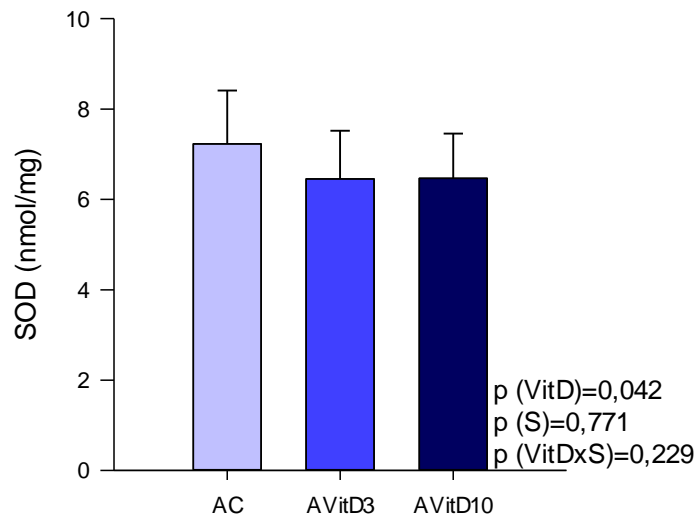
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 17. Atividade da glutatona peroxidase nos animais suplementados com vitamina D.



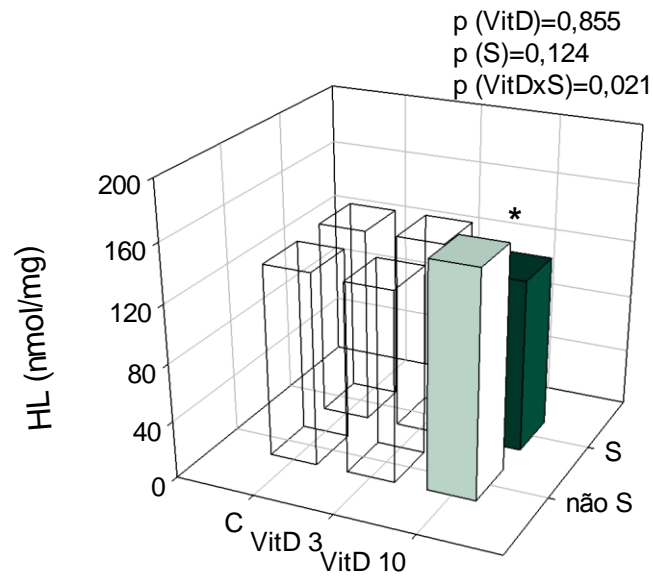
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. GPx: glutatona peroxidase. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 18. Atividade da superóxido dismutase nos animais suplementados com vitamina D.



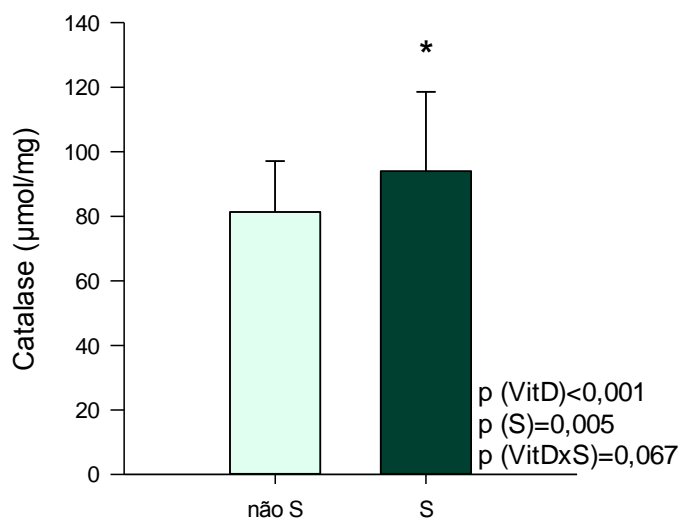
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. SOD: superóxido dismutase.

Figura 19. Concentração de hidroperóxido de lipídeo nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. HL: hidroperóxido de lipídeo.

Figura 20. Atividade da catalase nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer.

Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético no miocárdio

Os resultados obtidos na determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético estão representados na Tabela 6.

A suplementação com colecalciferol promoveu menor atividade de PFK (AC=AVitD3≠AVitD10; Figura 21), maior atividade da LDH (AC≠AVitD3=AVitD10; Figura 22), da PDH (AC=AVitD3≠AVitD10; Figura 23), da CS (AC≠AVitD3≠AVitD10; Figura 24) e do Complexo I (AC≠AVitD3=AVitD10; Figura 25), além de menor atividade da ATP sintase (AC=AVitD3≠AVitD10; Figura 26). Também verificamos resposta dose dependente entre as doses de colecalciferol e a menor atividade da PFK ($p < 0,001$), maior atividade da LDH ($p < 0,001$) e da CS ($p < 0,001$). Assim, a suplementação com colecalciferol diminuiu a oxidação de glicose via aeróbica, aumentou a oxidação da glicose via anaeróbica e do piruvato. Os animais suplementados apresentaram maior CS e Complexo I, além de menor atividade da ATP sintase (Figura 27).

Em relação aos animais que receberam adição de sevelamer, observamos maior atividade da OHADH (Figura 28), menor atividade da PFK (Figura 29), maior atividade da LDH (Figura 30), menor atividade da PDH (Figura 31) e Complexo I (Figura 32), maior atividade da ATP sintase (Figura 33). Desta maneira, os animais tratados com sevelamer apresentaram maior oxidação de ácido graxo e de glicose via anaeróbica, menor oxidação de glicose via aeróbica e do piruvato. Adicionalmente, verificamos menor complexo I e maior ATP sintase nestes animais tratados com sevelamer (Figura 34).

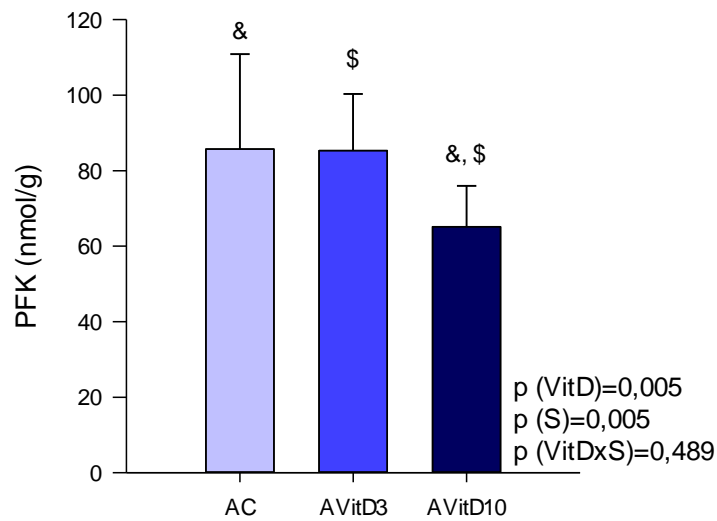
Em relação à influência da suplementação de colecalciferol nos animais que receberam adição de sevelamer, o grupo VitD3+S apresentou maior atividade da OHADH e da ATP sintase em comparação ao grupo C+S (Figura 35 e 36).

Tabela 6. Metabolismo energético no miocárdio

Variável (nmol/g)	C (n=10)	VitD 3 (n=10)	VitD 10 (n=10)	C+S (n=10)	VitD 3+S (n=10)	VitD 10+S (n=10)	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
OHADH	41,5±5,1	39,6±7,4 ^B	43,1±7,7	40,6±7,6 ^d	51,7±8,4 ^{B,d}	44,6±8,8	0,164	0,036	0,021³
#PFK	103±21	94,8±6,9	57,6±8,3	68,7±15	75,8±15	72,7±7,2	0,005¹	0,005²	0,489
LDH	204±11	216±5,5	221±12	212±7,3	226±16	224±14	<0,001¹	0,027²	0,669
PDH	217±21 ^b	219±34 ^c	258±50 ^{b,c,C}	214±31	231±36	213±33 ^C	0,210	0,204	0,040³
CS	20,5±5,2	24,8±5,3	30,8±6,6	21,6±4,4	23,9±3,5	28±4,8	<0,001¹	0,522	0,460
Complexo I	3,97±0,7 ^{a,b}	5,31±0,8 ^{a,B}	5,52±0,7 ^b	4,41±0,8	4,49±1 ^B	4,94±0,6	<0,001	0,117	0,030³
ATP sintase*	4,07±0,9 ^b	4,66±0,9 ^c	2,84±0,6 ^{b,c,C}	3,68±0,6 ^d	5,09±1 ^d	4,19±0,9 ^C	<0,001	0,014	0,001³

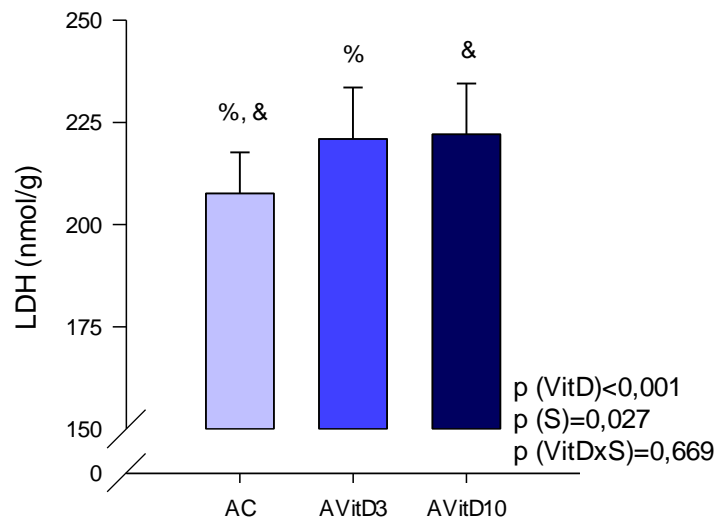
Dados expressos em média ± desvio padrão*variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. # foi realizado teste de Mann-Whitney e de KruskalWallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. OHADH: β-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase; PFK: fosfofrutoquinase; LDH: lactato desidrogenase; PDH: complexo piruvato desidrogenase; CS: citrato sintase. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ¹ Comparações para o fator VitD: PFK: AC≠AVitD10, AVitD3≠AVitD10; LDH: AC≠AVitD3, AC≠AVitD10; CS: AC≠AVitD3, AC≠AVitD10, AVitD3≠AVitD10. ² Comparação para o fator S: todos os animais que foram tratados com sevelamer ≠ todos os animais que não receberam sevelamer. ³ Diferenças entre os grupos estão representadas por letras, sendo que letras iguais designam as diferenças.

Figura 21. Atividade da fosfofrutoquinase dismutase nos animais suplementados com vitamina D.



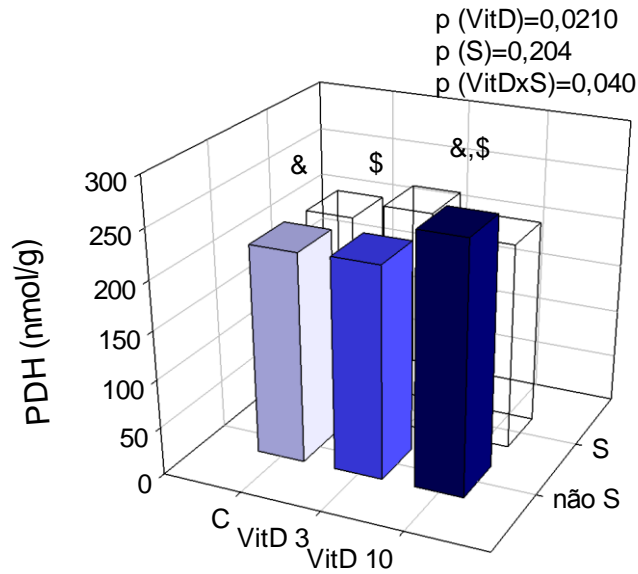
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. PFK: fosfofrutoquinase. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 22. Atividade da lactato desidrogenase nos animais suplementados com vitamina D.



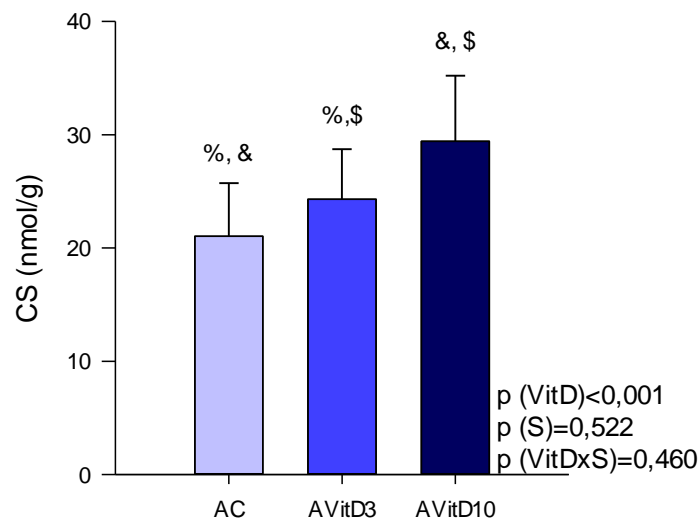
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. LDH: lactato desidrogenase. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 23. Atividade da piruvato desidrogenase nos animais suplementados com vitamina D.



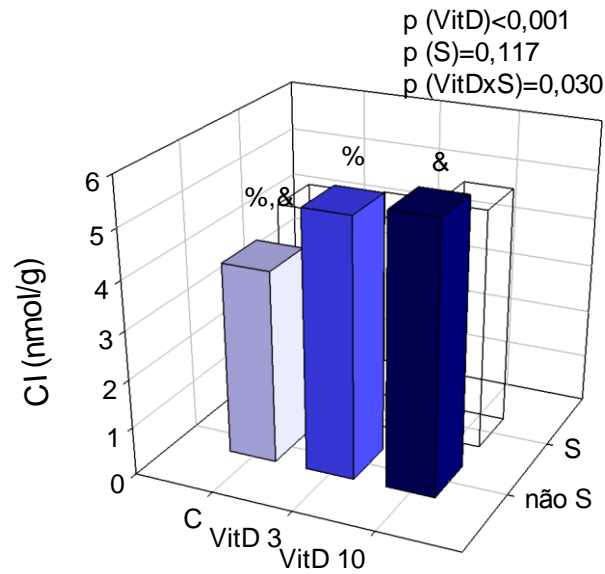
Dados expressos em média. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. PDH: piruvato desidrogenase. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 24. Atividade da citrato sintase nos animais suplementados com vitamina D.



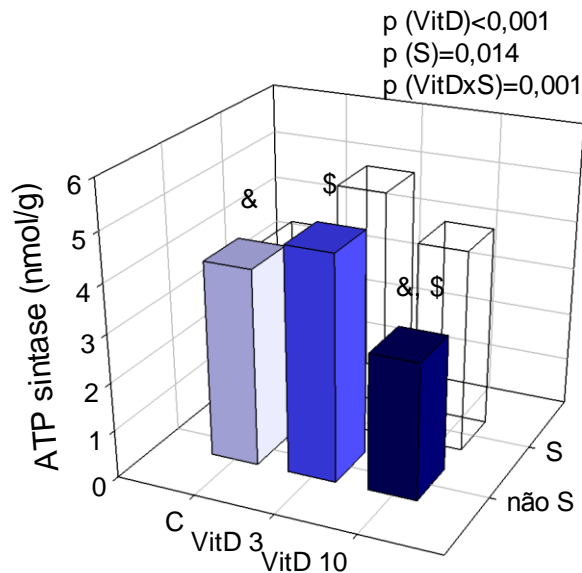
Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. CS: citrato sintase. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 25. Atividade do complexo I nos animais suplementados com vitamina D.



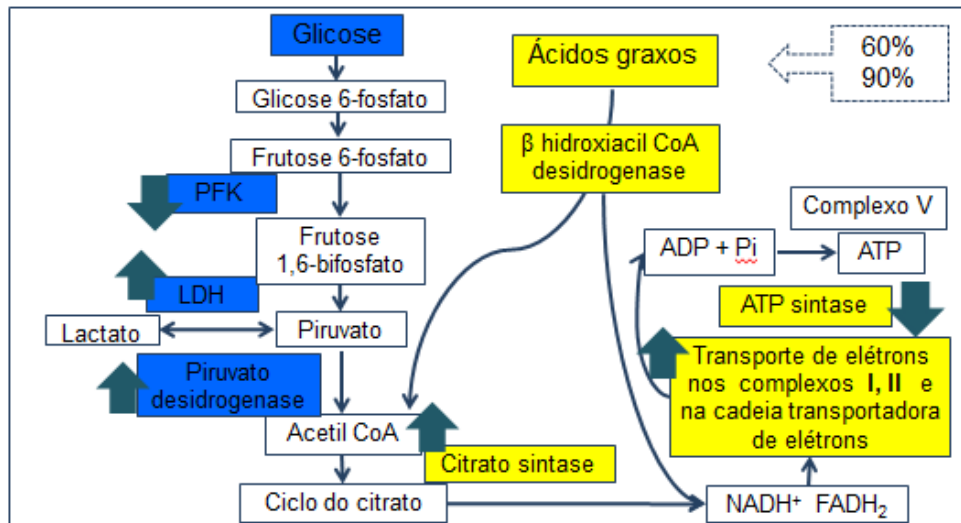
Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. CI: complexo I. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 26. Atividade da ATP sintase nos animais suplementados com vitamina D.



Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

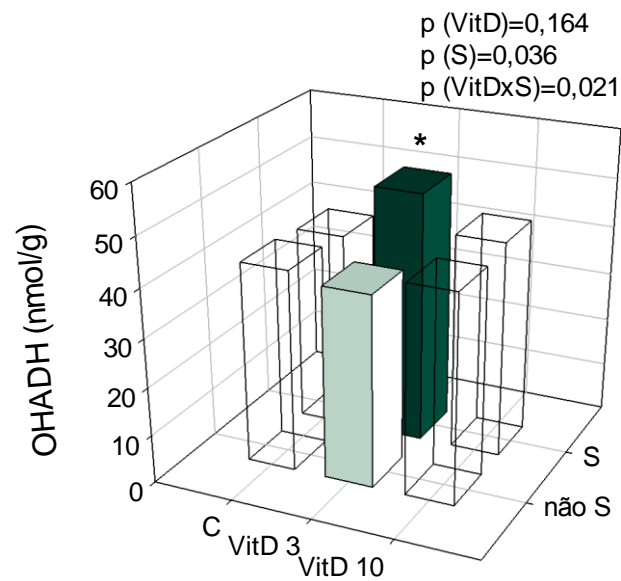
Figura 27. Resumo do metabolismo energético no miocárdio de animais suplementados com vitamina D.



Fonte: Lopaschuk, et al., 2013⁹⁴

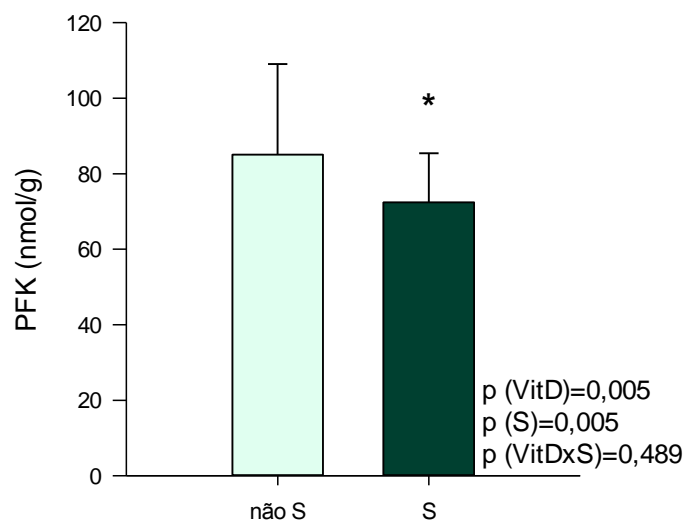
Metabolismo energético no coração saudável utiliza como principal substrato energético os ácidos graxos e, em seguida a glicose (via aeróbica e anaeróbica). Após serem convertidos em acetil coenzima A (acetil CoA) e oxalacetato, são catalizados pela enzima citrato sintase e inicia-se o ciclo citrato. No final deste ciclo, além de produzir citrato, geram também outras coenzimas responsáveis pelo transporte de elétrons que ocorrem no inteiro da mitocôndria. O transporte de elétrons é mediado por complexos específicos e fornece prótons para produção de ATP. Por sua vez, a suplementação de vitamina D (representada pelas setas verdes escuras) diminuiu a oxidação de glicose via aeróbica, aumentou a oxidação da glicose via anaeróbica e do piruvato. Os animais suplementados apresentaram maior citrato sintase, complexo I, além de menor atividade da ATP sintase. PFK: fosfofrutoquinase; LDH: lactato desidrogenase.

Figura 28. Atividade da β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase nos animais tratados com sevelamer.



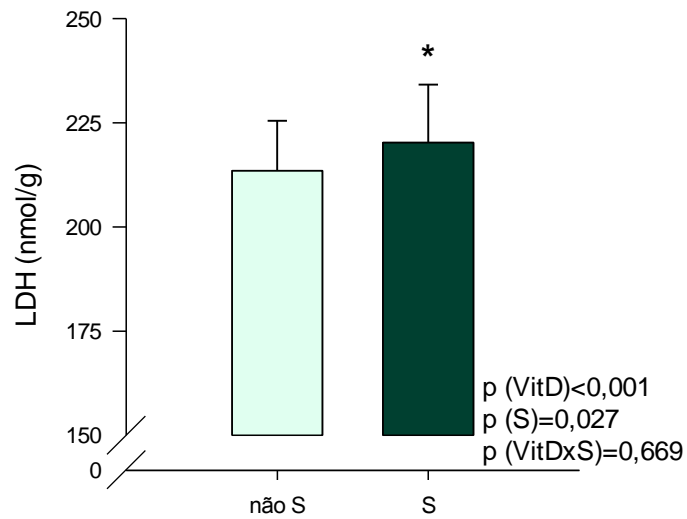
Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. OHADH: β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase.

Figura 29 Atividade da fosfofrutoquinase nos animais tratados com sevelamer.



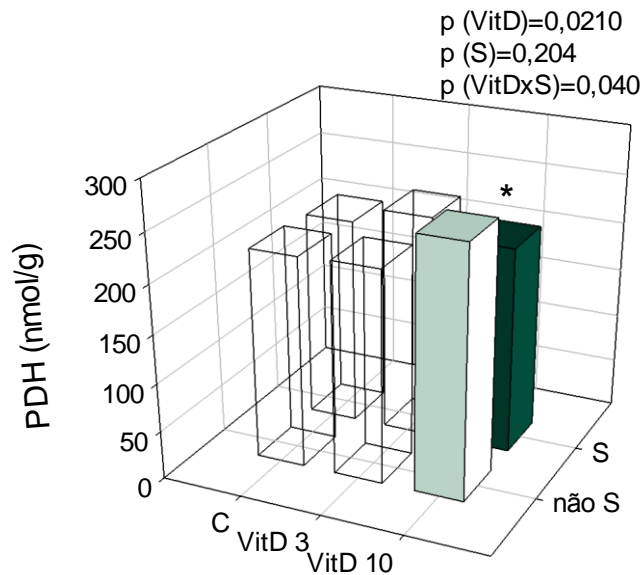
Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. PFK: fosfofrutoquinase.

Figura 30. Atividade da lactato desidrogenase nos animais tratados com sevelamer.



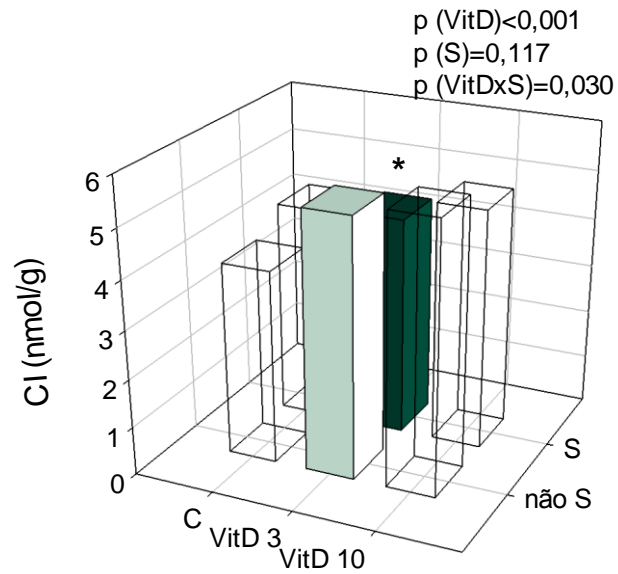
Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. LDH: lactato desidrogenase.

Figura 31. Atividade da piruvato desidrogenase nos animais tratados com sevelamer.



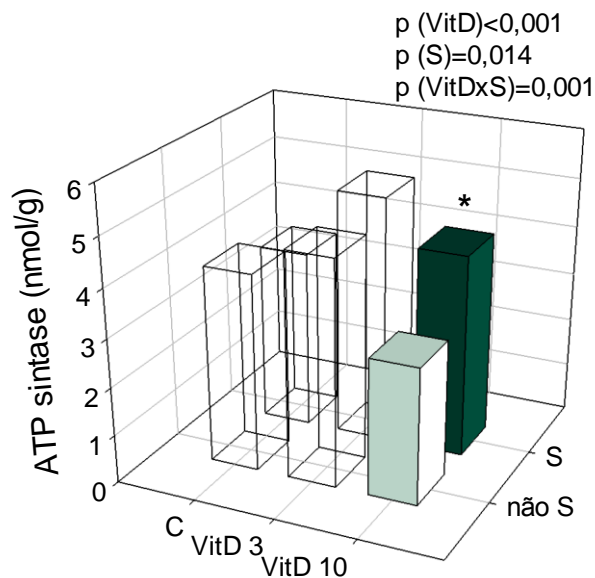
Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. PDH: piruvato desidrogenase.

Figura 32. Atividade do complexo I nos animais tratados com sevelamer.



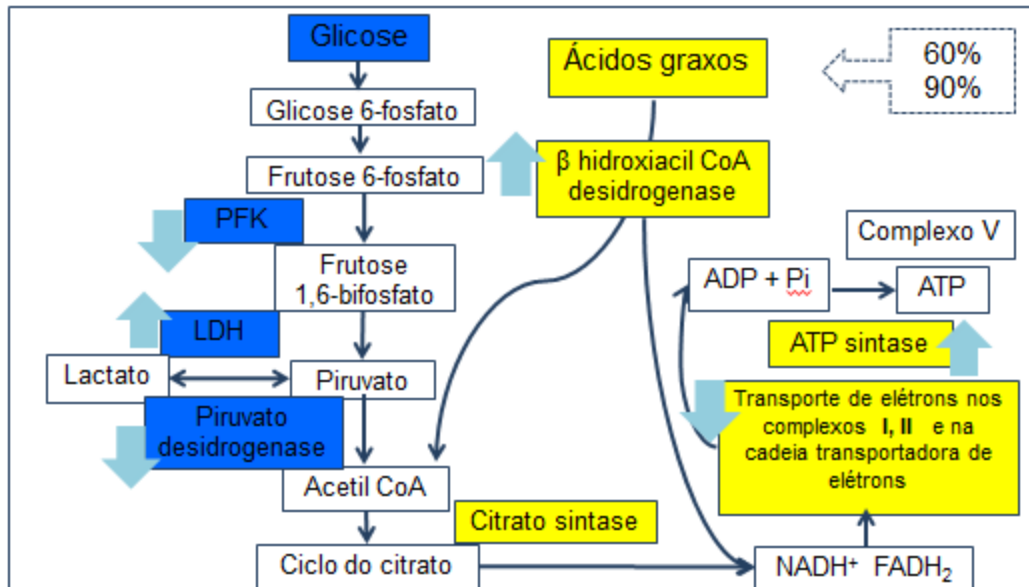
Dados expressos em média. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. CI: complexo I.

Figura 33. Atividade da ATP sintase nos animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer.

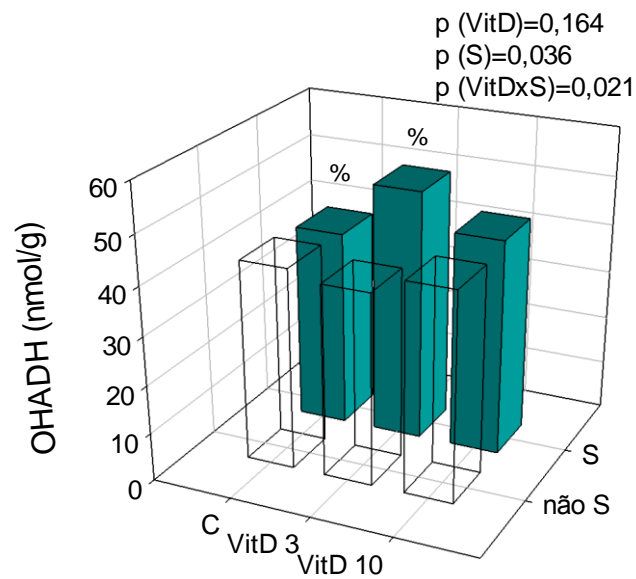
Figura 34. Resumo do metabolismo energético no miocárdio de animais tratados com sevelamer.



Fonte: Lopaschuk, et al., 2013⁹⁴

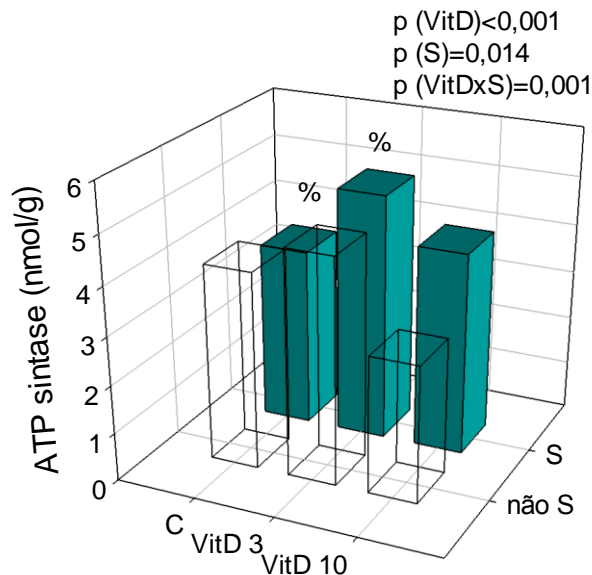
Metabolismo energético no coração saudável utiliza como principal substrato energético os ácidos graxos e, em seguida a glicose (via aeróbica e anaeróbica). Após serem convertidos em acetil coenzima A (acetil CoA) e oxalacetato, são catalizados pela enzima citrato sintase e inicia-se o ciclo citrato. No final deste ciclo, além de produzir citrato, geram também outras coenzimas responsáveis pelo transporte de elétrons que ocorrem no inteiro da mitocôndria. O transporte de elétrons é mediado por complexos específicos e fornece prótons para produção de ATP. Por sua vez, o tratamento com sevelamer (representado pelas setas verdes claras) apresentaram maior oxidação de ácido graxo e de glicose via anaeróbica, menor oxidação de glicose via aeróbica e do piruvato. Adicionalmente, verificamos menor complexo I e maior ATP sintase. PFK: fosfofrutoquinase; LDH: lactato desidrogenase.

Figura 35. Atividade da β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase nos animais suplementados com vitamina D e tratados com sevelamer.



Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. OHADH: β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 36. Atividade da ATP sintase nos animais suplementados com vitamina D e tratados com sevelamer.



Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Estudo ecocardiográfico

Os resultados obtidos pelo estudo ecocardiográfico estão nas Tabelas 7, 8 e 9 (variáveis morfológicas e funcionais).

A suplementação de colecalciferol não promoveu alterações cardíacas morfológicas e funcionais observadas no estudo ecocardiográfico.

Os animais que receberam adição de sevelamer apresentaram alterações cardíacas morfológicas, tais como maior DDVE (Figura 37) e IMVE (Figura 38). Também observamos alteração funcional diastólica, como menor TDE (Figura 39).

Em relação à influência da suplementação de colecalciferol nos animais que receberam adição de sevelamer, o teste ANOVA de duas vias apresentou um p significativo para a variável AE/AO, porém este não conseguiu identificar quais grupos são diferentes (Figura 40).

Tabela 7. Variáveis ecocardiográficas morfológicas

Variável	C (n=27)	VitD 3 (n=29)	VitD 10 (n=29)	C+S (n=26)	VitD 3+S (n=29)	VitD 10+S (n=29)	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
DDVE (mm)	7,6±0,6	7,4±0,5	7,3±0,5 ^C	7,51±0,6	7,58±0,4	7,73±0,41 ^C	0,798	0,027	0,022³
DSVE (mm)*	3,65±0,7	3,54±0,4	3,43±0,6	3,63±0,7	3,5±0,4	3,74±0,6	0,747	0,334	0,192
#EDPP (mm)	1,35±0,1	1,37±0,1	1,35±0,1	1,35±0,1	1,37±0,1	1,36±0,1	0,646	0,830	0,895
#EDSIV (mm)	1,36±0,1	1,37±0,1	1,35±0,1	1,36±0,1	1,37±0,1	1,36±0,1	0,622	0,972	0,919
Esp. Rel. VE*	0,36±0,04	0,37±0,05	0,37±0,04	0,36±0,05	0,36±0,03	0,35±0,03	0,563	0,188	0,226
IMVE (g/kg)	1,42±0,2	1,4±0,2	1,35±0,1	1,43±0,2	1,49±0,2	1,51±0,1	0,751	0,001²	0,055
AE/PC (mm/kg)	11,8±1,6	11,6±1,1	11,6±1	11,7±1,4	12,1±0,8	12±1,2	0,946	0,112	0,504
AE/AO*	1,39±0,08	1,36±0,08	1,36±0,09	1,35±0,09	1,4±0,09	1,38±0,08	0,859	0,502	0,047⁴

Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. # foi realizado teste de Mann-Whitney e de KruskalWallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. DDVE: diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; Esp. Rel. Ve: Espessura relativa do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta. PC: Peso corporal (kg). ² Comparação para o fator S: todos os animais que foram tratados com sevelamer ≠ todos os animais que não receberam sevelamer. ³ Diferenças entre os grupos estão representadas por letras, sendo que letras iguais designam as diferenças. ⁴ Teste não identificou quais grupos são diferentes.

Tabela 8. Variáveis ecocardiográficas funcionais (sistólicas)

Variável	C (n=27)	VitD 3 (n=29)	VitD 10 (n=29)	C+S (n=26)	VitD 3+S (n=29)	VitD 10+S (n=29)	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
FC (bpm)*	287±54	278±51	283±60	275±42	283±53	257±45	0,231	0,208	0,292
#% enc endo	52,3±6,3	52,3±4	53,1±5,8	51,9±6,4	53,9±4	51,8±5,7	0,789	0,836	0,196
VEPP (mm/s)	41±5,4	39,5±4,9	41±3,7	41,4±4,2	39,3±4,9	40,5±4,3	0,106	0,890	0,867
#FE	0,89±0,04	0,89±0,03	0,89±0,04	0,88±0,04	0,9±0,03	0,88±0,04	0,581	0,820	0,196
Índice de tei*	0,49±0,06	0,47±0,06	0,47±0,06	0,46±0,07	0,46±0,05	0,48±0,6	0,718	0,372	0,160
S média* (cm/s)	3,75±0,4	3,54±0,4	3,71±0,4	3,64±0,3	3,61±0,3	3,75±0,5	0,059	0,989	0,389

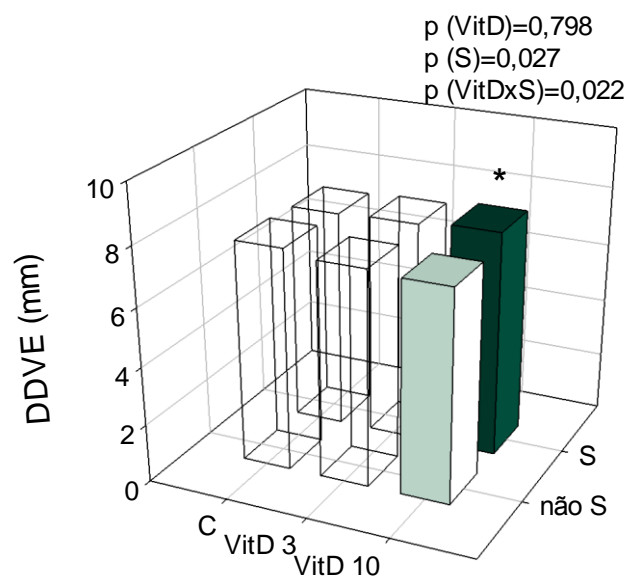
Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. # foi realizado teste de Mann-Whitney e de KruskalWallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. FC: frequência cardíaca; % Enc. Endo.: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; FE: fração de ejeção; Índice de Tei ou Índice de Performance Miocárdica (avalia conjuntamente a função sistólica e diastólica, calculado considerando o tempo de contração isovolumétrica + tempo de ejeção + tempo de relaxamento isovolumétrico).

Tabela 9. Variáveis ecocardiográficas funcionais (diastólicas)

Variável	C (n=27)	VitD 3 (n=29)	VitD 10 (n=29)	C+S (n=26)	VitD 3+S (n=29)	VitD 10+S (n=29)	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
E mitral (cm/s)	71,1±6,1	69,4±8	71,3±8,7	70,5±8,5	71,8±8,4	73,1±7,5	0,511	0,340	0,589
A mitral* (cm/s)	49,7±11	46,7±14	47,3±13	46,4±12	48±12	50±13	0,712	0,734	0,267
E/A	1,5±0,3	1,6±0,4	1,61±0,4	1,61±0,4	1,58±0,4	1,54±0,3	0,885	0,933	0,461
TDE (ms)*	51,4±8	47,3±5,5	47,5±4,5	45,8±5,4	45,1±7,3	49,3±7,8	0,126	0,041 ²	0,082
TRIV/R-R	57±6,3	58,3±5,8	57±6,1	55,6±6,5	56,4±5,4	56,9±6,3	0,662	0,228	0,710
E' média (cm/s)	4,11±0,5	4,04±0,6	3,83±0,6	4,04±0,7	3,99±0,5	3,93±0,5	0,250	0,932	0,707
A' média (cm/s)	4,11±0,9	3,78±0,9	3,71±1	4,08±0,8	4,18±1,1	4,01±1	0,455	0,140	0,483
E/E'	18±2,1	17,5±3	18,7±2,8	18,1±3,7	18,2±2,2	18,9±2,8	0,206	0,485	0,876

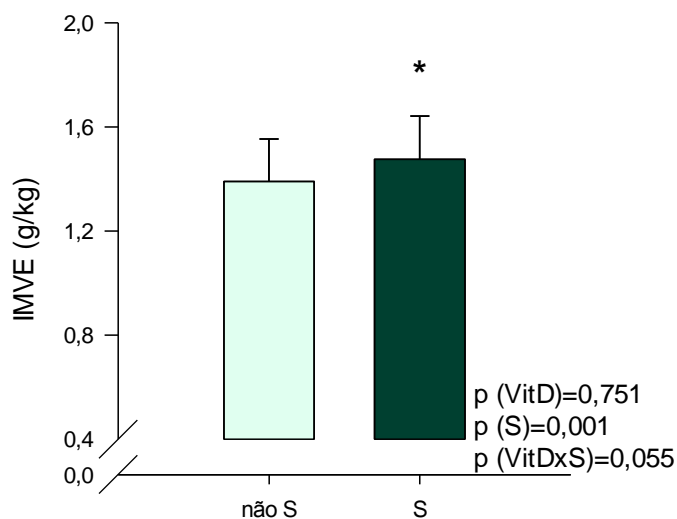
Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; R-R: distância de um batimento a outro. ² Comparação para o fator S: todos os animais que foram tratados com sevelamer ≠ todos os animais que não receberam sevelamer.

Figura 37. Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo de animais tratados com sevelamer.



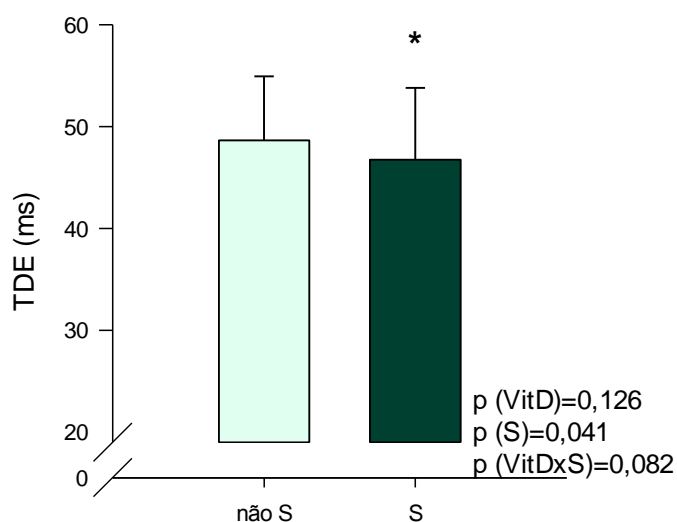
Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Figura 38. Índice de massa do ventrículo esquerdo de animais tratados com sevelamer.



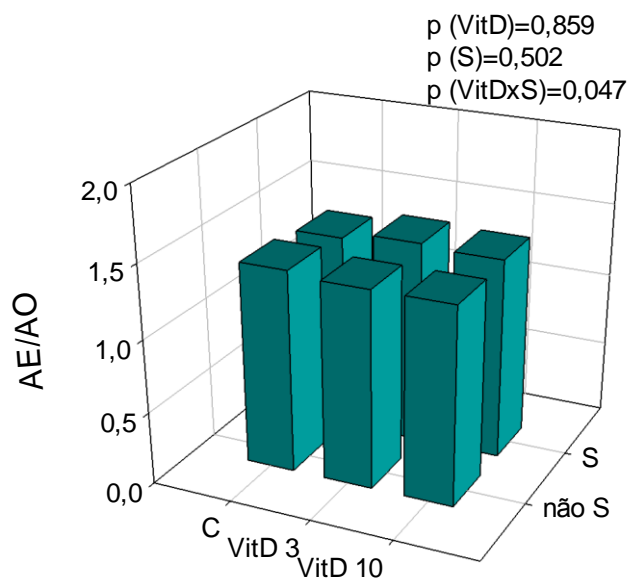
Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo.

Figura 39. Tempo de desaceleração da onda E mitral de animais tratados com sevelamer.



Dados expressos em média \pm erro padrão. Não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral.

Figura 40. Diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta de animais suplementados com vitamina D e tratados com sevelamer.



Dados expressos em média. C: animais controle; VitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; não S: animais que não receberam sevelamer; S: animais que receberam sevelamer. AE/AO: diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta.

Estudo morfométrico, área seccional do miócito e fração de colágeno intersticial

Os resultados obtidos neste estudo estão na Tabela 10.

A suplementação com colecalciferol promoveu maior ASM (AC≠AVitD3; Figura 41). Além disso, esta aumentou a porcentagem de colágeno intersticial (AC≠AVitD3=AVitD10; Figura 42).

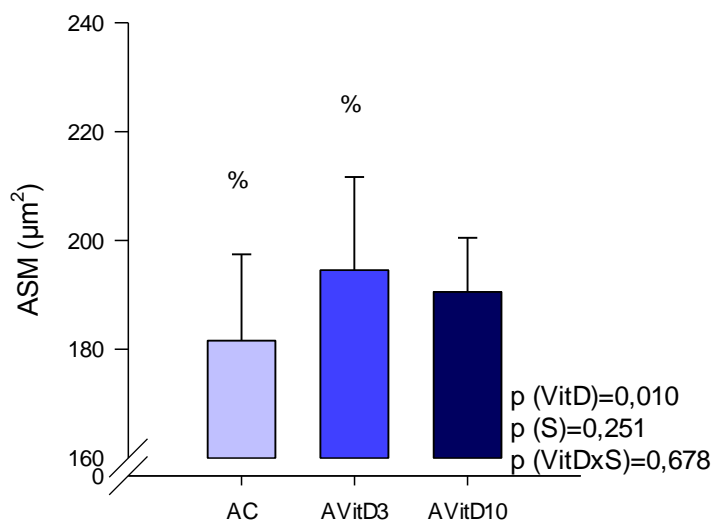
Em relação aos animais que receberam adição de sevelamer, não observamos alterações nas variáveis morfométricas, ASM e colágeno intersticial. Assim como não observamos alterações na influência da suplementação de colecalciferol nos animais que receberam adição de sevelamer.

Tabela 10. Estudo morfométrico dos tecidos e análise histológica do miocárdio

Variável	C (n=27)	VitD 3 (n=29)	VitD 10 (n=29)	C+S (n=26)	VitD 3+S (n=29)	VitD 10+S (n=29)	p (vitD)	p (S)	p (vitDxS)
Peso VE/PC (mg/kg)	1,69±0,2	1,74±0,2	1,73±0,2	1,74±0,2	1,76±0,2	1,73±0,2	0,667	0,434	0,768
#Peso VD/PC (mg/kg)	0,44±0,06	0,42±0,07	0,44±0,09	0,43±0,07	0,44±0,06	0,43±0,08	0,869	0,654	0,899
(n)	(10)	(10)	(10)	(6)	(9)	(9)			
Peso A/PC* (mg/kg)	0,1±0,02	0,09±0,04	0,12±0,03	0,1±0,03	0,1±0,03	0,1±0,03	0,495	0,572	0,426
(n)	(13)	(12)	(12)	(12)	(12)	(11)			
ASM (µm²)	182±19	198±13	193±11	182±13	191±21	188±8,1	0,010¹	0,251	0,678
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)			
Colágeno* (%)	3,43±2	6,95±4,5	11,8±11	4,31±3,6	10,2±7,2	8,81±5,7	0,002¹	0,523	0,838

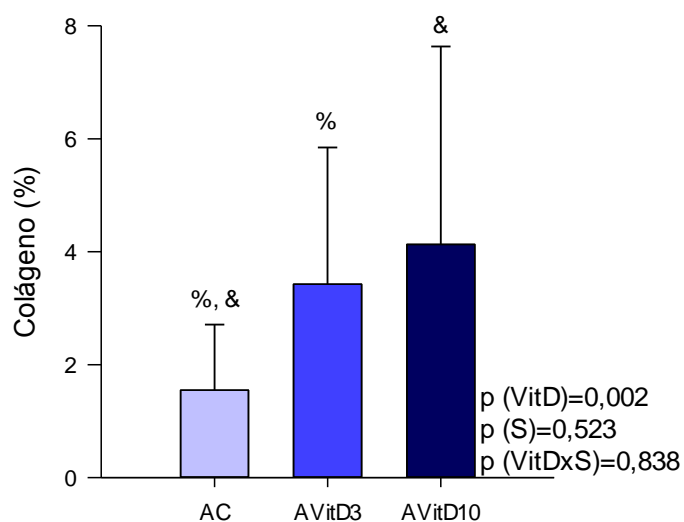
Dados expressos em média ± desvio padrão. *variáveis normalizadas para realização do teste ANOVA de duas vias. # foi realizado teste de Mann-Whitney e de KruskalWallis por não ter passado no teste de normalidade após transformações matemáticas. C: grupo controle que recebeu ração padrão; VitD 3: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; VitD 10: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração; C+S: grupo controle que recebeu ração padrão e 3% de sevelamer; VitD 3+S: grupo suplementado com 3.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer; VitD 10+S: grupo suplementado com 10.000UI de colecalciferol/kg de ração e 3% de sevelamer. VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; VD: ventrículo direito; A: átrios; ASM: Área seccional do miócito. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ¹ Comparações para o fator VitD: ASM: AC≠AVitD3; Colágeno: AC≠AVitD3, AC≠AVitD10.

Figura 41. Área seccional do miócito de animais suplementados com vitamina D.



Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. ASM: Área seccional do miócito. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

Figura 42. Porcentagem intersticial de colágeno nos animais suplementados com vitamina D.



Dados expressos em média \pm erro padrão. AC: animais controle; AVitD3: animais que receberam suplementação de 3.000UI de colecalciferol/kg de ração; AVitD10: animais que receberam suplementação de 10.000UI de colecalciferol/kg de ração. Símbolos iguais indicam diferença entre os animais.

O objetivo deste estudo foi verificar se o tratamento com sevelamer, ao reduzir a concentração sérica de fósforo, diminui a concentração de FGF-23 e, conseqüentemente, atenua a remodelação cardíaca decorrente da suplementação de colecalciferol, em altas doses. Nossos achados mostraram 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.

Suplementação de colecalciferol

Alterações séricas

A vitamina D desempenha papel importante na homeostase dos íons de cálcio e fósforo^{10; 95}. Para regular o metabolismo do cálcio, vitamina D atua em sua absorção intestinal por mecanismos genômicos e não genômicos^{30; 31; 96}. Adicionalmente, vitamina D também regula o metabolismo de cálcio nos ossos e nos rins^{33; 34}. Assim, como esperado, ao suplementarmos colecalciferol, verificamos maior concentração sérica deste íon. Além disso, este aumento foi dose dependente. Cálcio é íon essencial para o funcionamento adequado de diferentes órgãos. Em situações de hipercalcemia, o coração aumenta sua contratilidade e, conseqüentemente, altera suas características morfológicas e funcionais⁹⁷. A hipercalcemia também acarreta vasoconstrição, calcificação vascular, arritmias cardíacas, hipertensão e maior risco de eventos cardiovasculares^{97; 98}. Ao compararmos os nossos valores com a literatura verificamos que as nossas maiores concentrações de cálcio sérico não podem ser consideradas hipercalcêmicas para ratos^{23; 24; 75; 99}. Além disso, nossos dados não mostraram menor concentração de PTH, comumente observada em situações de hipercalcemia. Assim, nosso trabalho mostra que a suplementação de colecalciferol por 4 meses não pode ser considerada hipercalcêmica para ratos.

Em relação à homeostase do fósforo, a vitamina D atua na absorção intestinal deste íon por meio da proteína cotransportadora de sódio e fósforo tipo 2b (NaPi2b)^{32; 34}. A vitamina D também modifica a excreção renal deste íon por meio da expressão e síntese do FGF-23³⁴. Em nosso estudo, suplementação de colecalciferol promoveu maior concentração sérica de fósforo. A hiperfosfatemia acarreta conseqüências como: hiperplasia na paratireoide,

maior rigidez arterial periférica, disfunção endotelial e calcificação vascular. Nesta situação, também ocorre maior frequência de doenças cardiovasculares e de infecções, maior taxa de fragilidade e fratura dos ossos, além de maior risco de mortalidade^{37; 38; 100}.

A homeostase dos íons de cálcio e fósforo é fundamental para os órgãos funcionarem de forma adequada. Com a finalidade de manter a concentração sérica destes íons, nosso organismo apresenta reguladores endócrinos como vitamina D, FGF-23 e PTH¹⁰¹. O metabólito mais ativo da vitamina D é o 1,25(OH)₂D₃ e sua ação no metabolismo destes íons já foi descrita em estudos prévios^{30; 31; 33}. No entanto, o estado nutricional da vitamina D deve ser mensurado por meio da dosagem sérica de 25(OH)D₃ e não pelo seu metabólito mais ativo. Isso ocorre devido a 25(OH)D₃ apresentar maior meia-vida, maior concentração sérica e não sofrer influência da concentração de cálcio e PTH sérica^{102; 103; 104}. Em nosso estudo, animais suplementados com colecalciferol apresentaram maior concentração sérica de 25(OH)D₃ e este aumento foi dose dependente. Por outro lado, não observamos maior concentração de 1,25(OH)₂D₃ nos animais suplementados com colecalciferol. Similares aos nossos achados, outros autores também observaram maior concentração sérica de 25(OH)D₃ e cálcio, sem modificação na concentração de 1,25(OH)₂D₃. Desta maneira, maior absorção de cálcio também pode estar associada a 25(OH)D₃^{105; 106; 107}.

Em relação ao hormônio FGF-23, outro regulador endógeno do fósforo, sua maior concentração sérica pode ocorrer em resposta a inúmeras situações, como: aumento do 1,25(OH)₂D₃ sérico, elevada concentração de fósforo na dieta, aumento de fósforo extracelular, remodelação cardíaca, fibrose cardíaca, dentre outras^{48; 49; 50; 51}. FGF-23 apresenta como principais funções estimular a excreção urinária de fósforo, inibir a formação de 1,25(OH)₂D₃ e suprimir a síntese de PTH^{36; 45; 46}. Para que o FGF-23 exerça seu efeito fosfatúrico é necessário que se ligue a um dos quatro receptores de FGFRs^{57; 108; 109}. Nesta ligação atuam como cofatores os proteoglicanos heparan-sulfato e a proteína *Klotho*, sendo esta proteína expressa principalmente nos túbulos proximais presentes nos rins, na glândula paratireoide, e no plexo coróide do cérebro^{58; 110}. Além da ação fosfatúrica do FGF-23, este hormônio também atua como regulador do metabolismo do cálcio^{111; 112; 113}. No entanto, os mecanismos sistêmicos e locais pelo qual o FGF-23 pode regular a absorção de cálcio ainda precisam ser elucidados¹¹⁴.

Assim, elaboramos a hipótese de que ao suplementarmos colecalciferol, em altas doses, observaríamos maior concentração sérica de fósforo e, conseqüentemente, maior

concentração sérica de FGF-23. Porém, diferente do esperado, nossos animais suplementados não apresentaram alteração na concentração sérica de FGF-23. Com base nestes achados, podemos concluir que a suplementação de colecalciferol promoveu maior concentração sérica de fósforo, porém este aumento não foi capaz de estimular a produção e liberação de FGF-23 no soro. Assim, maior concentração de fósforo sérico observada neste estudo não deve ser considerada hiperfosfatêmica porque a sua elevação não acarretou aumento do FGF-23 sérico.

Adicionalmente, PTH também é hormônio regulador do metabolismo de cálcio e fósforo. Este hormônio é sintetizado e clivado pela glândula paratireoide, apresenta funções como: aumentar sua excreção em resposta a menor concentração de cálcio, auxiliar a conversão de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e regular a concentração de cálcio e o fósforo (associado ao $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)^{115; 116; 117}. Em nosso estudo, suplementação de colecalciferol também não modificou a concentração sérica de PTH.

Alterações no miocárdio

Como mencionado anteriormente, para o FGF-23 realizar sua ação fosfatúrica, é necessário que ele se ligue a um de seus receptores, além de proteoglicanos heparan-sulfato e da proteína *Klotho*^{58; 110}. No entanto, a expressão do *Klotho* não foi encontrada no coração⁶¹. Assim, outros autores sugerem que o FGF-23 pode promover sua ação no coração por meio da via de sinalização calcineurina/NFAT^{61; 62}. Calcineurina é uma fosfatase proteica de serina/treonina que depende de cálcio e calmodulina para realizar sua função. Esta proteína é composta por duas subunidades: A (catalítica) e B (reguladora)^{118; 119}. É conhecido que a maior quantidade de calcineurina no coração promove alterações características da remodelação cardíaca, como hipertrofia do VE e maior estresse oxidativo cardíaco^{63; 120; 121; 122}. Para calcineurina realizar sua ação no coração, ela desfosforila o fator de transcrição NFAT, presente no citoplasma^{63; 64; 123; 124}. Quando desfosforilado, NFAT migra para o núcleo celular e se liga diretamente ao DNA aumentando a transcrição gênica^{63; 64; 123; 124}. No presente estudo, concordando com a concentração de FGF-23 sérico, não observamos mudanças nas expressões de calcineurina e de NFAT no miocárdio.

Outro mecanismo que pode estar associado às alterações cardíacas promovidas pela suplementação de colecalciferol é o complexo TXNIP/tioredoxina. Para ativar esta via de sinalização, a TXNIP se liga ao centro catalítico da tioredoxina e, conseqüentemente, bloqueia sua ligação com outras substâncias, o que diminui sua expressão e atividade redutora

^{12; 13}. Por sua vez, tioredoxina atua na homeostase de enzimas e proteínas antioxidantes por meio da doação de equivalentes redutores para a regeneração da GPx, da SOD e da glutathione oxidada ^{125; 126}. Desta maneira, TXNIP e tioredoxina regulam diferentes vias de sinalização que podem modular a função cardíaca, tais como: estresse oxidativo, metabolismo energético, apoptose, inflamação e crescimento celular ^{14; 15; 127}. Em nosso estudo, a suplementação de colesterciferol promoveu maior expressão de TXNIP no miocárdio. Este achado também foi relatado em estudo anterior realizado em nosso laboratório, no qual os animais foram suplementados com colesterciferol por 2 meses ²⁵. Assim, sugerimos que o mecanismo pelo qual a suplementação de vitamina D leva às alterações cardíacas seria via complexo TXNIP/tioredoxina.

A tioredoxina é potente antioxidante cardíaco e ao se ligar com a TXNIP, forma o complexo TXNIP/tioredoxina, que diminui a atividade da tioredoxina e acarreta estresse oxidativo cardíaco ^{125; 126}. Verificamos que os animais suplementados com colesterciferol apresentaram menor atividade da catalase, GPx e SOD. Assim, a maior expressão de TXNIP pode ter levado a menor atividade da tioredoxina no miocárdio. Como a tioredoxina é importante para regeneração das enzimas antioxidantes, sua menor atividade pode ter levado à menor atividade das enzimas antioxidantes ^{125; 126}.

Em relação ao metabolismo energético, a suplementação de colesterciferol modificou o uso dos substratos energéticos. O coração é órgão que necessita de grande quantidade de ATP para exercer suas funções ⁹⁴. Em condições normais e aeróbicas, os substratos energéticos cardíacos utilizados são fornecidos por meio da oxidação dos ácidos graxos (principal substrato) e glicose ^{94; 128}. Verificamos que a suplementação de colesterciferol provocou menor oxidação de glicose via aeróbica, maior oxidação da glicose via anaeróbica e do piruvato, além de menor atividade da ATP sintase. Desta maneira, os nossos achados mostram metabolismo energético comprometido no coração de ratos suplementados com colesterciferol.

Os achados de hipertrofia do VE e maior fibrose no miocárdio nos animais suplementados com colesterciferol mostram alterações de massa cardíaca e interstício presentes na remodelação cardíaca ^{24; 28; 29}. Entre as alterações celulares e moleculares que estão ocorrendo no processo de remodelação cardíaca estão o estresse oxidativo e alterações no metabolismo energético. Neste modelo de agressão, consideramos as alterações cardíacas progressivas por termos observado apenas alterações moleculares no coração dos animais suplementados com colesterciferol por 2 meses ²⁵. Quando suplementamos os animais por 4

meses, verificamos evolução destas alterações, promovendo modificações na morfologia do coração. Assim a suplementação de colecalciferol, em altas doses, pode ser considerada agressão contínua que leva a alterações celulares, intersticiais e moleculares cardíacas de maneira progressiva. Portanto, com base nas alterações encontradas, pode-se inferir que o nosso protocolo foi eficiente para induzir remodelação cardíaca. No entanto, diferente do esperado, o mecanismo envolvido neste processo não foi via hiperfosfatemia, FGF-23 e calcineurina/NFAT.

Adição de sevelamer

Alterações séricas

Na elaboração da nossa hipótese, visualizamos que as alterações cardíacas relacionadas à suplementação de colecalciferol ocorreriam em consequência da hiperfosfatemia. Uma das maneiras de diminuir a concentração sérica de fósforo seria por meio do uso do sevelamer. Este medicamento inibe a absorção intestinal de fósforo e é comumente utilizado por pacientes renais crônicos para tratamento da hiperfosfatemia^{129; 130; 131}.

Sevelamer é um polímero catiônico, livre de alumínio e cálcio. É composto por múltiplas aminas espaçadas por moléculas de carbono, sendo que estas aminas interagem com moléculas de ânion fosfato por meio da carga e da ligação com hidrogênio. Ainda, a ação do sevelamer ocorre sem que este seja absorvido pelo organismo^{66; 132}. Em nosso estudo, este medicamento foi adicionado à ração na concentração de 3%. Assim, a adição de sevelamer pode explicar o maior consumo de ração nestes animais sem aumentar o seu ganho de peso corporal.

Diferente do esperado, não observamos alteração na concentração sérica de fósforo nos animais que receberam adição de sevelamer. Entretanto, verificamos menor concentração do fósforo urinário nos animais que receberam o medicamento. A menor absorção intestinal de fósforo pode ser comparada à restrição de fósforo na dieta. Nos estudos com restrição de fósforo na dieta, os autores verificaram menor excreção urinária deste íon e concentração sérica mantida^{133; 134}.

Outra possibilidade para explicar os achados relacionados ao fósforo sérico e urinário nos animais tratados com sevelamer pode ser devido à menor concentração sérica de FGF-23. É descrito na literatura que o sevelamer reduz a concentração sérica de FGF-23⁷⁰, o que pode

diminuir a excreção urinária deste íon. O uso do sevelamer é indicado em situações de hiperfosfatemia. Entretanto, Ratogi, 2013; descreve que, o uso de sevelamer em pacientes renais crônicos com normofosfatemia, promoveria menor excreção renal deste íon e menor concentração sérica de FGF-23¹³⁵. Desta forma, nossos achados podem também estar mostrando esta ação do sevelamer. Além disso, a manutenção da concentração sérica de fósforo, não pode ser responsável pela menor concentração sérica de FGF-23.

A concentração sérica de cálcio foi maior nos animais que receberam sevelamer. Este medicamento não apresenta cálcio em sua composição e o seu uso é pouco associado com a maior concentração sérica deste íon⁶⁶. Interessante, é que estes animais apresentaram menor concentração sérica de 25(OH)D₃, sem modificar a 1,25(OH)₂D₃. Assim, o aumento do cálcio sérico não deve estar associado à suplementação de colecalciferol nos animais que receberam a adição de sevelamer. Wongdee, et. al, 2019; descreveram que o aumento do FGF-23 pode inibir a absorção intestinal de cálcio por mecanismo parácrino e autócrino¹¹⁴. Desta maneira, sugerimos que por mecanismo inverso ao descrito por Wongdee, et. al, 2019; menor concentração do FGF-23 pode ter estimulado a absorção de cálcio¹¹⁴. Outra possível explicação poderia ser a diminuição de fósforo na luz intestinal e, como consequência, o cálcio ficaria mais disponível e seria mais absorvido.

Como mencionamos acima, observamos menor concentração sérica de 25(OH)D₃ nos animais que receberam sevelamer. Além disso, é importante lembrarmos que a suplementação de colecalciferol também foi realizada na ração, assim, mesmo consumindo maior concentração de vitamina D, estes animais apresentaram menor concentração sérica de 25(OH)D₃. É conhecido que o sevelamer tem alta afinidade aos ácidos biliares e aminoácidos conjugados, os quais são abundantes no intestino durante as refeições^{66; 132}. Devido a esta afinidade, o uso de sevelamer levaria a maior excreção fecal de ácidos biliares, o que prejudicaria a formação de micelas. Desta maneira, teríamos menor absorção de gorduras e também das vitaminas lipossolúveis^{132; 136; 137}. Este achado também foi descrito por outros autores^{4; 138}.

Alterações no miocárdio

Diferente do esperado, os animais que receberam adição de sevelamer apresentaram alterações na morfologia e na função cardíaca, sendo estas modificações características do processo de remodelação cardíaca^{24; 28; 29}. Como neste trabalho estudamos a via da

calcineurina/NFAT, o qual seria mecanismo da remodelação cardíaca no modelo de agressão por altas doses de vitamina D. Verificamos maior expressão desta proteína no miocárdio dos animais tratados com sevelamer. Como mencionado anteriormente, a maior atividade de calcineurina no coração promove hipertrofia do VE e aumento do estresse oxidativo, que são características da remodelação cardíaca^{63; 120; 121; 122}. Um dos fatores que influenciam no aumento da calcineurina é o aumento do FGF-23. Entretanto, verificamos menor concentração sérica de FGF-23 nestes animais. Outros mecanismos que não foram avaliados no presente estudo podem influenciar na expressão de calcineurina, tais como: cálcio, calmodulina, reguladores de calcineurina (RCAN1, 2 e 3) e proteínas homólogas (CHP1, 2 e 3)^{118; 119; 139}.

Além das alterações mencionadas, o uso do sevelamer também modificou o metabolismo energético cardíaco. Como mencionado anteriormente, no coração normal, o principal substrato energético utilizado é fornecido por meio da oxidação dos ácidos graxos^{94; 128}. No entanto, após este coração sofrer alterações em sua morfologia e função, a maior utilização de ácidos graxos pode ser prejudicial^{128; 140}. Nesta situação, a oxidação de ácidos graxos pode entrar em ciclo fútil metabólico e desperdiçar o uso do oxigênio, aumentando o gasto energético em repouso e levando a maior prejuízo ao coração^{128; 140}. Adicionalmente, a ATP sintase é um complexo enzimático que pode tanto sintetizar como hidrolisar ATP^{141; 142}. Desta maneira, a maior oxidação de ácidos graxos associada a maior atividade da ATP sintase, no coração destes animais, pode sugerir aumento da hidrólise de ATP⁹⁴. Assim, nossos achados mostram metabolismo energético comprometido no coração de ratos tratados com sevelamer.

O tratamento com sevelamer por 4 meses, em ratos normofosfatêmicos, promoveu alterações morfológicas, funcionais e no metabolismo energético cardíaco. No entanto, o mecanismo envolvido também não foi hiperfosfatemia e FGF-23, mas pode ter sido via calcineurina/NFAT.

Um achado interessante sobre uso do sevelamer em animais normofosfatêmicos é que ele diminuiu o estresse oxidativo no miocárdio. Este achado pode estar relacionado com a menor absorção intestinal de produtos finais de glicação avançada (AGEs) promovidas por este medicamento^{143; 144; 145}. Os AGEs são proteínas covalentemente modificadas por processos oxidativos e não-oxidativos, envolvendo açúcares ou seus produtos de degradação¹⁴⁶. Os AGEs têm a capacidade de modificar as propriedades químicas de diversas estruturas

biológicas e podem interagir com receptores sensíveis a eles. Assim, os AGEs podem promover o estresse oxidativo, por meio da produção de ERs^{147; 148; 149}. O estresse oxidativo cardíaco é determinado pelo desequilíbrio entre a produção endógena de ERs e a eficácia de seus sistemas antioxidantes¹⁵⁰. Desta maneira, a menor absorção de AGEs promovida pelo tratamento com sevelamer sugere que este medicamento pode atuar neste desequilíbrio e diminuir o estresse oxidativo no miocárdio destes animais.

Limitação do estudo

Em nosso estudo, suplementação com colecalciferol, em altas doses, promoveu alterações cardíacas moleculares e celulares. No entanto, o mecanismo envolvido neste processo de remodelação cardíaca não foi via hiperfosfatemia, FGF-23 e calcineurina/NFAT. Como a suplementação de colecalciferol foi realizada durante 4 meses e o estudo das variáveis foi efetuado após este período, não sabemos se estes marcadores podem estar envolvidos na agressão cardíaca no estágio inicial após a suplementação de vitamina D. Outra limitação deste estudo é que verificamos maior média de concentração sérica de 25(OH)D₃ nos animais suplementados com colecalciferol, como esperado. No entanto, existem animais suplementados com VD3 e VD10 que apresentaram valores de 25(OH)D₃ similares aos animais C. Essa menor concentração sérica de 25(OH)D₃ nos animais suplementados, pode ter acontecido devido a problemas na ingestão, digestão, absorção e transporte da vitamina ou em alguns animais. Além disso, como não realizamos a dosagem sérica de 25(OH)D₃ nestes animais antes de iniciar o experimento, não conseguimos comparar o mesmo animal antes e depois da suplementação.

Considerações finais

A deficiência de vitamina D aumentou e se tornou problema mundial de saúde pública. Esta deficiência está associada ao maior risco de desenvolver doenças crônicas. Desta maneira, há grande preocupação com a deficiência de vitamina D e esta recebe grande destaque. No entanto, atualmente é comum observarmos suplementação de vitamina D em altas doses e, em alguns casos, até o consumo de doses tóxicas. Em estudo prévio realizado em nosso laboratório, a suplementação de colecalciferol em ratos saudáveis, por dois meses, promoveu alterações moleculares importantes no coração destes animais. Com base neste estudo prévio, suplementamos colecalciferol por 4 meses e observamos, além de alterações

moleculares, alterações morfológicas cardíacas nestes animais. Assim, a suplementação de colecalciferol, em altas doses, pode ser considerada agressão contínua que leva a alterações cardíacas de maneira progressiva.

Um achado secundário ao nosso estudo é que o tratamento com sevelamer, em ratos normofosfatêmicos, foi utilizado para reduzir a concentração sérica de fósforo, diminuir a concentração de FGF-23 e, conseqüentemente, atenuar a remodelação cardíaca decorrente da suplementação de colecalciferol, em altas doses. Porém, o uso do sevelamer promoveu alterações cardíacas morfológicas e funcionais, além de modificar o metabolismo energético do miocárdio.

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., Schluskel, 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., Marcinowska-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., Giveon, 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., Loehr, 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. Molckentin, 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., Teerapornpantakit, 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. Antonucci, 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 Deakey 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.