

**Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”**

**UNIGRANRIO**

**FELIPE RAED XAVIER**

**O PAPEL DO COLESTEROL NO DANO A MICROCIRCULAÇÃO RENAL EM UM  
MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

**RIO DE JANEIRO**

**2025**

**Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”**  
**UNIGRANRIO**

**FELIPE RAED XAVIER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza  
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Drª Anissa Daliry  
Coorientadora: Drª Evelyn Pereira

**RIO DE JANEIRO**  
**2025**

FELIPE RAED XAVIER

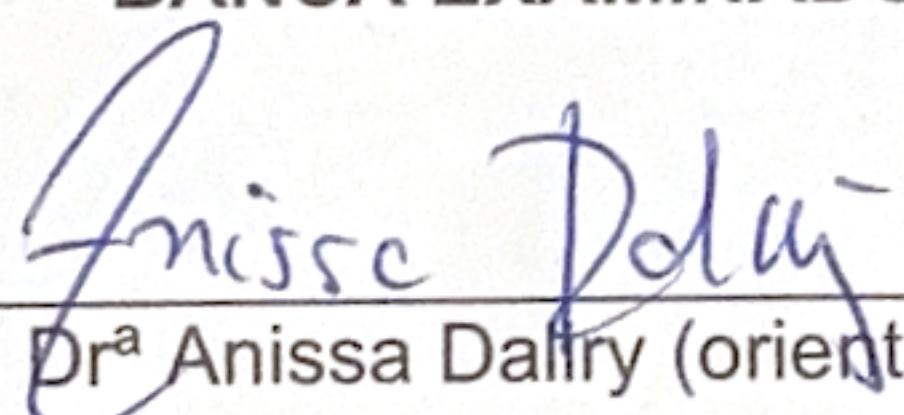
O PAPEL DO COLESTEROL NO DANO A MICROCIRCULAÇÃO RENAL EM  
UM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade do Grande Rio  
“Prof. José de Souza Herdy”, como requisito  
parcial para a obtenção do título de Bacharel  
em Biomedicina.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Anissa Daliry  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Evelyn Pereira

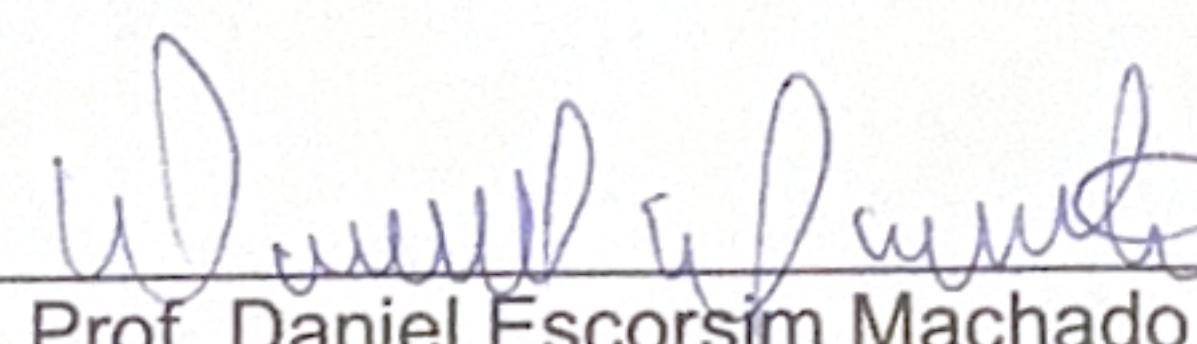
Aprovada em:  
Barra da Tijuca, 28 de Novembro de 2025.

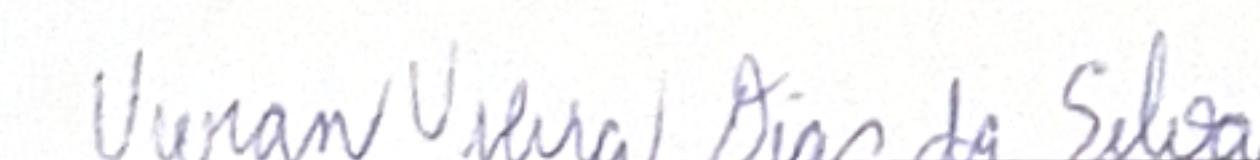
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Drª Anissa Daliry (orientadora)

Documento assinado digitalmente  
gov.br EVELYN NUNES GOULART DA SILVA PEREIRA  
Data: 03/12/2025 02:39:47-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Drª Evelyn Nunes Goulart da Silva Pereira (coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Daniel Escorsim Machado

  
\_\_\_\_\_  
MSc. Vivian Vieira Dias da Silva

## **AGRADECIMENTOS**

É de uma emoção imensa concluir mais um ciclo e, sem dúvidas eu não chegaria até aqui sem a ajuda dos que me rodeiam. Por isso, deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte dessa etapa concluída.

Gostaria de agradecer as minhas orientadoras, Anissa Daliry e Evelyn Goulart. Sem vocês eu não chegaria aonde estou e sou muito grato por todos os ensinamentos, críticas construtivas, pela paciência e pela confiança depositada em mim. Vocês me ensinaram lições valiosas que levarei comigo ao longo da minha jornada profissional.

Agradeço aos meus colegas de sala e laboratório pelo companheirismo e ajuda ao longo do caminho. Todos vocês contribuíram positivamente para a minha formação.

Agradeço aos meus professores. Graças a Deus tive a sorte de ter tido excelentes professores durante a minha jornada acadêmica. Eles foram cruciais para a minha formação como profissional e como cidadão.

Agradeço aos membros da banca, pela disponibilidade e aceitarem o convite para contribuir. Agradeço também as bolsas de fomento CAPES/CNPQ/FAPERJ e ao Instituto Oswaldo Cruz.

Por fim, gostaria de agradecer a minha família, pelo apoio incondicional e por todo suporte que sempre foi dado a mim. São o meu pilar e incentivo para me tornar uma pessoa melhor sempre.

## **SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO .....	9
2 METODOLOGIA .....	11
3 RESULTADOS.....	16
4 DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÃO.....	24
6 REFERÊNCIAS.....	25

# O PAPEL DO COLESTEROL NO DANO A MICROCIRCULAÇÃO RENAL EM UM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA

Felipe Raed Xavier<sup>1</sup>

Dr<sup>a</sup> Evelyn Nunes Goulart da Silva Pereira<sup>2</sup>

Dr<sup>a</sup> Anissa Daliry<sup>3</sup>

## RESUMO

A doença renal crônica (DRC) representa uma causa de mortalidade de prevalência global crescente, com a obesidade como um de seus principais fatores de risco. Este estado promove um ambiente lipotóxico, que eleva o acúmulo de colesterol, desencadeia processos inflamatórios, estresse oxidativo e disfunção endotelial, culminando em danos à microcirculação renal. No entanto, os mecanismos moleculares que conectam a lipotoxicidade à disfunção microvascular permanecem insuficientemente esclarecidos. Para investigar esta relação, este estudo distribuiu camundongos C57BL/6 em três grupos: Controle (dieta normocalórica), HFHC (dieta hiperlipídica/hipercalórica por 31 semanas) e HFHC+Col (suplementação com 2% de colesterol nas 8 semanas finais). A pesquisa avaliou a microcirculação renal e do tecido adiposo epididimal (TAE) por Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) e microscopia intravital. Os pesquisadores coletaram amostras de tecidos e soro para análises do perfil metabólico, estresse oxidativo e expressão gênica. Os resultados demonstram que a suplementação com colesterol (HFHC+Col) exacerbou o estresse oxidativo sistêmico e renal, evidenciado pelo aumento significativo de 4-HNE sérico, albuminúria e AGEs urinários. No TAE, o grupo HFHC+Col apresentou redução da atividade da catalase e aumento da SOD. Os grupos HFHC e HFHC+Col comprometeram significativamente a microcirculação, com aumento de leucócitos rolando e aderidos, redução do fluxo sanguíneo basal e prejuízo da vasodilatação dependente de acetilcolina. Especificamente no rim, o grupo HFHC+Col diminuiu o fluxo microvascular basal e elevou a expressão de DIAPH-1, uma proteína chave na desregulação do citoesqueleto e disfunção endotelial. Os dados reforçam que a lipotoxicidade induzida pelo colesterol atua como elemento central na disfunção microcirculatória renal, posicionando-a como um promissor alvo terapêutico para a DRC.

**Palavras-chave:** Lipotoxicidade. Microcirculação. Obesidade.

---

<sup>1</sup> Graduando do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

<sup>2</sup> Doutora em Biologia Celular e Molecular

<sup>3</sup> Doutora em Biologia Celular e Molecular

## ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) represents a leading cause of mortality with increasing global prevalence, with obesity as one of its main risk factors. This condition promotes a lipotoxic environment, which increases cholesterol accumulation, triggers inflammatory processes, oxidative stress, and endothelial dysfunction, culminating in damage to the renal microcirculation. However, the molecular mechanisms linking lipotoxicity to microvascular dysfunction remain insufficiently understood. To investigate this relationship, this study distributed C57BL/6 mice into three groups: Control (normocaloric diet), HFHC (high-fat/high-calorie diet for 31 weeks), and HFHC+Col (supplementation with 2% cholesterol in the final 8 weeks). The research team evaluated renal and epididymal adipose tissue (EAT) microcirculation using Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) and intravital microscopy. Researchers collected tissue and serum samples for metabolic profile, oxidative stress, and gene expression analyses. The results demonstrate that cholesterol supplementation (HFHC+Col) exacerbated systemic and renal oxidative stress, evidenced by a significant increase in serum 4-HNE, albuminuria, and urinary AGEs. In the EAT, the HFHC+Col group showed reduced catalase activity and increased SOD. Both the HFHC and HFHC+Col groups significantly compromised microcirculation, with increased rolling and adherent leukocytes, reduced basal blood flow, and impaired acetylcholine-dependent vasodilation. Specifically in the kidney, the HFHC+Col group decreased basal microvascular flow and increased DIAPH-1 expression, a key protein in cytoskeletal dysregulation and endothelial dysfunction. The data reinforce that cholesterol-induced lipotoxicity acts as a central element in renal microcirculatory dysfunction, positioning it as a promising therapeutic target for CKD.

**Keywords:** Lipotoxicity. Microcirculation. Obesity.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a doença renal crônica (DRC) apresentou um aumento significativo em sua prevalência e mortalidade, tornando-se uma das principais causas de óbito no mundo. Em 2016, a DRC ocupava a 13<sup>a</sup> posição entre as principais causas de morte no mundo, e projeções indicam que, até 2040, poderá se tornar a 5<sup>a</sup> principal causa de mortalidade global (Foreman, Kyle et al. 2019). Entre os fatores que contribuem para esse cenário, destaca-se a obesidade, condição caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que representa um importante fator de risco para o desenvolvimento e a progressão da DRC. A obesidade está frequentemente associada a complicações metabólicas, como diabetes mellitus, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (Sharma, Isha et al., 2023), as quais exercem papel determinante no comprometimento da função renal.

A crescente prevalência global da obesidade tem sido acompanhada pelo aumento paralelo na incidência da DRC, embora os mecanismos moleculares que conectam ambas as doenças ainda não estejam totalmente esclarecidos. Entre os processos propostos, destaca-se a lipotoxicidade, fenômeno resultante da desregulação do ambiente lipídico e/ou da composição intracelular, levando a disfunção de organelas, ativação anormal de vias de sinalização intracelular, inflamação crônica e, podendo levar, à morte celular (Ren, Linan et al. 2023). Sabe-se que a lipotoxicidade renal exerce efeitos deletérios sobre os rins por meio de múltiplos mecanismos de ação, incluindo inflamação, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático, resistência à insulina, desregulação do metabolismo lipídico e hiperativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Esses processos constituem marcadores iniciais de um estado lipotóxico renal, no qual o colesterol se destaca como principal agente patogênico, contribuindo diretamente para a progressão da DRC. O acúmulo de colesterol em células renais como os podócitos, células mesangiais e túbulos proximais, desencadeia disfunções celulares e, sobretudo, alterações microcirculatórias que comprometem a homeostase renal. (Ren, Linan et al. 2023).

A microcirculação renal tem um papel fundamental na filtração do sangue, reabsorção de nutrientes e excreção de resíduos (Hao, M et al. 2024). Seus principais componentes são a arteriola aferente, que leva o sangue para o glomérulo, o glomérulo que filtra o sangue e a arteriola eferente que leva o sangue filtrado até os

capilares peritubulares, onde ocorre a reabsorção de nutrientes e a troca com os túbulos (Hao, M et al. 2024). As alterações na microcirculação, como a disfunção endotelial, constituem um componente crítico na patogênese da DRC (Roumeliotis, Stefanos et al. 2020). O tecido adiposo disfuncional atua como um órgão endócrino inflamatório, liberando substâncias que prejudicam a função endotelial em outros órgãos, principalmente no rim. Com a obesidade, ocorre o aumento dos adipócitos, consequentemente, a vascularização não acompanha esse crescimento, gerando hipoxia local (Trayhurn, P. 2014). A falta de oxigênio estimula a liberação de citocinas inflamatórias, como o TNF-a e o IL-6, e o HIF-1a (fator indutor de hipoxia), que aumentam a inflamação e promovem uma disfunção endotelial (Eltzschig, Holger K., Carmeliet, Peter, 2011). O ambiente inflamatório leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), que danificam as células endoteliais dos microvasos, com isso, a integridade dos capilares é comprometida, levando à redução do número de capilares funcionais (rarefação), o que agrava ainda mais a entrega de nutrientes e oxigênio (Eltzschig, Holger K., Carmeliet, Peter, 2011).

Paralelo a isso, as citocinas pró-inflamatórias e mediadores produzidos no tecido adiposo, como TNF-a, IL-6, HIF-1a e a angiotensina II afetam diretamente a microvasculatura renal, especialmente os capilares peritubulares e glomérulos, uma vez que a obesidade ativa o SRAA, o que promove vasoconstricção da arteriola eferente, que aumenta a pressão glomerular, lesionando os capilares. (D'Agati, V. et al. 2016). Assim, como no tecido adiposo, ocorre disfunção endotelial renal, com perda de óxido nítrico (NO), aumento da permeabilidade e infiltração de células inflamatórias. Com o tempo ocorre esclerose dos glomérulos e rarefação da microcirculação renal, o que compromete a filtração, contribuindo para a progressão da DRC. O rim lesado agrava principalmente a retenção de sódio, hipertensão e resistência à insulina, o que agrava a obesidade e a vascularização, caracterizando uma retroalimentação negativa entre o rim e o tecido adiposo. Estudos clínicos e experimentais demonstraram que a ativação de vias intracelulares como a via do NF-KB e a produção de ROS induzem uma resposta inflamatória persistente, prejudicando o fluxo sanguíneo renal (Dai, Yao et al. 2014). Porém, o papel do colesterol dietético ainda é incerto.

Sendo assim, novos estudos são necessários para investigar os mecanismos pelos quais o colesterol afeta a microcirculação renal. O entendimento do papel do colesterol no dano a microcirculação renal é essencial para o desenvolvimento de

novas estratégias que visem ao tratamento e a prevenção mais eficaz da doença renal crônica.

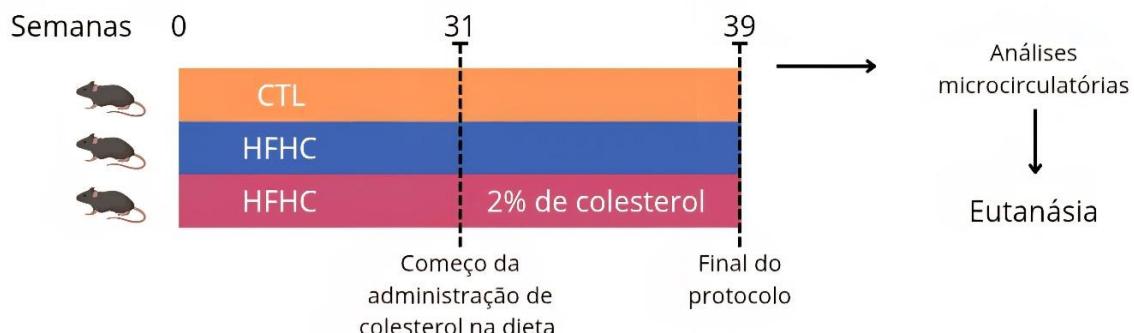
## 2 METODOLOGIA

### Animais e protocolos experimentais

No total, 30 camundongos machos C57BL/6 de 4 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, foram alojados em gaiolas de polipropileno em uma sala com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C. O modelo de obesidade foi induzido pela alimentação dos camundongos com uma dieta HFHC (55% de gordura, 35% de carboidrato) (Lino Rodrigues, K. et al. 2022) com 250 g/L de frutose na água potável (HFHC) por 31 semanas ( $n = 20$ ). O grupo controle (CTL) recebeu uma dieta normocalórica durante o mesmo período ( $n = 10$ ) (Nuvilab-CR1; Nuvital Nutrients Ltda., Curitiba, Brasil). Entre as semanas 31 e 39, um subgrupo de animais na dieta HFHC recebeu a adição de 2% de colesterol (HFHC + Col) ( $n = 10$ ), enquanto os outros grupos continuaram a receber a dieta anterior. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) – licença: L-012/2018-A1 da Fundação Oswaldo Cruz. A composição das dietas é mostrada na tabela 1.

**Tabela 1:** composição dos alimentos utilizados (%kcal).

	CTL	HFHC	HFHC+COL
<b>Proteínas</b>	21	10	10
<b>Carboidratos</b>	66	35	35
<b>Lipídeos</b>	13	55	55



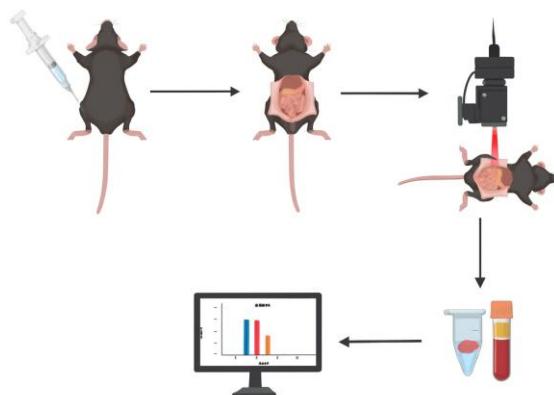
**Figura 1: Representação do protocolo utilizado no presente estudo.** Para o protocolo de avaliação do colesterol foram usados 30 camundongos, sendo eles: CTL (n=10), HFHC (n=10) e HFHC+Col (n=10). Criado com Canvas.com.

### Ingestão de alimentos e consumo energético

Durante os protocolos experimentais, os animais tiveram livre acesso à comida e à água. O consumo alimentar e hídrico foi monitorado semanalmente utilizando, respectivamente, uma balança analítica (UDC 50000/20; Urano, Brasil) e uma proveta de vidro graduada. As quantidades ingeridas foram determinadas pela diferença entre o alimento (g) ou volume de água (mL) oferecido e o remanescente. O consumo alimentar foi expresso como ingestão alimentar diária (g) e ingestão energética diária (kcal), enquanto o consumo hídrico foi expresso em mililitros; A ingestão energética foi calculada como o produto do consumo alimentar e hídrico pelo conteúdo energético da dieta.

### Procedimentos cirúrgicos

Ao final do protocolo experimental, os animais permaneceram em jejum noturno por 8 horas e foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para realização de uma laparotomia a fim de expor o rim direito e o tecido adiposo epididimal. A microcirculação renal foi então examinada por LSCI enquanto a microcirculação do tecido adiposo foi avaliado por LSCI e microscopia intravital (Pereira, ENGDS. et al. 2020). Os rins e os depósitos de tecido adiposo foram então coletados e pesados. Os tecidos foram armazenados a -80 °C para análises posteriores.



**Figura 2: Representação esquemática da avaliação terminal.** Os animais foram anestesiados para a realização da laparotomia para a exposição do rim direito e do tecido adiposo epididimal. A análise da microcirculação foi realizada por laser speckle e microscopia intravital, o soro e tecidos foram coletados para análises posteriores. Criado com BioRender.com

### Análise microcirculatória

- a. **Fluxometria:** A microcirculação renal e do tecido adiposo foi avaliada por meio de análise de perfusão *in vivo* por Laser Speckle Contrast Imaging (sistema Pericam PSI, Perimed, Suécia). Esse método permitiu monitorar o fluxo sanguíneo microvascular, expresso em unidades arbitrárias de perfusão (APUs, do inglês arbitrary perfusion units).
- b. **Microscopia intravital:** No leito microvascular, a interação entre leucócitos e endotélio (recrutamento leucocitário) foi avaliada pela contagem de leucócitos marcados com rodamina 6G (0,3 mg/kg, i.v.) rolando ou aderidos na microcirculação do tecido adiposo epididimal, em registros de 30 segundos cada (Pereira, ENGDS et al., 2020).

### Coleta de tecidos

Os animais foram submetidos a coleta de sangue por punção cardíaca, eutanásia e subsequente coleta de tecidos, sendo eles: rins direito e esquerdo, gordura marrom, gordura subcutânea, gordura visceral, gordura abdominal, gordura retroperitoneal e gordura epididimal, soro e urina para posteriores análises. Foi utilizada uma balança analítica (GR -200; A&D Company Limited, Tóquio, Japão) para pesagem dos tecidos supracitados.

### Glicemia de jejum

Os níveis de glicemia de jejum foram medidos usando glicosímetro (AccuChek; Roche, São Paulo, SP, Brasil) em animais que jejuaram durante a noite por 8 horas. Com tesoura cirúrgica, foi feito um corte <1 mm da ponta da cauda, obtendo-se uma gota de sangue coletada na fita previamente inserida no glicosímetro. Os níveis de glicemia de jejum foram expressos em mmol/L.

### **Teste oral de tolerância a glicose (TOTG)**

Para a avaliação de TOTG, após 6 horas de jejum foi administrada glicose por via oral por gavagem na concentração de 2g/kg para todos os animais e a glicemia (mmol/L) foi avaliada nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a administração da glicose, usando o monitor de glicose (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson Medical S.A., Buenos Aires, Argentina). A área sob a curva (AUC) foi determinada.

### **Medição de insulina**

O nível de insulina plasmática foi medido em animais que jejuaram durante a noite por 8 horas. A análise foi realizada usando um kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Millipore, Bedford, MA, EUA), seguindo as diretrizes do fabricante.

### **Resistência à insulina (HOMA-IR)**

O HOMA-IR foi calculado de acordo com a fórmula: insulina de jejum (mU/L) x glicemia de jejum (nmol/L)/22,5.

### **Análises bioquímicas**

Kit comercial foi usado para medir albuminúria (Bioclin System II, Belo Horizonte, MG, Brasil).

### **Avaliações de estresse oxidativo**

- a. **Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs):** A peroxidação lipídica foi avaliada medindo os níveis de malondialdeído (MDA) usando ácido tiobarbitúrico por meio de um método espectrofotométrico a uma absorbância de 535 nm. A quantidade de malondialdeído foi estimada em: MDA,  $\epsilon = 1,56 \times 105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .
- b. **Catalase:** Para avaliar a atividade da catalase, o consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi avaliado utilizando um espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). As medições foram feitas em um período de tempo de 3 minutos a 30°C e com comprimento de onda de 230 nm.
- c. **4-hidroxinonenal (4-HNE):** A concentração sérica de 4-hidroxinonenal (4-HNE) foi determinada por ELISA utilizando um kit comercial específico

(Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância foi medida a 450 nm. As concentrações foram calculadas por interpolação na curva padrão e expressas em ng/mL.

### Dosagem de AGEs

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) fluorescentes foram medidos na urina e no soro pelo método de Nakayama (Nakayama, H. et al. 1993), utilizando um leitor de microplacas ELISA SpectraMax (Molecular Devices, EUA). Uma preparação nativa de BSA (1 mg/ml de NaOH 0,1 N) foi usada como referência, e sua intensidade fluorescente foi definida como uma unidade de fluorescência. Os valores de fluorescência das amostras foram medidos a uma concentração proteica de 1 mg/ml e foram expressas em AU (do inglês, *arbitrary units*) em comparação com a preparação nativa de BSA.

### RT-PCR

Para realizar a extração do RNA total, foram utilizados 25 µg de tecido renal e o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, EUA). Na avaliação da qualidade e quantidade de RNA, utilizamos o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher, Rockford, IL, EUA), com 1 µL de RNA direcionado para a síntese de DNA complementar (cDNA) usando o Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Middletown, CT, EUA). Posteriormente, o cDNA foi amplificado em uma reação de PCR em tempo real de 20 µL, consistindo em 10 µL de SYBR Green, 1,6 µL de primers (direto e reverso), 3,4 µL de água destilada e 5 µL de cDNA diluído (1:2). No cálculo da expressão relativa, empregamos o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  normalizando os resultados pela expressão de beta-actina. O primers utilizados foram projetados para a amplificação dos seguintes alvos: DIAPH-1, forward: 5'-TGTCACTCTGCTTTCCCTT3', reverse: 5'-GAGAGTGGTTGAGACCCTTG-3' e o seu constitutivo foi GAPDH, forward: 5'-CATGGCCTTCCGTGTCCTA-3', reverse: 5'-GCGGCACGTCAGATCCA-3'.

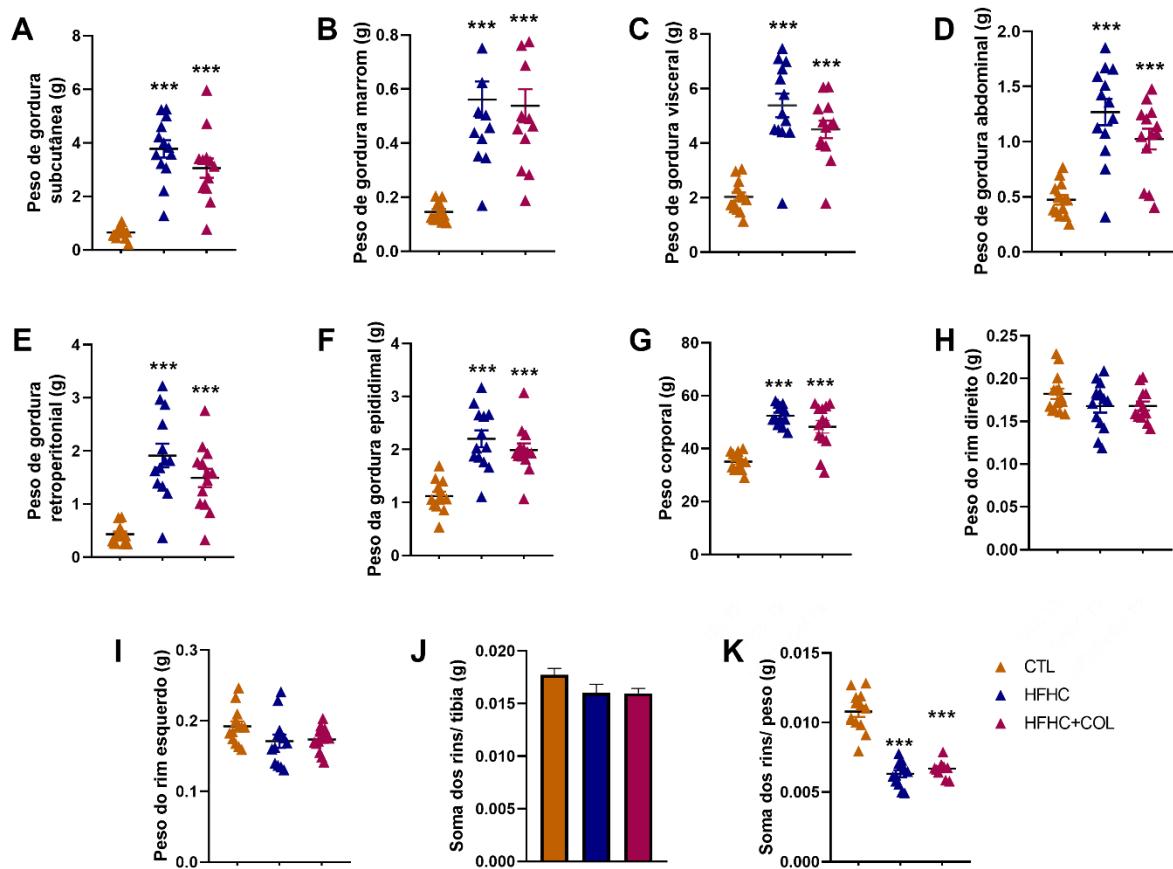
### Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de uma via com teste post hoc de Tukey ( $p<0,05$ ). As variáveis quantitativas foram apresentadas como média, acompanhada do erro padrão da média, enquanto as análises qualitativas foram descritas em valores absolutos (n) e relativos (%). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

## 3 RESULTADOS

Primeiramente foi estabelecido um quadro de obesidade utilizando uma dieta rica em gordura e carboidrato (HFHC) por 31 semanas. A partir da 31<sup>°</sup> semana até a 39<sup>°</sup>, foi adicionado a dieta 2% de colesterol em um dos grupos (HFHC+Col) a fim de analisar o papel do colesterol no dano a microcirculação renal.

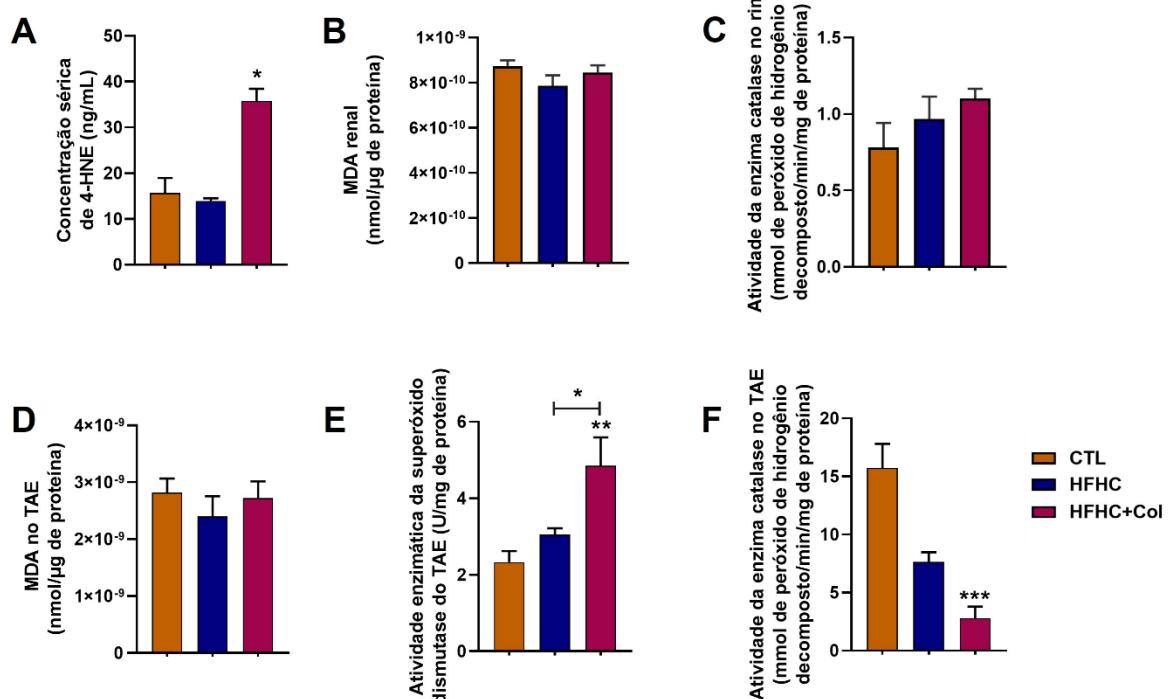
Ao avaliarmos as alterações metabólicas, pudemos observar que os camundongos alimentados com uma dieta rica em lipídios e carboidratos (HFHC e HFHC+Col) tiveram um aumento pronunciado dos depósitos de tecido adiposo subcutâneo e marrom (Figura 3.1 A, B). Também observamos um aumento expressivo do tecido adiposo visceral, evidenciado pela soma dos compartimentos abdominal, retroperitoneal e epididimal, os quais apresentaram valores superiores aos do grupo controle (Figura 3.1 C-F). Esses achados confirmam que ambas as dietas foram eficazes em promover acúmulo de gordura corporal, caracterizando de forma consistente o fenótipo obeso nos animais (Figura 3.1 G). Não foi observada diferença significativa quando analisamos o peso do rim direito, peso do rim esquerdo e a soma do peso dos rins normalizado pela tíbia (Figura 3.1 H-J). Por outro lado, quando analisamos a soma do peso dos rins normalizado pelo peso corporal, observamos uma diminuição significativa nos grupos HFHC e HFHC+Col em comparação ao grupo controle (CTL) (Figura 3.1 K).



**Figura 3.1. Avaliação dos parâmetros morfo-metabólicos.** Análises realizadas em camundongos alimentados com dieta controle (CTL), dieta rica em lipídios e carboidratos (HFHC) ou dieta HFHC suplementada com colesterol (HFHC+Col), mostrando: peso dos depósitos de gordura (A-F), peso corporal (G), peso do rim direito (H), peso do rim esquerdo (I), soma do peso dos rins corrigido pelo comprimento da tíbia (J) e soma do peso dos rins corrigido pelo peso corporal (K). \*\*\* $p < 0,001$ .

A avaliação dos marcadores de estresse oxidativo revelou alterações importantes decorrentes dos diferentes modelos dietéticos. A concentração sérica de 4-HNE apresentou aumento significativo no grupo HFHC+Col, indicando maior peroxidação lipídica sistêmica induzida pelo colesterol (Figura 3.2 A). Em contraste, os níveis renais de MDA e a atividade da catalase no rim não diferiram entre os grupos, sugerindo que o rim manteve relativa estabilidade frente ao estresse oxidativo (Figura 3.2 B,C). De maneira semelhante, o MDA no TAE não apresentou variações significativas (Figura 3.2 D). Entretanto, observamos um aumento expressivo na atividade da superóxido dismutase (SOD) no TAE do grupo HFHC+Col, possivelmente refletindo uma resposta adaptativa ao aumento de espécies reativas (Figura 3.2 E). Por outro lado, a atividade da catalase nesse mesmo tecido se mostrou significativamente reduzida nos grupos HFHC e, de forma ainda mais acentuada, no

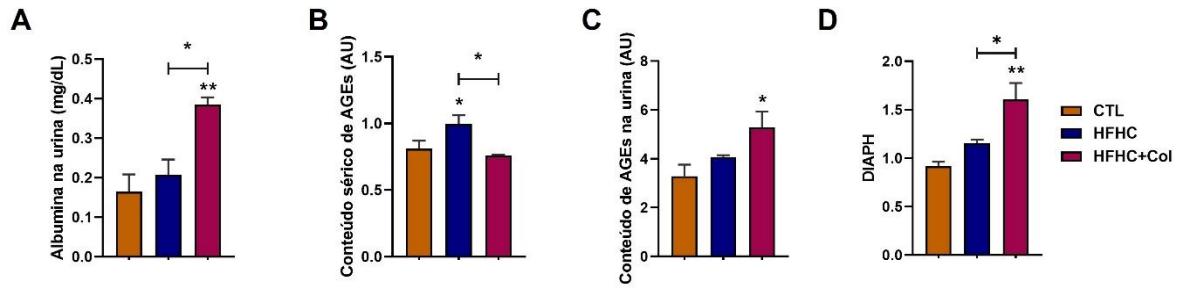
HFHC+Col, evidenciando comprometimento da capacidade antioxidante local (Figura 3.2 F). Esses achados indicam um desequilíbrio, especialmente no TAE, reforçando o impacto da dieta hiperlipídica acrescida de colesterol sobre o sistema antioxidante.



**Figura 3.2. Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.** Análises realizadas em camundongos alimentados com dieta controle (CTL), dieta rica em lipídios e carboidratos (HFHC) ou dieta HFHC suplementada com colesterol (HFHC+Col) são apresentadas como: concentração sérica de 4-HNE (A); níveis de malondialdeído (MDA) (B) e atividade da catalase no rim (C); níveis de MDA (D); atividade da superóxido dismutase (SOD) (E); e atividade da catalase no tecido adiposo epididimal (TAE) (F). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

Além disso, podemos observar um aumento significativo da albuminúria no grupo HFHC+Col em relação ao grupo controle (Figura 3.3 A), refletindo maior comprometimento renal e possível intensificação da glicação da albumina. Observamos também elevação dos níveis urinários de AGEs no grupo HFHC+Col quando comparado ao controle (Figura 3.3 C). Por outro lado, o conteúdo sérico de AGEs foi mais elevado no grupo HFHC em relação aos demais grupos (Figura 3.3 B), sugerindo diferenças no padrão sistêmico de acúmulo de produtos finais de glicação avançada. Além disso, a expressão de DIAPH-1 apresentou aumento significativo no grupo HFHC+Col em comparação aos outros grupos experimentais (Figura 3.3 D),

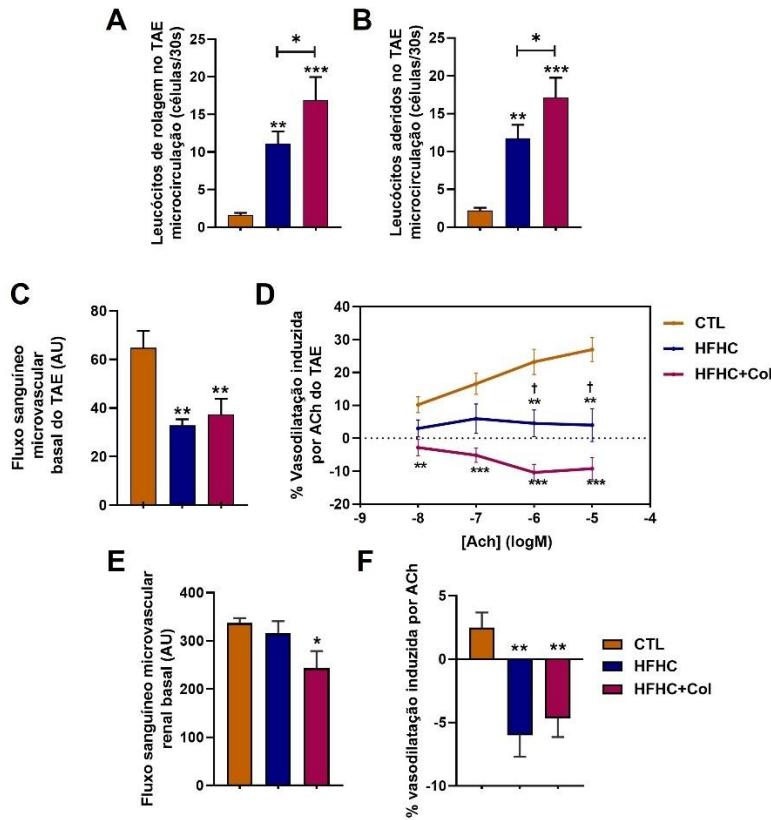
indicando possível ativação de vias associadas à resposta inflamatória e ao estresse celular.



**Figura 3.3. Marcadores de glicação e lesão renal:** Análises realizadas em camundongos alimentados com dieta controle (CTL), dieta rica em lipídios e carboidratos (HFHC) ou dieta HFHC suplementada com 2% de colesterol (HFHC+Col). São apresentados: níveis de albumina urinária (A), conteúdo sérico de AGEs (B), conteúdo urinário de AGEs (C) e expressão gênica de DIAPH-1 (D). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

A avaliação dos parâmetros microcirculatórios mostrou que a dieta HFHC induziu alterações inflamatórias significativas, que foram agravadas pela suplementação com colesterol. Observamos um aumento significativo no número de leucócitos rolando (Figura 3.4 A) e aderidos (Figura 3.4 B) na microcirculação do TAE nos grupos HFHC e, de forma mais acentuada, no HFHC+Col, indicando maior ativação endotelial e processo inflamatório local. Além disso, o fluxo sanguíneo microvascular basal no TAE apresentou redução significativa nos grupos HFHC e HFHC+Col em comparação ao controle (Figura 3.4 C), mostrando comprometimento da perfusão tecidual. A reatividade microvascular também foi afetada: a vasodilatação dependente do endotélio em resposta à acetilcolina se mostrou significativamente reduzida nos grupos HFHC e HFHC+Col, com piora evidente quando o colesterol foi adicionado à dieta (Figura 3.4 D).

No rim, o fluxo microvascular basal se manteve semelhante entre os grupos CTL e HFHC, porém sofreu redução significativa no grupo HFHC+Col (Figura 3.4 E), evidenciando um impacto adicional da suplementação de colesterol sobre a hemodinâmica renal. De maneira consistente, a vasodilatação renal induzida por acetilcolina foi negativamente afetada tanto no grupo HFHC quanto no HFHC+Col, demonstrando disfunção endotelial renal associada às dietas hiperlipídicas (Figura 3.4F). Em conjunto, esses achados indicam que a presença de colesterol dietético exacerba a inflamação, reduz o fluxo microvascular e compromete a função endotelial tanto no TAE quanto no rim.



**Figura 3.4. Efeito do colesterol dietético na função microcirculatória renal e do tecido adiposo epididimal:** Análises realizadas em camundongos alimentados com dieta controle (CTL), dieta rica em lipídios e carboidratos (HFHC) ou dieta HFHC suplementada com 2% de colesterol (HFHC+Col). São apresentados: número de leucócitos rolando (A) ou aderidos (B) na microcirculação do TAE; fluxo sanguíneo microvascular basal no TAE (C); vasodilatação dependente endotélio em resposta ao vasodilatador acetilcolina (ACh) no TAE (D); fluxo sanguíneo microvascular renal basal (E); e vasodilatação renal induzida por ACh (F). \* p < 0,05 vs CTL; \*\* p < 0,01 vs CTL; \*\*\* p < 0,001 vs CTL, † p < 0,05 vs HFHC+Col.

## 4 DISCUSSÃO

No presente estudo, abordamos o papel do colesterol como fator agravante dos distúrbios microcirculatórios associados à obesidade. Embora o colesterol seja um conhecido lipídio citotóxico (Reid, AE. 2001), seu papel e mecanismos de ação na progressão da doença renal crônica associada à obesidade (DRC) não são totalmente compreendidos.

Demonstramos que o colesterol dietético é capaz de agravar o quadro de obesidade, levando ao aumento do peso corporal e dos depósitos de gordura. Esses

achados estão alinhados com relatos anteriores em camundongos C57BL/6, que apresentam marcada suscetibilidade ao desenvolvimento de obesidade e disfunção metabólica quando expostos a dietas hipercalóricas (Williams et al., 2014). Além disso, a dieta suplementada com colesterol promoveu não apenas danos microcirculatórios no tecido adiposo, mas também acentuou a disfunção microvascular renal, fortalecendo a hipótese de que a adição de colesterol dietético atua como fator agravante na progressão da DRC associada à obesidade nos modelos murinos.

Um achado interessante foi a análise do peso renal. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos no peso dos rins, podemos observar uma diminuição significativa no peso dos rins quando normalizado pelo peso corporal nos grupos HFHC e HFHC+Col em comparação ao grupo controle. Este achado confirma mais uma vez a eficácia do modelo, refletindo o aumento desproporcional da massa corporal formada majoritariamente por tecido adiposo, que não foi acompanhada pelo aumento de parênquima renal. Sun, Yue et al. relataram o mesmo padrão em camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta rica em lipídios, demonstrando um acúmulo de lipídios nos rins. Isto sugere que a redução do peso renal em relação ao peso corporal é um fator causal do eventual acúmulo massivo de gordura corporal induzido pelo modelo dietético. A obesidade e a dislipidemia estabelecidas nos grupos HFHC criam um ambiente ideal para a lipotoxicidade. Trayhurn, P. já relatou que o acúmulo anormal de lipídios no rim desencadeia uma cascata de eventos citotóxicos, incluindo estresse oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial, o que é prejudicial para células especializadas do rim, como os podócitos e o endotélio microcirculatório.

Nossos resultados mostraram que o colesterol exacerbou a peroxidação lipídica sistêmica, evidenciada pelo aumento de 4-HNE no grupo HFHC+Col. Ao mesmo tempo, a atividade antioxidante apresentou alterações distintas entre rim e tecido adiposo epididimal. No tecido adiposo, o aumento da atividade da SOD acompanhado da redução da atividade da catalase sugere uma resposta antioxidante disfuncional. Enquanto a SOD aumenta como mecanismo de defesa frente ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), a queda da catalase indica incapacidade de neutralização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favorecendo o dano tecidual. Essa dissociação enzimática já foi descrita em modelos de obesidade, se relacionando ao microambiente hipóxico do tecido adiposo hipertrofiado (Trayhurn, 2014). No rim,

porém, a ausência de alterações significativas nos níveis de MDA e de atividade enzimática da catalase sugere que o parênquima renal, até este estágio experimental, consegue manter relativa estabilidade oxidativa, embora outras vias de dano (como disfunção endotelial e inflamação) já estejam claramente ativadas.

Uma das contribuições mais importantes deste estudo é a demonstração de que o colesterol dietético é capaz de agravar marcadores clássicos de injúria renal. O aumento significativo da albuminúria no grupo HFHC+Col reforça que o colesterol intensifica a permeabilidade da barreira de filtração glomerular, o que é compatível com a perda de integridade endotelial descrita em modelos de lipotoxicidade renal (Schelling, 2022). Além disso, o aumento de AGEs urinários no grupo HFHC+Col, mesmo sem aumento proporcional no soro, indica dano renal localizado. Essa dissociação sugere falha na retenção tubular e comprometimento da barreira glomerular, permitindo maior passagem de AGEs para a urina. Ware et al. (2011) mostram que alterações estruturais renais aumentam a excreção urinária de proteínas e compostos glicados. Esses resultados evidenciam que o colesterol, mais do que a dieta HFHC isolada, desempenha papel chave na promoção da glicação renal, associada ao início de processos inflamatórios mediados por vias ativadas, como AGE-RAGE. A expressão aumentada de DIAPH-1 no grupo HFHC+Col representa um elo mecanístico importante para explicar o agravamento da disfunção microvascular observado.

DIAPH-1 é um efetor downstream ativo da via RhoA/ROCK, responsável por modular o citoesqueleto de actina, a contratilidade endotelial e a permeabilidade vascular. Estudos recentes mostram que o colesterol ativa diretamente essa via, promovendo reorganização do citoesqueleto, redução da expressão de eNOS e diminuição da produção de NO (Satoh et al., 2011; Street & Bryan, 2011). Além disso, DIAPH-1 atua como mediador essencial da sinalização de RAGE, amplificando processos pró-inflamatórios e oxidativos em diferentes tecidos vasculares (Toure et al., 2012). Manigrasso et al. (2018) demonstraram que a deleção de DIAPH-1 protege o rim diabético contra danos estruturais e funcionais, reforçando sua participação como elemento-chave na fisiopatologia microvascular. Assim, nossos dados sugerem que o colesterol intensifica o estresse endotelial via ativação da via RhoA/ROCK, levando à superexpressão de DIAPH-1, perda do NO e consequente disfunção microcirculatória renal. Mais estudos são necessários para avaliar essa hipótese.

A avaliação microcirculatória revelou que tanto a dieta hiperlipídica quanto a suplementação com colesterol exerceram papéis chave na dinâmica vascular do rim e do tecido adiposo, evidenciando um processo de deterioração progressiva microvascular. No tecido adiposo epididimal, observamos um cenário característico de quadros relacionados à obesidade, com inflamação crônica de baixo grau, caracterizado pelo aumento expressivo de leucócitos rolando e aderidos ao endotélio, aumento esse que foi acentuado pela adição de colesterol à dieta. Esse recrutamento leucocitário reflete uma ativação endotelial sustentada, indicando que o ambiente metabólico criado pela dieta rica em lipídios e carboidratos é suficiente para desencadear um recrutamento inflamatório ativo. Esses achados são compatíveis com a literatura que descreve o tecido adiposo expandido como um importante foco de inflamação e disfunção microvascular, impulsionado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1 (Koenen, M. et al. 2021). Além da ativação inflamatória, a perfusão microvascular no tecido adiposo apresentou redução significativa nos animais alimentados com dietas HFHC. A queda do fluxo sanguíneo reflete não apenas a rarefação capilar, que costuma acompanhar o crescimento exagerado dos adipócitos, mas também o prejuízo direto da função endotelial em manter o tônus vascular adequado. A resposta vasodilatadora à acetilcolina reforça esse comprometimento, onde a capacidade de promover vasodilatação dependente de endotélio esteve claramente reduzida nos grupos HFHC, com redução significativamente acentuada no grupo HFHC+Col, com clara vasoconstrição, indicando menor biodisponibilidade de óxido nítrico e profundo desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores. Embora a obesidade isolada já tenha sido suficiente para prejudicar a vasodilatação dependente de endotélio, a avaliação da fluxometria por Laser Speckle demonstrou que apenas os animais suplementados com colesterol demonstraram redução significativa do fluxo microvascular basal, o que indica que o colesterol pode atuar como um segundo hit hemodinâmico. Neste leito microvascular, em semelhança ao observado no tecido adiposo, a resposta à acetilcolina nos grupos HFHC foi paradoxal: em vez de promover vasodilatação, como ocorre em um endotélio íntegro, a acetilcolina desencadeou vasoconstrição, caracterizando um estado avançado de disfunção endotelial. Esse comportamento paradoxal já foi descrito em modelos de atherosclerose e é interpretado como um marco de desorganização profunda da camada endotelial, frequentemente associado ao aumento de espécies reativas de oxigênio, redução da expressão de eNOS e

liberação exagerada de agentes vasoconstritores como endotelina-1 (Bar, A. et al. 2016). Dessa forma, os achados microcirculatórios revelam que o colesterol dietético não apenas acentua o processo inflamatório e a perda da perfusão tecidual, mas altera de maneira fundamental a capacidade do endotélio renal de responder a estímulos vasodilatadores. Isso demonstra que a adição de colesterol à dieta hiperlipídica transforma um quadro de disfunção moderada em um estado mais avançado de dano microvascular, sugerindo que assim como o tecido adiposo, o rim é particularmente sensível aos efeitos lipotóxicos do colesterol. Em conjunto, os resultados reforçam que o colesterol atua como um modulador crítico da hemodinâmica do tecido adiposo e renal, intensificando os efeitos nocivos da obesidade sobre a microcirculação e contribuindo de maneira decisiva para o avanço da lesão vascular.

## 5 CONCLUSÃO

Em conjunto, os achados deste estudo demonstram que o colesterol dietético exerce um papel determinante na DRC e no agravamento das alterações microcirculatórias associadas à obesidade. Embora a dieta hiperlipídica isoladamente já tenha sido capaz de induzir obesidade, estresse oxidativo e dano microvascular, foi a suplementação com colesterol que desencadeou uma desregulação ainda mais profunda, evidenciada pela intensificação da albuminúria, pelo aumento de AGEs urinários e pela perda expressiva da resposta vasodilatadora dependente de endotélio. Ao promover a superexpressão de DIAPH-1, o colesterol pode contribuir para a reorganização patológica do citoesqueleto endotelial, redução da disponibilidade de óxido nítrico e instalação de uma resposta paradoxal à acetilcolina, configurando uma disfunção endotelial avançada. Dessa forma, fica evidente que o colesterol não atua apenas como um agravante metabólico, mas como um agente central na perda da integridade da microcirculação renal e adiposa, acelerando processos lipotóxicos que favorecem a progressão da lesão vascular. Esses resultados reforçam a necessidade de avaliar o colesterol como alvo terapêutico específico em cenários de obesidade, direcionando futuras investigações para a compreensão detalhada do seu impacto na patogênese da doença renal crônica.

## 6 REFERÊNCIAS

Bar, A. et al. 2016. Retrospectively gated MRI for in vivo assessment of endothelium-dependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27348596/>. Acesso em: nov. 2025.

Barbosa JHP. et al. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000600005>. Acesso em: set. 2025.

Cominacini, L. et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10777555/>. Acesso em: set. 2025.

D'Agati, V. et al. Obesity-related glomerulopathy: clinical and pathologic characteristics and pathogenesis. Nature Reviews Nephrology, n. 12, p. 453-471, ago. 2016.

Dai, Yao et al. High fat diet causes renal fibrosis in LDLr-null mice through MAPK-NF- $\kappa$ B pathway mediated by Ox-LDL. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24220312/>. Acesso em: nov. 2025.

Eltzschig, Holger K., Carmeliet, Peter. Hypoxia and Inflammation. The New England Journal of Medicine, n.364, fev. 2011.

Foreman, Kyle J., et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. The Lancet, novembro, 2018.

Hao, M et al. The New Challenge of Obesity - Obesity-Associated Nephropathy. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38737387/>. Acesso em: ago. 2025.

Jager, Kitty J., et al. A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. Nephrology Dialysis Transplantation, n.34, p. 1803-1805, nov. 2019.

Koenen, M. et al. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8026272/>. Acesso em: nov. 2025.

Lino Rodrigues, K. et al. O treinamento aeróbico melhora a função microvascular e os parâmetros de estresse oxidativo em camundongos com diabetes tipo 2 induzida por dieta. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9527816/>. Acesso em: nov. 2025.

Ludmer, PL et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3093861/>. Acesso em: out. 2025.

Manigrasso, MB. et al. Deletion of the formin Diaph1 protects from structural and functional abnormalities in the murine diabetic kidney. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30132346/>. Acesso em: out. 2025.

Nakayama, H. et al. Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozocin-induced diabetic rat. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8425672/>. Acesso em set. 2025.

Pereira, ENGDS. et al. Pyridoxamine improves metabolic and microcirculatory complications associated with nonalcoholic fatty liver disease. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31876010/>. Acesso em: jul. 2025.

Reid, AE. Nonalcoholic Steatohepatitis. Gastroenterology, n. 121, p. 710-723, set. 2001.

Ren, Linan et al. The role of lipotoxicity in kidney disease: From molecular mechanisms to therapeutic prospects. Elsevier-Biomedicine e Pharmacotherapy, n. 161, mai. 2023.

Roumeliotis, Stefanos et al. Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease, from Biology to Clinical Outcomes: A 2020 Update. Journal of Clinical Medicine, n.9, sec. 8, ago. 2020.

Satoh, K. et al. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21622831/>. Acesso em: out. 2025.

Schelling, J.R. The Contribution of Lipotoxicity to Diabetic Kidney Disease. Cells, n. 11, out. 2022

Sharma, Isha et al. New Pandemic: Obesity and Associated Nephropathy. Frontiers in medicine, sec. Nephrology, n.8, jun. 2021.

Street CA, Bryan BA. Rho kinase proteins-pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22110183/>. Acesso em: out. 2025.

Sun, Yue et al. High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03122-4>. Acesso em: out. 2025.

Liu, Zhigang et al. High-Fat Diet Induces Hepatic Insulin Resistance and Impairment of Synaptic Plasticity. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128274>. Acesso em: out. 2025.

Touré, F. et al. Formin mDia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative and signal transduction pathways. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511750/>. Acesso em: out. 2025

Trayhurn, P. Hypoxia and Adipocyte Physiology: Implications for Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. Annual Review of Nutrition, n.34, p. 207-236, jul. 2014.

Ware, LB et al. Renal cortical albumin gene induction and urinary albumin excretion in response to acute kidney injury. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21147844/>. Acesso em: out. 2025.

Williams, Lynda M. et al. The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57Bl/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106159>. Acesso em: jul. 2025.