ANDRÉA OLIVARES MAGALHÃES

**Papel do fósforo e do paratormônio na
progressão da doença renal crônica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Nefrologia
Orientadora: Prof. Dra. Vanda Jorgetti

**São Paulo
2007**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo e Walkíria, por me incentivarem a tornar
sonhos em realidade.
A minha predileta irmã Ana Paula por seu amor e amizade.

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Lous e Zumar, por todas as orações e incentivo.
A minha querida Tidóca por suas boas “vibrações”.

DEDICATÓRIA

À minha orientadora e amiga Vanda Jorgetti, pela sua competência e carinho, minha grande referência de ser humano.

AGRADECIMENTOS

A Papa, minha grande amiga de toda a vida, por agüentar todas as minhas “loucuras”.

A minha grande amiga Có, por sua paciência e compreensão.

A Marilinha, por ter me incentivado nesta grande jornada.

As minhas mentoras intelectuais Kátia e Rosa, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

A Dra Denise Malheiros pelo apoio indispensável nas análises histológicas.

A Ivone, Sabrina, Tati e Clarice pelo apoio técnico irrestrito.

Ao Prof.Dr. Roberto Zatz, pela oportunidade de atingir este grau.

Ao Prof. Dr. Rui Toledo Barros, orientações indispensáveis para o êxito dessa pesquisa.

A Lú e Fabi pela amizade, apoio estratégico e infinita paciência.

Ao Guigo meu grande amigo por seu tempo precioso, disponibilidade e carinho.

A Cilene e Cris, grandes amigas. Criatividade e irreverência que deixam a vida mais leve.

As minhas grandes amigas “da Pós” Dani, Carol, Melzinha, Cris Karohl, Verônica, Samirah, Dimitri e Humberto, pela cumplicidade. Grandes conquistas deste trabalho.

A Flávia, surpresa deste reencontro.

A Dra Vitória Woronik, pelo apoio científico e descontração nos momentos mais oportunos.

A Bia, Ludmila, as “Nutri’s” Cris e Mari e Rodrigo pelo carinho.

Ao Valter, Meire, Eliane, Rita e Janice e a toda equipe do Laboratório de Investigação Médica LIM-16 por todo apoio.

Aos amigos de alma, sempre presentes de forma marcante na minha vida: Dani, Lilica, Erica, Tuca, Anita, Fina e Grá.

A Regininha, Luciene, Paula por todo carinho.

Aos meus primos Eti, Clau, Ale, Rolney, Mirtes e a toda família Magalhães pela enorme torcida.

Aos meus primos, “presentes” desta vida, Rozana e Finn que mesmo distantes estão sempre presentes.

Aos meus meninos Pedro, Lima e Luca por todo incentivo, confiança e oportunidade.

A Karen, Junia, Fernanda, Rute, Amelinha e equipe da Medserv por todo incentivo.

A Dra Yvoty, Dr Miorin, Dr Hélio, Dr. Ferraz, Dr Cícera, Dra Valéria e a todos os residentes da Santa Casa de São Paulo por todo apoio e carinho.

Ao Dr Pedro Jabur grande inspiração em Nefrologia.

A Dra Eva Zoppe por sua competência, sempre me apoiando nos momentos mais difíceis.

Às secretárias Denise, Neide, Eliana e Célia, pelas orientações e apoio valiosos.

“Os mais fortes de todos os guerreiros são estes dois: Tempo e Paciência.”

Leo Tolstoi

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

SUMMARY

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Progressão da doença renal crônica	1
I.1.a. Dados epidemiológicos da doença renal crônica	1
I.1.b. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença renal crônica	2
I.1.b.1. Fatores hemodinâmicos envolvidos na progressão da doença renal crônica	2
I.1.b.2. Fatores inflamatórios envolvidos na progressão da doença renal crônica	3
I.1.b.2.1. Angiotensina II	4
I.1.b.2.2. Fibroblastos e miofibroblastos	5
I.1.b.2.3. Macrófagos	6
I.1.b.2.4. TGF- β (Fator de crescimento transformante β)	7
I.1.c. Apoptose celular na DRC	9
I.1.d. Distúrbios do metabolismo mineral	
na progressão da DRC	11
I.1.d.1. Papel do cálcio	11
I.1.d.2. Papel do fósforo	12
I.1.d.3. Papel do paratormônio	13
I.1.d.4. Papel da vitamina D	14
II. OBJETIVO	16
III. MATERIAIS E MÉTODOS	17
III.1. Experimento 1	17
III.1.a. Seleção dos animais	17
III.1.b. Paratireoidectomia (PTX)	17
III.1.c. Nefrectomia 5/6 (NX) e implante de mini-bomba osmótica	18
III.1.d. Dietas	19
III.1.e. Grupos	20
III.2. Experimento 2	20
III.3. Bioquímica	21
III.4. Histologia do tecido renal	21
III.4.a. Preparo do tecido renal	21
III.4.b. Parafinização do tecido renal	22
III.4.c. Desparafinização e colorações histológicas	22
III.4.c.1. Tricrômio de Masson	23
III.4.c.2. Ácido periódico de Schiff (PAS)	24
III.5. Avaliação da histologia renal	25

III.6. Imuno-histoquímica	26
III.6.a. Silanização de lâminas para imuno-histoquímica	26
III.6.b. Métodos de imuno-histoquímica	26
III.6.c. Desparafinização e exposição antigênica	27
III.6.d. Reação de imunohistoquímica para ED1, α -actina, Ang II e TGF- β	28
III.6.e. Apoptose	31
III.7. Avaliação da imuno-histoquímica	33
III.7.a. Quantificação da expressão de ED-1 e Ang II	33
III.7.b. Quantificação da expressão de α -actina e TGF- β	33
III.7.c. Quantificação da apoptose	34
III.8. Análise estatística	35
IV. RESULTADOS	36
IV.1. Dados gerais dos animais do experimento 1	36
IV.2. Dados bioquímicos e hematócrito do experimento 1	37
IV.3. Porcentagem de expansão intersticial, esclerose glomerular e apoptose no tecido renal no experimento 1	38
IV.4. Expressão ED-1, α -actina, angiotensina II e TGF- β no tecido renal no experimento 1	41
IV.5. Análise univariada (experimento 1)	44
IV.6. Análise de regressão linear múltipla (experimento 1)	46
IV.7. Dados gerais dos animais do experimento 2	48
IV.8. Dados bioquímicos e hematócrito do experimento 2	49
IV.9. Porcentagem de expansão intersticial, esclerose glomerular e apoptose no tecido renal no experimento 2	50
IV.10. Expressão ED-1, α -actina, angiotensina II e TGF- β no tecido renal no experimento 2	53
IV.11. Análise univariada (experimento 2)	56
IV.12. Análise de regressão linear múltipla (experimento 2)	58
IV.13. Análise dos resultados histológicos agrupados em relação à concentração de P na dieta e PTH	60
V. DISCUSSÃO	61
VI. CONCLUSÃO	69
VII. REFERÊNCIAS	70

Lista de Figuras

Figura 1.	Principais eventos hemodinâmicos e inflamatórios envolvidos na progressão da DRC	8
Figura 2.	Experimento 1: quantificação da análise histológica (A e B) e apoptose renal (C)	40
Figura 3.	Experimento 1: quantificação da análise imuno-histoquímica para ED-1 (A), α -actina (B), Angio II (C) e TGF- β (D)	43
Figura 4.	Experimento 2: quantificação da análise histológica (A e B) e apoptose renal (C)	52
Figura 5.	Experimento 2: quantificação da análise imuno-histoquímica para ED-1 (A), α - actina (B), Angio II (C) e TGF- β (D)	55

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Pesos iniciais e finais e pressão arterial caudal (PAC) (experimento 1).....	36
Tabela 2.	Resultados da análise bioquímica e do hematócrito (experimento 1).....	38
Tabela 3.	Resultados da análise histológica e apoptose renal (experimento 1).....	39
Tabela 4.	Expressão de ED-1, α -actina, angiotensina II e TGF- β (experimento 1).....	42
Tabela 5.	Resultados das análises univariadas (experimento 1).....	45
Tabela 6.	Resultados das análises de regressão múltipla (experimento 1)	47
Tabela 7.	Pesos iniciais e finais e pressão arterial caudal (PAC) (experimento 2).....	48
Tabela 8.	Resultados da análise bioquímica e do hematócrito (experimento 2).....	50
Tabela 9.	Resultados da análise histológica e apoptose renal (experimento 2).....	51
Tabela 10.	Expressão de ED-1, α -actina, Angiotensina II e TGF- β (experimento 2).....	54
Tabela 11.	Resultados das análises univariadas (experimento 2).....	57
Tabela 12.	Resultados das análises de regressão múltipla (experimento 2).....	59

RESUMO

Magalhães AO. Papel do fósforo e do paratormônio na progressão da doença renal crônica [tese doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 82p

Introdução: Os mecanismos envolvidos na progressão da doença renal crônica (DRC) independentemente de sua etiologia, não estão totalmente esclarecidos. O controle do fósforo(P) sérico é uma meta essencial a ser alcançada no tratamento de pacientes com DRC. Inicialmente, a importância deste controle era atribuída a participação do P na patogênese do hiperparatireoidismo secundário. Atualmente sabe-se que a hiperfosfatemia aumenta a mortalidade desses pacientes. Distúrbios do metabolismo mineral participam da progressão da DRC, porém os mecanismos envolvidos na fisiopatologia, não foram esclarecidos.

Objetivo: Avaliar o efeito isolado da sobrecarga de P e de diferentes concentrações de paratormônio (PTH) na progressão da doença renal em ratos urêmicos.

Materiais e métodos: Ratos Wistar machos adultos foram submetidos à paratireoidectomia (PTX) e nefrectomia 5/6 (NX), a seguir implantamos mini bombas osmóticas com diferentes concentrações de PTH ou veículo. Realizamos 2 experimentos. Experimento 1: Animais que receberam dietas com diferentes conteúdos de P (1,2% ou 0,2% dieta rica e pobre respectivamente). Estes animais receberam infusão fisiológica de PTH (1-34 rat PTH 0,022/100g/h). No experimento 2, os animais receberam as mesmas dietas porém infusão elevada de PTH (1-34 rat PTH 0,11/100g/h). Os animais controles (grupo controle e sham) foram os mesmos para os dois experimentos. A alimentação dos animais foi controlada por *pair feeding* e a pressão arterial caudal (PAC) foi aferida semanalmente. Após 8 semanas os animais foram sacrificados. Creatinina corrigida por peso, P, cálcio, PTH e hematócrito foram analisados. No tecido renal quantificamos a fibrose intersticial (FI), esclerose glomerular (EG) e o número de células apoptóticas. Avaliamos, no tecido renal a expressão de ED-1, α -actina, angiotensina II e TGF- β .

Resultados: Animais NX que receberam infusão fisiológica de PTH e dieta rica em P desenvolveram mais FI, EG, e maior expressão de ED-1. Os animais que receberam infusão elevada de PTH apresentaram maiores níveis tensionais. Foi demonstrado uma correlação entre os marcadores inflamatórios (TGF- β e Angio II) confirmando a associação entre estes fatores no processo de fibrogênese. O número de células apoptóticas foi maior nos grupos NX que receberam PTH em concentração elevada.

Conclusão: Neste estudo, a sobrecarga de P atuou na progressão da DRC ativando principalmente vias inflamatórias e o excesso de PTH agiu piorando a hipertensão arterial.

Descritores: Fósforo, hormônio paratireoideano, progressão de doença renal, inflamação, fibrose intersticial, esclerose glomerular, modelos animais.

ABSTRACT

Magalhães AO. Role of phosphorus and parathyroid hormone in the progression of chronic kidney disease [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (University of São Paulo School of Medicine); 2007. 82p.

Introduction: The mechanisms involved in the progression of chronic kidney disease (CKD), regardless of its etiology, have yet to be well elucidated. Serum phosphorus control is an essential target to be achieved in the treatment of patients with CKD. Initially, the importance of this control was attributed to the participation of phosphorus (P) in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. It is currently known that hyperphosphatemia increases mortality in these patients. Disturbances of the mineral metabolism participate in the progression of CKD; however, the mechanisms involved in pathophysiology remain unclear.

Objective: To evaluate the isolated effect of phosphorus overload and different PTH concentrations in the progression of kidney disease in uremic rats.

Materials and methods: Adult male Wistar rats were submitted to parathyroidectomy and nephrectomy 5/6; subsequently, we implanted mini osmotic pumps with different concentrations of PTH or vehicle. We carried out 2 experiments. Experiment 1: Animals who received diets with different P contents (1.2% or 0.2% rich and poor diet, respectively). These animals received infusion of PTH solution (1-34 rat PTH 0.022/100g/h). In experiment 2, the animals received the same diets; however, with high PTH infusion (1-34 rat PTH 0.11/100g/h). Control animals (control group and sham) were the same for both experiments. Food intake of the animals was controlled by pair feeding, and caudal artery pressure (CAP) was measured weekly. After 8 weeks, the animals were sacrificed. Creatinine, phosphorus, calcium, PTH and hematocrit were analyzed. Interstitial fibrosis (IF), glomerular sclerosis (GS), and number of apoptotic cells were quantified in the renal tissue. ED-1 expression, α -actin, angiotensin II and TGF- β were evaluated in the renal tissue, as well.

Results: NX animals that received infusion of PTH solution and P-rich diet developed more IF and GS, and greater ED-1 expression. The animals that received high PTH infusion presented higher tensional levels. A correlation was demonstrated between inflammatory markers (TGF- β and Angio II) confirming the association between these factors in the fibrogenesis process. The number of apoptotic cells was higher in NX groups that received PTH in high concentration.

Conclusion: In this study, phosphorus overload acted in the progression of CKD activating inflammatory pathways; in addition, excess PTH worsened arterial hypertension.

Descriptors: Phosphorus, parathyroid hormone, progression of kidney disease, inflammation, interstitial fibrosis, glomerular sclerosis, animal models.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Progressão da doença renal crônica

I.1.a. Dados epidemiológicos da doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública mundial que mobiliza a comunidade nefrológica e científica especialmente quanto à prevenção e retardo de sua evolução. A incidência mundial de DRC no estágio 5 é de 8%, bem acima da taxa de crescimento populacional de 1,3% (1).

No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (2000-2006), o número de pacientes em diálise é de 70.872 (115 pacientes por milhão de habitantes) com um crescimento anual de 8,8% .Nos Estados Unidos em 2004 este número era de aproximadamente 497.934 (2).

O crescente número de pacientes em diálise consome quantias elevadas dos recursos da saúde, constituindo um importante problema sócio econômico. Portanto, intervenções que previnam ou retardem o desenvolvimento da DRC são de suma importância.

O ônus financeiro da DRC não se restringe unicamente ao tratamento dialítico propriamente dito, mas também ao tratamento de suas comorbidades como, por exemplo, as doenças cardiovasculares responsáveis por 50% dos óbitos neste grupo de pacientes.

Foley e cols. demonstraram que mesmo nas fases mais precoces da DRC, tais pacientes apresentam um risco mais elevado de doenças cardiovasculares quando comparados à população geral (3).

I.1.b. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença renal crônica

Os mecanismos envolvidos na progressão da DRC independentemente de sua etiologia, não estão totalmente esclarecidos. A agressão renal inicial pode ser consequência de fatores mecânicos (hiperfluxo e hipertensão glomerular), imunológicos, tóxicos ou decorrentes de alterações da barreira de filtração glomerular. Posteriormente, ocorre o aumento de matriz extracelular, proliferação celular, ativação de fatores de crescimento, produção de citocinas, além do recrutamento de células inflamatórias (4). Na fase final, ocorre cicatrização do tecido agredido, geralmente irreversível. Recentemente, Ritz e cols. relataram que os distúrbios do metabolismo mineral participam da agressão inicial e consequentemente atuam na progressão da DRC (5).

I.1.b.1. Fatores hemodinâmicos envolvidos na progressão da doença renal crônica

A perda de néfrons leva a alterações hemodinâmicas que elevam o fluxo plasmático glomerular e a pressão hidráulica nos néfrons intactos. Esses fatores aumentam a tensão sobre as paredes dos capilares, lesando as células endoteliais, promovendo microtromboses e estimulando tanto

essas células como também as células mesangiais a sintetizarem matriz extracelular e mediadores inflamatórios. Outra consequência da elevação do fluxo plasmático glomerular é promover a lesão dos podócitos, com ruptura e desagregação de suas paredes e consequente ativação do processo inflamatório. A perda de néfrons provoca sobrecarga hemodinâmica nos néfrons restantes estabelecendo um ciclo que perpetua o processo até a completa destruição do parênquima renal (6).

I.1.b.2. Fatores inflamatórios envolvidos na progressão da doença renal crônica

Nos últimos anos, atenção especial tem sido dada ao infiltrado inflamatório detectado nos vários tipos de doenças que acometem os rins. A quantidade de células inflamatórias presentes no interstício se correlaciona com a severidade das lesões glomerulares e túbulos-intersticiais e com a consequente perda da função renal (7).

Nos primeiros estágios da doença, observa-se um influxo de células inflamatórias independentemente da natureza do insulto inicial.

A ativação de várias moléculas, incluindo citocinas, fatores de crescimento e substâncias vasoativas, favorecem o acúmulo de matriz extracelular, fibronectina e outros componentes responsáveis pela fibrose intersticial.

Dentre esses fatores destacamos:

I.1.b.2.1. Angiotensina II

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é muito estudado no mecanismo regulatório da pressão arterial, além de controlar o balanço hidroeletrolítico (8). Seu principal efetor, a Angiotensina II (Angio II), atua em diferentes órgãos e sistemas. Nos vasos sangüíneos, a Angio II leva à vasoconstrição; no coração, favorece a hipertrofia das células cardíacas; nos rins, promove vaso constrição, predominantemente na arteríola eferente, com aumento da pressão intraglomerular e perda da seletividade da barreira glomerular com consequente filtração de proteínas e finalmente toxicidade renal intrínseca (9). A hipertensão intracapilar e o aumento na ultrafiltração de proteínas plasmáticas contribuem para a progressão da DRC. Em estudos experimentais onde inibiu-se a enzima de conversão da Angio II (ACEI) ou os receptores da angiotensina diretamente por antagonistas (BRA) demonstraram uma diminuição na proteinúria e da progressão da DRC (10).

Além de suas funções hemodinâmicas, a Angio II atua como uma citocina multifuncional, atuando como fator de crescimento, aumentando a proliferação dos miofibroblastos e estimulando a síntese de matriz extracelular (11). A Angio II tem uma potente ação pró-inflamatória com efeitos diretos sobre a função dos macrófagos e das células T aos quais se liga através de receptores AT1, além de promover a proliferação destas células e indução da expressão de TGF- β (12).

O papel da Angio II na produção de aldosterona pelas glândulas adrenais, bem como sua participação na lesão renal e cardíaca tem sido estudado (13). A renina, outro protagonista do SRAA, é reconhecida como um mediador de processos prófibróticos atuando em receptores específicos (12).

Estudos de imunohistoquímica demonstraram a expressão de Angio II não apenas nas arteríolas justaglomerulares, como também nas células intersticiais, sugerindo que o SRAA intra-renal tem um importante papel no processo inflamatório presente nas agressões ao tecido renal (14).

I.1.b.2.2. Fibroblastos e miofibroblastos

Os fibroblastos e miofibroblastos podem se originar de fibroblastos intersticiais residentes, células perivasculares ou tubulares, através da transdiferenciação induzida pelo TGF- β (15).

Os fibroblastos são considerados as células efetoras da fibrogênese, sintetizando uma grande variedade de componentes da matriz, como o colágeno e os proteoglicanos (16). A produção exacerbada destas proteínas leva ao acúmulo de colágeno e fibrose.

Mediadores inflamatórios promovem o recrutamento de macrófagos e linfócitos que, por sua vez, estimulam a transformação de células intersticiais em miofibroblastos (9).

Sabe-se também que durante a fibrogênese, os fibroblastos mudam seu fenótipo para miofibroblastos, células que expressam a α -actina no seu citoesqueleto.

A fibrose favorece a retração do tecido como consequência das modificações da α -actina e de outras proteínas.

Estudos revelam que o número de miofibroblastos presentes no tecido renal se correlaciona com a progressão da doença e pode preceder o desenvolvimento da cicatriz renal (16).

I.1.b.2.3. Macrófagos

Os macrófagos são geralmente detectados no tecido renal nas fases mais precoces das diferentes doenças que acometem esse órgão. A evidência de que estas células causam lesões glomerulares foi obtida de modelos experimentais onde o anticorpo anti-macrófago é eficaz na diminuição da lesão glomerular aguda (17).

Em modelos experimentais de ablação 5/6, os macrófagos são encontrados após uma semana da indução da insuficiência renal, aumentando progressivamente com o tempo (18). Essas células se acumulam tanto no glomérulo quanto no interstício e atuam principalmente através da produção de enzimas proteolíticas, radicais livres, substâncias vasoativas, síntese de citocinas (IL-1, $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, $\text{TGF}\beta$) e de fatores do crescimento fibrogênico (FGF) responsáveis pela manutenção do processo inflamatório (19).

A persistência destas células mesmo em fases tardias das doenças renais sugere que as mesmas participam também do processo inflamatório crônico (7).

I.1.b.2.4. TGF- β (Fator de crescimento transformante β)

O TGF- β é uma citocina que ativa o fibrinogênio, estimulando diretamente a síntese de matriz extracelular, além de inibir sua degradação. Essa citocina também age indiretamente através da ativação de outros fatores pró fibróticos, como o fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) (20). O TGF- β reduz a produção de colagenase e simultaneamente estimula a expressão do inibidor tecidual da metaloproteinase resultando em diminuição do “turnover” da matriz extracelular (21). Estudos de polimorfismo de TGF- β sugerem que essa citocina poderia ser utilizada como marcador genético na DRC (22).

Figura 1. Principais eventos hemodinâmicos e inflamatórios envolvidos na progressão da DRC
(Adaptado de *Nehrol Dial Transplant* (2002) 17: Editorial Comments Noronha IL et al)

I.1.c. Apoptose celular na DRC

A apoptose é um tipo particular de morte celular, distinguindo-se da necrose em diversos aspectos e é frequentemente referida como uma morte celular programada, cujos principais efetores são as caspases (cysteine aspartate specific proteases). As caspases são enzimas ativadas proteoliticamente em resposta a sinais intra e extracelulares que iniciam o processo apoptótico. Essas enzimas, uma vez ativadas, modificam vias metabólicas que levam à condensação e fragmentação do núcleo, clivagem do DNA genômico levando à morte celular (23).

Os marcadores de apoptose podem ser analisados através de técnica de imunohistoquímica (p53, Bax, caspase-3 ativada) ou detecção histoquímica de filamentos quebrados de DNA, característicos do processo apoptótico através da técnica de TUNEL (24).

A participação de fenômenos apoptóticos na progressão da DRC tem sido estudada. Sener e cols demonstraram em modelo de insuficiência renal, que o dano tecidual ocorre através da ativação de mediadores pro inflamatórios. O uso de antagonistas do receptor CysLT1 protege a progressão da DRC por sua habilidade em regular a geração de mediadores inflamatórios, inibir a infiltração neutrofílica e a apoptose (25).

A inibição da atividade da caspase em modelos experimentais de isquemia e reperfusão em rins de ratos, diminuiu a apoptose de células tubulares prevenindo a inflamação e a fibrose (26).

Um único estudo avaliou a relação entre fosfato e apoptose. Os autores demonstraram “in vitro”, que concentrações elevadas de fosfato induziam apoptose de células osteoblásticas. Tal fato era prevenido quando se acrescentava ácido fosfonofórmico ao meio de cultura. Esse ácido é um bloqueador do co-transportador Na-P, comprovando assim o papel do fósforo (P) no processo apoptótico. Neste experimento, as células tratadas com fósforo apresentaram perda do potencial de membrana mitocondrial, sugerindo que este ânion ativa a morte celular programada através da alteração da membrana mitocondrial (27).

Até o presente momento, nenhum outro estudo avaliou o papel do fósforo na indução de apoptose de outras células do organismo, especialmente as células renais.

I.1.d. Distúrbios do metabolismo mineral na progressão da DRC

I.1.d.1. Papel do cálcio

Níveis elevados de cálcio sérico (Ca) poderiam participar da progressão da DRC, pois favorecem o desenvolvimento de calcificação vascular e nefrocalcinose (28). Recentemente, Giachelli e cols. demonstraram em cultura de célula muscular lisa de vaso, que o aumento do cálcio extracelular eleva a expressão de receptores Na-P (Pit 1) o que facilitaria a entrada de P nas células e sua transformação fenotípica para osteoblastos com conseqüente calcificação (29). Cozzolino e cols. analisaram o impacto de quelantes de fósforo (P) (à base de cálcio ou não) em rins de ratos. Esses autores encontraram depósito aumentado de cálcio e maior fibrose túbulo-intersticial nos ratos que receberam quelantes a base de cálcio (30). Gimenez e cols., analisando 246 biópsias renais de pacientes com DRC, observaram uma correlação positiva entre o conteúdo de cálcio no rim e a creatinina sérica, ou seja, pacientes com maior conteúdo de cálcio apresentavam maiores níveis de creatinina.(31).

I.1.d.2. Papel do fósforo

O controle do fósforo sérico é reconhecido como uma meta essencial a ser alcançada no tratamento de pacientes com DRC. Inicialmente, a importância deste controle era atribuída a sua participação na patogênese do hiperparatireoidismo secundário. Porém, atualmente, outros distúrbios secundários a sua retenção começam a ser reconhecidos.

Block e cols. detectaram um aumento de 27% no risco relativo de morte em pacientes com DRC e fósforo sérico superior a 6,5 mg/dl (32). Posteriormente, os mesmos autores verificaram em um número maior de pacientes (n=40538), que esta associação já estava presente quando o fósforo e o cálcio sérico eram superiores a 5,5 mg/dl e 9,5 mg/dl, respectivamente, e o produto Ca x P maior que 55 mg²/dl² (33). Marchais e cols. descreveram alterações hemodinâmicas em pacientes com DRC e hiperfosfatemia. Esses autores demonstraram que a hiperfosfatemia associava-se a um aumento da pressão arterial e de eventos cardíacos (34, 35).

Recentemente em nosso laboratório, utilizando modelo experimental onde ratos foram submetidos à nefrectomia 5/6, paratireoidectomia total com infusão contínua de paratormônio e alimentados com dieta rica e pobre em fósforo, demonstramos que a hiperfosfatemia propiciou a hipertrofia miocárdica, piorou a função renal e levou à osteopenia (36).

Alfrey e cols. observaram que a restrição de fósforo na dieta diminuiu a progressão da doença renal tanto em animais como em humanos (37).

I.1.d.3. Papel do paratormônio

O PTH é o principal hormônio regulador de Ca e também participa da homeostase do P. Ele é secretado pelas glândulas paratireóides e a sua síntese e secreção são modulados pelos receptores sensíveis ao cálcio (CasR) presentes na superfície de suas células e de outros tecidos do organismo (38).

O PTH age em tecidos-alvo, dentre eles o ósseo e o renal. Porém, o aparelho cardiovascular também sofre sua ação uma vez que esse hormônio apresenta efeitos hemodinâmicos. O mecanismo pelo qual o PTH desempenha essa função ainda não está bem esclarecido, já que este hormônio apresenta efeito paradoxal na hemodinâmica (39).

Tanto fragmentos de PTH como a molécula intacta se ligam ao receptor PTH/PTHrP (PTHR1) e agudamente agem como potentes vasodilatadores, aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico, que por sua vez inibem os canais de cálcio dessas células, diminuindo o influxo de cálcio e consequentemente as concentrações de cálcio intracelular (40). Estudos com infusão aguda de PTH (41), mostraram relaxamento do leito vascular, vasodilatação e hipotensão (42).

Evenepoel e cols estudando pacientes transplantados renais, com persistência de hiperparatireoidismo secundário e hipertensos, revelou que os níveis pressóricos dos pacientes melhoravam após paratireoidectomia, porém pioraram a função renal. Os mecanismos pelos quais isto ocorre

ainda não estão totalmente esclarecidos, mas os autores atribuíram ao efeito do PTH sobre a secreção de renina (43).

Estudos experimentais em ratos (44) e cães (45) demonstraram que o aumento do PTH diminuiu o coeficiente de filtração glomerular, tal fato foi atribuído à presença de receptores de PTH nos podócitos (46). Em seres humanos a infusão aguda de PTHrp (1-34) promoveu um aumento na frequência cardíaca e do fluxo plasmático renal, porém, não foi observada elevação na pressão arterial ou aumento do inotropismo cardíaco (47).

É possível que, por alterações hemodinâmicas, o PTH atue na progressão da DRC, mas especula-se também seu efeito pró-inflamatório.

I.1.d.4. Papel da vitamina D

A deficiência de Vitamina D (Vit D) está presente em aproximadamente 32% dos pacientes com DRC no estágio 3 e 60% dos pacientes no estágio 4 e 5, segundo dados do estudo SEEK (48). Os receptores de Vit D já foram encontrados em mais de 30 tecidos do organismo. A Vit D não atua somente no metabolismo do Ca e P, mas também participa da regulação do sistema imunológico, crescimento, diferenciação e apoptose celular (49).

Os metabólitos da Vitamina D apresentam um efeito imunomodulador, atuando como antiinflamatório, inibindo a proliferação e hipertrofia dos miócitos e regulando o SRAA (50). Estudo experimental desenvolvido por Li e cols demonstrou em ratos *Knockout* para o receptor de vitamina D (VDR), que os níveis de Angio II estavam elevados; portanto, a VIT D atuaria como

um regulador negativo do SRAA. Esses resultados sugerem que a Vit D participa da proteção renal (51). Hirata e cols observaram o efeito do análogo da Vit D, o 22-oxa-calcitriol (OCT) em modelo experimental de NX (5/6). Ratos tratados com OCT apresentaram uma diminuição da albuminúria, da hipertrofia e esclerose glomerular em 8 semanas, quando comparados aos controles (52).

Em estudo clínico, o tratamento de pacientes com DRC com paricalcitol diminuiu a proteinúria, independentemente do uso concomitante de inibidor da enzima de conversão da Angiotensina (53).

Até o presente momento, poucos estudos avaliaram os distúrbios do metabolismo mineral na progressão da DRC.

Dessa forma desenvolvemos um modelo experimental onde avaliamos o papel do P e do PTH na progressão da DRC de ratos submetidos a nefrectomia 5/6.

II. OBJETIVO

Avaliar o efeito isolado da sobrecarga de fósforo e de diferentes concentrações de PTH na progressão da doença renal em ratos urêmicos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Realizamos dois experimentos, cada um deles com 8 semanas de duração (Experimentos 1 e 2).

III.1. Experimento 1

III.1.a. Seleção dos animais

Utilizamos ratos Wistar machos adultos com peso entre 280 e 320 g aclimatados durante uma semana no biotério. Os animais foram alojados em gaiolas, com livre acesso a água e dieta controle (Harlan-Teklad, Madison-WI/USA) contendo 0,7% de fósforo, 0,7% de cálcio e 25% de proteína. O ciclo sono-vigília foi respeitado com períodos iguais de iluminação (12h escuro, 12h claro), temperatura (25 °C) e umidade (25%).

III.1.b. Paratireoidectomia (PTX)

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg de peso) por via intraperitoneal (ip), para a realização da PTX. Foi feita uma incisão cervical anterior com exposição da traquéia e tireóide. As paratireóides foram cauterizadas com bisturi elétrico, preservando-se a tireóide. A incisão foi fechada com fio de algodão 4-0 e aplicada uma dose de penicilina

benzatina (100.000 UI/kg intramuscular). Os animais controles foram submetidos à anestesia com exposição da traquéia e tireóide e receberam a mesma dose de antibiótico. A eficácia da paratireoidectomia foi confirmada pela dosagem de cálcio iônico, ou seja, foram considerados paratireoidectomizados os animais cujos níveis de cálcio iônico eram iguais ou inferiores a 0,9 mmol/L.

III.1.c. Nefrectomia 5/6 (NX) e implante de mini-bomba osmótica

Os animais se recuperavam durante uma semana, recebendo dieta controle (15 a 20 g/dia), adotando-se o protocolo de *pair-feeding*, onde a quantidade de ração oferecida ao par de animais, era determinada pelo animal do par que ingeria menos ração.

Para realização da nefrectomia 5/6 (NX) os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg) ip. Realizamos então tricotomia na face anterior do abdômen, seguida de laparotomia com exposição do rim esquerdo e ligadura de dois a três ramos da artéria renal esquerda. Posteriormente, foi realizada nefrectomia total do rim direito. A incisão foi fechada por planos (muscular e peritônio parietal) com fio catgut cromado 4-0 e a pele com fio algodão 4-0. Simultaneamente à NX, a atividade do PTH era restaurada através do implante de uma minibomba osmótica (Alzet modelo: 2mL₄, Alza Corp, Palo Alto, CA, USA) colocada na região subcutânea interescapular. Essa minibomba liberava o hormônio de forma constante e de acordo com a concentração escolhida, ou seja: PTH normal

(1-34 rat PTH na dose de 0,022/100g/h) ou alto (1-34 rat PTH na dose de 0,11/100g/h) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). No 28^o dia, a mini-bomba foi substituída por uma nova, com o animal anestesiado com éter, mantendo-se as mesmas concentrações de PTH referidas anteriormente. A troca foi necessária, pois a vida útil de cada mini bomba era de 28 dias. Essa incisão foi fechada com fio de algodão 4-0 e aplicamos uma dose de penicilina benzatina (100.000 UI/kg, i.m.). Os animais controles foram submetidos à laparotomia, com manipulação do hilo renal e implante de mini-bomba osmótica contendo veículo (cisteína a 2% em solução salina 0,9%. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

III.1.d. Dietas

Após o período de recuperação cirúrgica, foi oferecida dieta para os ratos com distintas concentrações de fósforo: dieta rica em fósforo (1,2%), dieta pobre em fósforo (0,2%), de acordo com o grupo estudado. O sistema de *pair feeding* foi mantido até o final do estudo.

III.1.e. Grupos

Os grupos que compõem o Experimento 1 estão descritos a seguir:

NPP (n=8): Paratiroidectomia (PTX) + Nefrectomia (NX) + dieta pobre em fósforo (PTH normal: 0,022/100g/h).

NRP (n=8): PTX + NX+ dieta rica em fósforo (PTH normal: 0,022/100g/h).

DC (n=10): Sham NX + Sham PTX + dieta controle.

SHPP (n=8): Sham NX + Sham PTX + dieta pobre em fósforo.

SHRP (n=8): Sham NX + Sham PTX + dieta rica em fósforo.

III.2. Experimento 2

Para a realização do experimento 2 utilizamos a mesma metodologia descrita anteriormente, porém os ratos NX receberam concentrações elevadas de PTH infundidas através de mini bomba osmótica. Os grupos controle (DC) e Sham (SHPP e SHRP) são os mesmos utilizados no experimento 1.

APP (n=9): PTX+ NX+ dieta pobre em fósforo (PTH alto: 0,11/100g/h).

ARP (n=7): PTX + NX+ dieta rica em fósforo (PTH alto: 0,11/100g/h).

DC (n=10) : Sham NX + Sham PTX + dieta controle.

SHPP (n=8): Sham NX + Sham PTX + dieta pobre em fósforo.

SHRP (n=8) : Sham NX + Sham PTX + dieta rica em fósforo.

Passadas as 8 semanas, os animais foram sacrificados, sendo anestesiados com pentobarbital (50mg/Kg ip) e submetidos à coleta de sangue através de punção aórtica, além de se proceder à retirada do rim direito para análise histológica e imunohistoquímica.

III.3. Bioquímica

Nas amostras de sangue determinamos o hematócrito (Htc), Ca iônico (Cai) (analisador de eletrólitos AVL-9140), fósforo (P) (método colorimétrico Labtest- Lagoa Santa, MG/BR), PTH (rat PTH IRMA kit – Immutopics San Clemente, CA/USA) e a creatinina (método colorimétrico Heinegard-Tiderstrom modificado). A creatinina foi corrigida por 100g de peso do animal (Cr/100g).

III.4. Histologia do tecido renal

III.4.a. Preparo do tecido renal

Após a extração, o rim foi seccionado em fragmentos coronais de aproximadamente 3 mm fixados em solução de Duboscq-Brazil. Em seguida, estes fragmentos permaneceram por 2 horas em solução de formol a 10% acrescido de tampão fosfato e posteriormente foram incluídos em parafina.

III.4.b. Parafinização do tecido renal

Após a fixação, os fragmentos de rins foram colocados em caixetas perfuradas e identificadas. Estas caixetas foram colocadas no processador automático de tecido (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha). Esse procedimento durou aproximadamente 14 horas e os fragmentos foram desidratados em soluções com concentrações progressivas de álcool 50%, 70%, 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos), seguida de diafanização (álcool absoluto + xilol (v/v), xilol (3 banhos) foram então imersos sequencialmente, em parafina fundida a 60°C. Após solidificação, os blocos de parafina com os fragmentos permaneceram em temperatura ambiente.

Antes de serem seccionados, os blocos permaneceram 30 minutos a -20°C sendo então cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) na espessura de 3 a 4 µm. Os cortes foram colocados em lâminas previamente revestidas com gelatina 2% (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). Essas lâminas permaneceram na estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas a 4°C.

III.4.c. Desparafinização e colorações histológicas

Antes das colorações histológicas, as lâminas foram desparafinizadas em xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. A seguir, desidratadas em álcool absoluto (2 vezes), álcool 96% e álcool 70%. Finalizado este processo, as

lâminas foram hidratadas e processadas para as diferentes colorações histológicas.

III.4.c.1. Tricrômio de Masson

Após a desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram imersas em solução de hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente, permanecendo no escarlate de Briebrich (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) durante 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. As lâminas foram então submersas em diferenciador de Masson (preparado no laboratório) durante 5 minutos, seguindo-se de uma solução de anilina a 5%, durante 5 minutos e posteriormente lavadas em água corrente. A seguir, passaram por água acética a 1% para fixação da anilina seguido de desidratação, diafanização e montagem em meio permanente.

Para preparar o diferenciador de Masson, adicionamos 5g do ácido fosfomolibdico (QEEL, São Paulo, Brasil), 5g do ácido fosfotúngstico (QEEL, São Paulo, Brasil) em 200ml de água destilada, sob agitador magnético. A solução foi filtrada em papel filtro de 6 µm de espessura.

A solução de anilina foi preparada dissolvendo-se 3 g de azul de anilina (QEEL, São Paulo, Brasil) em 100 ml de água destilada acrescida de 2 ml de ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha) sob agitador magnético por alguns minutos e filtrada com papel filtro de 6 µm de espessura.

III.4.c.2. Ácido periódico de Schiff (PAS)

Após terem passado pelo processo de desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram lavadas em água destilada e permaneceram no ácido periódico 1% durante 10 minutos, sendo então lavadas novamente em água destilada. As lâminas foram coradas pelo reativo de Schiff durante 45 minutos em ambiente escuro e lavadas em água corrente durante 10 a 15 minutos. A contra-coloração foi realizada com a hematoxilina de Harris (preparada no laboratório) por 5 minutos, lavadas em água corrente e montadas com lamínulas com o meio permanente, Permount (Fischer Chemical, New Jersey, EUA).

Para o preparo do reagente de Schiff, foi adicionado 1 g de fuccina diamante (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 200 ml de água destilada fervente. Quando a temperatura atingiu 50° C, esta solução foi filtrada em papel de filtro fino adicionando-se então 30 ml de ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após atingir a temperatura ambiente, acrescentamos 9g de metabissulfito de sódio anidro (Merck, Darmstadt, Alemanha) e esta solução foi colocada em ambiente escuro durante 48 horas. Após este período, a solução adquiriu coloração amarelo-palha. Foi então adicionado 1g de carvão ativo de Norita (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a solução foi filtrada com bomba à vácuo, adquirindo uma cor transparente.

A hematoxilina de Harris foi preparada dissolvendo-se em 1000 ml de água destilada fervente, 100g de alumínio e amônio sulfato dodecahidrato (alúmen) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em paralelo, dissolvemos 5g de hematoxilina (Sigma, Chemical Co, St Louis, EUA) em álcool aquecido. Em

seguida, estas 2 soluções foram misturadas e fervidas rapidamente adicionando-se 2,5g de óxido de mercúrio vermelho (Merck, Darmstadt, Alemanha) até atingir a cor púrpura-escuro. O corante foi então filtrado.

III.5. Avaliação da histologia renal

Fibrose intersticial: A quantificação da expansão do interstício renal, ou seja, a fibrose intersticial (FI) foi realizada em lâminas coradas pelo Tricrômio de Masson. Sobreposamos um retículo de 100 pontos desenhado em plástico transparente a tela de um computador. Essa tela foi acoplada a um microscópio óptico comum, permitindo a visualização das estruturas do tecido renal. Dessa forma, contamos os pontos do retículo que se sobrepunham às áreas de FI do interstício renal. Analisamos 25 campos consecutivos sob um aumento de 100x (Jepsen & Mortensen, 1979). Os resultados foram expressos em porcentagem da área de expansão do interstício sobre a área total.

Esclerose glomerular: A quantificação da esclerose glomerular (EG), foi realizada em lâminas coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Foram observados em torno de 60 glomérulos com um aumento de 400X. Os glomérulos foram classificados de acordo com suas características histológicas em normais ou esclerosados. O número de glomérulos esclerosados foi expresso como porcentagem do número total de glomérulos.

III.6. Imuno-histoquímica

III.6.a. Silanização de lâminas para imuno-histoquímica

Inicialmente, as lâminas foram lavadas com detergente neutro por 24 hrs (Extran 10%)(Merck, Darmstadt, Alemanha). No dia seguinte, foram novamente lavadas durante uma hora em água corrente e por 10 minutos em água destilada. A seguir, foram mergulhadas em solução de álcool absoluto e éter (1:1) por 15 minutos (2 vezes) e, posteriormente, lavadas com água destilada. Permaneceram em estufa a 60 °C, até a secagem.

No preparo do organosilano utilizamos uma solução de organosilano a 2% (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) diluído em 500 ml de acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram mergulhadas nessa solução por 3 minutos.

III.6.b. Métodos de imuno-histoquímica

Utilizamos anticorpos específicos para identificação de macrófagos (ED-1), da expressão de angiotensina II (Ang II) de α -actina de músculo liso (α -actina) e de TGF- β . O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos omitindo-se o anticorpo primário específico. A seguir, a descrição da metodologia.

III.6.c. Desparafinização e exposição antigênica

Inicialmente as lâminas foram desparafinizadas. Esse procedimento consiste em colocar as lâminas em estufa à 60°C por 30 minutos e a seguir em xilol durante 9 minutos, 3 vezes.

Em seguida, mergulhamos as lâminas em álcool absoluto por 5 minutos (2 vezes) e álcool 96%, por 3 minutos (2 vezes).

Finalizado este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS) pH=7,6. A solução TBS foi preparada misturando-se Tris HCl a 0,5M (Serva, Heidelberg, Alemanha) pH=7,6 acrescida de cloreto de sódio (NaCl) a 0,15M (Merck, Darmstadt, Alemanha), na proporção de 1:10.

O forno de micro-ondas foi utilizado para aumentar a exposição antigênica, uma vez que a parafinização pode diminuir a expressão dos antígenos no tecido dificultando sua detecção. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico mono hidratado dissolvido em 1000ml de água destilada, ajustando pH=6,0 com NaOH) e levadas ao micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts. Este procedimento foi realizado uma vez durante 15 minutos (Torben e cols, 1994; Leong e cols, 1990).

III.6.d. Reação de imuno-histoquímica para ED1, α -actina, Ang II e TGF- β

As reações de imuno-histoquímica, para identificação da expressão de ED-1, α -actina e Ang-II foram realizadas pela técnica estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina.

ED-1: após exposição antigênica, realizamos o bloqueio da avidina e da biotina endógenas durante 15 minutos cada um, seguido do bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), na diluição de 1:70, durante 30 minutos. Os cortes foram então, incubados com anticorpo monoclonal primário, de rato, anti-macrófago (Serotec, EUA) na diluição de 1:200. Essa etapa durou uma noite, a 4°C, em câmara úmida. Depois disso os cortes foram incubados com imunoglobulina biotinilada anti-camundongo adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA), na diluição de 1:200, durante 45 minutos seguida de nova incubação com o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. Para visualização da positividade das células utilizamos substrato cromogênico preparado à base do corante “fast red”. Nessa etapa as lâminas foram incubadas com substrato composto de, 2 mg de naftol AS-MX-fosfato (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA), dissolvido em 200 μ l de dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha), acrescido de 9,8 ml de solução tris-tamponada a 0,1M pH=8,2 e 10 mg do corante “fast red” (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). A fosfatase alcalina endógena foi bloqueada, com 20 μ l de levamisol 1M (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). e filtrada, com filtro comercial de porosidade 0,22 μ m (Millipore, São Paulo, Brasil).

Durante o período de revelação, as lâminas foram observadas ao microscópio. Após um período de aproximadamente 10 minutos, a revelação foi interrompida mergulhando-se as lâminas em TBS. Os cortes foram contra-corados durante 90 segundos com hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) e lavados em água corrente para intensificação da tonalidade azul do corante.

Na montagem das lâminas, empregamos lamínulas previamente imersas em gelatina glicerina Kaiser (Merck, Darmstadt, Alemanha) aquecida. As células que expressam ED-1 apresentam cor vermelha

α -actina: inicialmente realizamos o bloqueio da avidina e da biotina endógenas durante 15 minutos cada uma, seguida do bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:70, durante 30 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- α -actina de músculo liso (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) na diluição de 1:800. Essa etapa, durou uma noite, a 4°C, em câmara úmida. A seguir os cortes, foram incubados com imunoglobulina biotinilada anti-camundongo adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:200, durante 45 minutos, seguida de nova incubação com o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. O tempo de revelação com o substrato cromogênico foi de 10 minutos e a contra-coloração foi feita com hemalumbre de Mayer. As células que expressam α -actina apresentavam cor vermelha.

Ang-II: Após exposição antigênica em tampão citrato, realizamos o bloqueio da avidina e da biotina endógena 15 minutos cada um, seguido de bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:70, durante 30 minutos. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Ang II (Península, Belmont, EUA) na diluição de 1:400 durante a noite, a uma temperatura de 4°C, em câmara úmida. A etapa seguinte foi uma incubação com imunoglobulina biotinilada de cabra anti-coelho (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1000, durante 45 minutos e em seguida com o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. O tempo de revelação com o substrato cromogênico foi de 10 minutos e a contra-coloração realizada com hemalumbre de Mayer. As células que expressam a AngII apresentavam cor vermelha

TGF- β : Para avaliação da expressão do TGF- β utilizamos a técnica da avidina-biotina/peroxidase. Realizamos o bloqueio de peroxidase endógena durante 30 minutos, com uma solução de peróxido de hidrogênio 10% em álcool metílico com uma concentração final de 3%. Após as laminas foram lavadas em PBS durante 5 minutos. Seguiu-se o bloqueio da avidina endógena, por 15 minutos, e o bloqueio inespecífico com soro não imune de cavalo durante 30 minutos. O anticorpo primário foi o anticorpo policlonal de coelho anti-TGF- β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), na diluição de 1:10 seguido de incubação foi durante toda a noite a uma temperatura de 4°C, em câmara úmida.

Antes da incubação com o anticorpo secundário, as lâminas permaneceram durante 60 minutos em câmara seca. Em seguida foram lavadas e incubadas com uma imunoglobulina biotinilada anticoelho (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1000, durante 45 minutos. Como último passo, as lâminas foram incubadas com o complexo avidina-biotina/peroxidase (ABC Kit- Vector, Burlingame, EUA) durante 30 minutos.

A solução de revelação foi feita na hora com 10 mg amino-etil-carbazol (AEC) (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) dissolvido em 2,5 ml de dimetilformamida. A esta solução foram acrescentados 47,5 ml de tampão de acetato a 0,05M pH=5,0 e 250 µl de uma solução de peróxido de hidrogênio a 3 % (Merck, Darmstadt, Alemanha). O tampão acetato é composto de 3,7 ml de ácido acético a 0,2M e 8,8 ml de acetato de sódio a 0,2M diluído em água destilada qsp 50 ml.

A contra-coloração das lâminas foi obtida com o corante hemalumbre de Mayer. As lamínulas foram colocadas em gelatina glicerizada Kaiser (Merck, Darmstadt, Alemanha) previamente aquecida. As células que expressam o TGF- β apresentavam cor marrom.

III.6.e. Apoptose

A apoptose foi detectada pela técnica de TUNEL (*TdT-mediated X dUTP nick labeling*). Para tal procedimento utilizamos o “Kit” *Apoptag Plus Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit* (Chemicon International, EUA).

Esta técnica consiste na marcação da extremidade 3'OH de oligonucleotídeos originados da fragmentação do DNA durante o processo

de apoptose celular. Os fragmentos de DNA são submetidos à polimerização pela enzima terminal transferase, que acrescenta nucleotídeos marcados com uma molécula de digoxigenina. Esta é reconhecida por um anticorpo marcado com a enzima peroxidase, que é revelada com diaminobenzidina (DAB) e gera uma coloração marrom. A técnica é descrita a seguir.

O tecido foi inicialmente desparafinado, seguido de incubação com proteinase K (20 µg/ml) durante 15 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em PBS durante 60 minutos. Em seguida, o excesso do bloqueio foi retirado e acrescentado à solução de equilíbrio por aproximadamente 1 minuto.

As lâminas foram incubadas com a enzima terminal desoxinucleotídeo transferase (TdT) na diluição de 1:7 em tampão do kit (Chemicon International, EUA). A incubação foi feita em câmara úmida por 60 minutos a 37 °C. Ao término desse período, as lâminas foram imersas em solução de parada por 10 minutos.

Na etapa seguinte, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado com a enzima peroxidase, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Foram realizadas quatro lavagens das lâminas em PBS e em seguida, feita a revelação da enzima com DAB, acompanhada à luz do microscópio e interrompida por volta de 6 minutos em tampão. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com verde de metila a 0,5% (MERCK, Darmstadt, Alemanha) e montadas com gelatina glicerizada. As células positivas

apresentam cor marrom/acastanhado e correspondem às células em apoptose.

III.7. Avaliação da imuno-histoquímica

III.7.a. Quantificação da expressão de ED-1 e Ang II

Contamos o número de células positivas presentes em diferentes estruturas renais, como glomérulos, interstício e túbulos em 25 campos sob um aumento de 200x. O resultado foi expresso pelo número de células positivas/campo. Para a apresentação dos resultados como número de células positivas/mm², ou seja, o total de células/campo foi multiplicado pelo fator de correção previamente estabelecido no laboratório para o aumento utilizado.

III.7.b. Quantificação da expressão de α -actina e TGF- β

Na avaliação da expressão de α -actina e de TGF- β , utilizamos a técnica de contagem de pontos, ou seja, empregamos um microscópio com uma ocular com retículo de 100 pontos acoplado a um monitor de vídeo. Contamos os pontos que correspondiam à presença de células que expressavam α -actina. Analisamos 25 campos consecutivos sob um aumento de 200 X (Jepsen & Mortensen, 1979). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação à área total.

III.7.c. Quantificação da apoptose

As células apoptóticas foram quantificadas com aumento de 1000X. Foram analisados 50 campos e consideradas positivas as células com características apoptóticas, de coloração marrom.

Todas as etapas de quantificação foram realizadas por um observador que desconhecia os grupos dos animais estudados.

III.8. Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão.

Agrupamos os animais DC, SHPP e SHRP (controles) e comparamos com os animais NPP e NRP ou APP e ARP (NX), quanto à análise dos diversos parâmetros avaliados. Foram também agrupados os animais NX, quanto ao conteúdo de P na dieta e quanto à infusão de PTH para comparar a creatinina corrigida, a FI e EG. Estas comparações foram realizadas com o teste t de Student e correção de Welch, quando necessária.

A comparação entre os grupos foi feita por método de *one-way ANOVA* (pós-teste de Neuman-Keuls) ou de Kruskal-Wallis, quando necessário. Transformação logarítmica foi utilizada quando necessária para obter normalidade. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. Utilizamos o software Prism versão 4 (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA). Análise de correlação de Pearson foi feita para verificar quais parâmetros seriam introduzidos no modelo de regressão linear múltipla *stepwise*. Esta análise foi feita para determinar quais variáveis independentes influenciaram

significativamente as variáveis dependentes. Foi considerado significativo valor de $p < 0,15$ para manutenção de variáveis no modelo. Nessa etapa, utilizamos o software SYSTAT, versão 10 (SYSTAT Soft. Inc, Califórnia, USA).

IV. RESULTADOS

IV.1. Dados gerais dos animais do experimento 1

A tabela 1 resume os resultados do peso inicial e final, bem como da PAC no final do experimento. Ao término do estudo, o grupo NRP apresentou menor valor de peso apesar do protocolo de *pair-feeding*.

A PAC foi semelhante entre os grupos no início do experimento (dados não mostrados). Nos animais submetidos à NX os níveis de PAC foram mais elevados em relação aos controles, independentemente da concentração de fósforo na dieta ($139,6 \pm 1,31$ vs. $116,9 \pm 1,98$, $p < 0,0001$).

Tabela 1. Pesos iniciais e finais e pressão arterial caudal (PAC) (experimento 1)

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	PAC (mmHg)
NPP	$307,88 \pm 11,77$	$416,88 \pm 12,29^b$	$141,6 \pm 2,11^c$
NRP	$322,00 \pm 9,93$	$352,25 \pm 16,82$	$137,5 \pm 1,31^d$
DC	$337,80 \pm 6,25$	$377,60 \pm 13,19$	$124,3 \pm 3,95$
SHPP	$310,25 \pm 10,53$	$432,25 \pm 13,02^a$	$114,9 \pm 1,19$
SHRP	$307,4 \pm 14,61$	$397,88 \pm 8,82$	$109,6 \pm 1,12$

a= $p < 0,05$ vs NRP;DC

b= $p < 0,05$ vs NRP

c= $p < 0,05$ vs SHPP;SHRP

d= $p < 0,05$ vs SHRP

IV.2. Dados bioquímicos e hematócrito do experimento 1

A tabela 2 mostra os resultados da análise bioquímica e hematológica.

Nos grupos NX, o hematócrito (Htc) foi significativamente menor do que nos controles ($41,01 \pm 0,95$ vs $44,37 \pm 0,48$, $p < 0,01$). O grupo DC apresentou o nível de Htc maior do que do grupo NRP.

Os níveis séricos de cálcio foram significativamente menores nos grupos NX comparados aos controles ($3,59 \pm 0,32$ vs $4,75 \pm 0,08$, $p < 0,01$) bem como nos animais que receberam dieta rica em P ($3,55 \pm 0,31$ vs $4,80 \pm 0,14$, $p < 0,01$). O grupo NRP apresentou os menores níveis de Ca dentre todos.

Os níveis de fósforo sérico foram significativamente maiores no grupo NRP quando comparados aos demais. Os animais NX apresentaram níveis de fósforo maiores que os controles ($10,14 \pm 1,68$ vs $5,01 \pm 0,28$, $p < 0,01$).

A creatinina corrigida por 100g de peso foi maior nos animais do grupo NX do que nos controles ($0,22 \pm 0,03$ vs $0,10 \pm 0,01$, $p < 0,01$). No entanto, animais NX que receberam dieta pobre em fósforo e infusão normal de PTH, (NPP), apresentaram valores menores de creatinina quando comparados ao NRP. Os animais do grupo Sham que receberam dieta pobre em P (SHPP) apresentaram os menores valores de creatinina do que a do grupo SHRP quando analisamos apenas os controles (SHPP; SHRP e DC).

Os níveis de PTH dos animais sham submetidos à dieta pobre em P SHPP foram menores do que nos demais grupos.

Tabela 2. Resultados da análise hematológica e bioquímica (experimento 1)

	Htc (%)	Cai (mg/dL)	P (mg/dL)	Cr/100g (mg/dL.100g peso)	PTH (pg/mL)
NPP	42,9±1,1	4,75±0,20	5,58±0,47	0,13±0,010 ^d	114,9±30,1 ^d
NRP	39,1±1,3	2,44±0,21 ^b	14,70±2,43 ^b	0,32±0,053 ^c	86,8±20,3 ^d
DC	46,25±2,70 ^a	4,73±0,10	5,54±0,61	0,10±0,09	50,45±13,67 ^d
SHPP	42,9±0,5	4,86±0,20	4,42±0,39	0,07±0,003	10,52±2,88
SHRP	43,5±0,5	4,67±0,12	4,95±0,32	0,11±0,009 ^d	135,9±28,56 ^c

a=p<0.05 vs NRP

b=p<0.05 vs NPP;DC;SHRP;SHPP

c= p<0.05 vs DC; SHPP

d=p<0.05 vs SHPP

IV.3. Porcentagem de expansão intersticial, esclerose glomerular e apoptose no tecido renal no experimento 1

A porcentagem de FI no tecido renal foi maior nos grupos NX quando comparados aos controles (1,47±0,30 vs 0,70±0,08, p<0,05) . Os animais do grupo SHPP apresentaram menor porcentagem de FI dentre todos os grupos exceto SHRP. Quando analisamos os animais de acordo com o conteúdo de P na dieta, verificamos que aqueles que receberam dieta rica em P apresentavam percentual de fibrose mais elevado do que aqueles alimentados com dieta pobre em P (1,36±0,31 vs 0,65±0,09, p<0,05).

Na avaliação da esclerose glomerular detectamos um percentual mais elevado de EG nos animais que receberam dieta rica em fósforo quando comparados ao grupo controles (9,99±3,03 vs 0,73±0,23, p<0,01). Como era

de se esperar, a porcentagem de EG nos animais NX era maior que nos animais controles ($8,38 \pm 2,79$ vs $0,93 \pm 0,43$, $p < 0,05$). Vale ressaltar que os animais do grupo NRP apresentaram um percentual maior de esclerose do que os animais dos grupos NPP, DC, SHPP (tabela 3).

Nos NX animais alimentados com dieta pobre em fósforo (NPP) o número de células apoptóticas foi maior do que o observado naqueles que receberam dieta rica em fósforo (tabela 3).

Tabela 3. Resultados da análise histológica e apoptose renal (experimento 1)

Grupos	Fibrose (%)	Esclerose glomerular (%)	Apoptose (cel/mm ²)
NPP	$0,91 \pm 0,12^b$	$0,99 \pm 0,38$	$341,9 \pm 35,2^d$
NRP	$2,03 \pm 0,53^a$	$15,78 \pm 4,19^c$	$282,3 \pm 48,6$
DC	$0,99 \pm 0,15^b$	$0,44 \pm 0,29$	$301,2 \pm 45,2$
SHPP	$0,40 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,27$	$391,2 \pm 58,4$
SHRP	$0,68 \pm 0,10$	$2,28 \pm 1,51$	$359,8 \pm 49,5$

a= $p < 0,05$ vs SHRP; SHPP

b= $p < 0,05$ vs SHPP

c= $p < 0,05$ vs NPP; DC; SHPP

d= $p < 0,05$ vs NRP

Figura 2. Experimento 1: quantificação da análise histológica (A e B) e apoptose renal (C)

IV.4. Expressão ED-1, α -actina, angiotensina II e TGF- β no tecido renal no experimento 1

A expressão de ED-1 nos macrófagos do tecido renal dos animais que receberam dieta rica em P foi maior, porém sem significância estatística, do que a observada naqueles alimentados com dieta pobre em P ($34,78 \pm 10,07$ vs $18,54 \pm 6,9$, $p=0,20$). Somente nos grupos NRP é que observamos diferença significativa quando comparados aos grupos DC, SHPP e SHRP, bem como, menores valores no grupo SHPP em relação ao NPP, NRP e DC (tabela 4 e figura 3A). Os animais NX apresentaram aumento da expressão de ED-1 quando comparados aos controles ($45,09 \pm 9,79$ vs $10,54 \pm 1,45$, $p<0,01$).

Os animais dos grupos NPP, NRP e SHPP apresentaram maiores expressões de α -actina em relação ao grupo DC. Não detectamos influência da sobrecarga de fósforo, seja nos animais NX ou nos controles (tabela 4 e figura 3B). Porém nos animais NX a expressão de α -actina foi significativamente maior que nos controles ($5,21 \pm 0,48$ vs $2,35 \pm 0,38$, $p<0,0001$).

Quando analisamos a expressão de Angio II, pudemos observar que ela foi superior nos animais submetidos à dieta rica em P quando comparados aos seus pares porém sem significância estatística (tabela 4 e figura 3C), bem como diferenças entre os animais NX e controles. Os menores valores de Angio II foram encontrados no grupo DC (tabela 4, figura 3C).

Na tabela 4 e figura 3D demonstramos a expressão de TGF- β no tecido renal. Não encontramos diferenças entre os grupos.

Tabela 4. Expressão de ED-1, α -actina, angiotensina II e TGF- β (experimento 1)

Grupos	ED-1 (cel/mm ²)	α -actina (%)	Angiotensina II (cel/mm ²)	TGF- β (%)
NPP	31,03 $\pm$ 11,89 ^b	5,10 $\pm$ 0,80 ^c	3,87 $\pm$ 1,06 ^c	1,15 $\pm$ 0,29
NRP	59,15 $\pm$ 14,20 ^a	5,31 $\pm$ 0,58 ^c	4,42 $\pm$ 1,21 ^c	1,89 $\pm$ 0,50
DC	13,62 $\pm$ 2,04 ^b	0,15 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,33	1,40 $\pm$ 0,27
SHPP	6,05 $\pm$ 2,40	4,07 $\pm$ 0,25 ^c	2,47 $\pm$ 0,51 ^c	1,75 $\pm$ 0,47
SHRP	10,42 $\pm$ 2,62	3,09 $\pm$ 0,53	5,45 $\pm$ 0,71 ^c	2,52 $\pm$ 0,46

a=p<0,05 vs DC; SHPP; SHRP

b=p<0,05 vs SHPP

c= p<0,05 vs DC

Figura 3. Experimento 1: quantificação da análise imuno-histoquímica para ED-1 (A), α -actina (B), Angio II (C) e TGF- β (D).

IV.5. Análise univariada (experimento 1)

A tabela 5 demonstra os resultados das análises univariadas.

A creatinina corrigida correlacionou-se positivamente com a PAC, com o P, a FI, EG, expressão de ED-1 e de α -actina.

Quanto a FI, notamos que a mesma correlacionou-se positivamente com a PAC, P, EG e a expressão de ED-1. Analisando a esclerose glomerular observamos uma correlação positiva com o P, a FI e a expressão de ED-1.

A expressão de ED-1 correlacionou-se positivamente com a Cr/100g, a PAC, P, FI, EG e com a expressão de α -actina.

A expressão de Angio II correlacionou-se positivamente com a expressão de TGF- β .

A expressão de α -actina correlacionou-se positivamente com o Cr/100g, PAC e o ED-1.

Tabela 5. Resultados das análises univariadas (experimento1)

	Cr/100g	PAC	P	fibrose	esclerose	Angio II	ED-1	α -actina	TGF- β
Cr/100g	-	r= 0,45 p=0,0022	r= 0,89 p<0,0001	r= 0,83 p<0,0001	r= 0,79 p<0,0001	ns	r= 0,58 p=0,0004	r= 0,32 p=0,04	ns
Fibrose	r= 0,83 p<0,0001	r= 0,38 p=0,013	r= 0,79 p<0,0001	-	r= 0,53 p=0,0004	ns	r= 0,42 p=0,013	ns	ns
Esclerose	r= 0,79 p<0,0001	ns	r= 0,81 p<0,0001	r= 0,53 p=0,0004	-	ns	r= 0,60 p=0,0003	ns	ns
Apoptose	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ED-1	r= 0,58 p=0,0004	r= 0,50 p=0,003	r= 0,61 p=0,0001	r=0,42 p=0,013	r= 0,60 p=0,0003	ns	-	r= 0,36 p=0,037	ns
Angio II	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	r= 0,51 p=0,0006
α-actina	r= 0,32 p=0,040	r= 0,32 p=0,041	ns	ns	ns	ns	r=0,36 p=0,037	-	ns
TGF-β	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,51 p=0,0006	ns	ns	-

ns= não significativa

IV.6. Análise de regressão linear múltipla (experimento 1)

Na análise de regressão linear múltipla (tabela 6), observamos que Cr/100g foi dependente da PAC, EG, FI e do fósforo.

A FI e a EG foram dependentes do P.

A expressão de α -actina foi dependente do ED-1.

A expressão de ED-1 foi dependente do fósforo e da PAC, enquanto expressão de Angio II foi dependente somente do TGF- β .

Tabela 6. Resultados das análises de regressão múltipla (experimento 1)

	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Cr/100g</u>			
PAC	0,001	0,000; 0,002	0,027
Esclerose	0,004	0,002; 0,006	0,004
Fibrose	0,046	0,022; 0,070	0,001
Fósforo	0,007	0,001; 0,013	0,023
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Fibrose</u>			
Fósforo	0,142	0,108; 0,176	<0,0001
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Esclerose</u>			
Fósforo	1,291	0,985; 1,597	<0,0001
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>α-actina</u>			
ED-1	0,034	0,002; 0,066	0,038
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>ED-1</u>			
Fósforo	3,395	1,725; 5,065	0,000
PAC	0,708	0,218; 1,198	0,007
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Angio II</u>			
TGF- β	1,176	0,550; 1,802	0,001

IV.7. Dados gerais dos animais do experimento 2

A tabela 7 resume os pesos iniciais e finais bem com a PAC final dos animais. Ao término do estudo, o peso dos animais do grupo SHPP apresentou o maior valor, apesar do protocolo de *pair-feeding*. Os animais do grupo SHPP apresentaram peso superior aos dos grupos (APP, ARP, DC).

No início do experimento, a PAC foi semelhante entre os grupos (dados não apresentados); no entanto, ao término do estudo os níveis de PAC foram mais elevados nos animais NX quando analisados isoladamente (tabela 7) ou agrupados e comparados aos controles ($146,9 \pm 2,54$ vs $116,9 \pm 1,98$, $p < 0,0001$).

Tabela 7. Pesos iniciais e finais e Pressão arterial caudal (PAC) (experimento 2)

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	PAC (mmHg)
APP	307,44 $\pm$ 6,18	305,89 $\pm$ 7,26	149,6 $\pm$ 2,58 ^b
ARP	336,43 $\pm$ 8,45	340,14 $\pm$ 20,77	143,5 $\pm$ 4,69 ^c
DC	337,80 $\pm$ 6,25	377,60 $\pm$ 13,19	124,3 $\pm$ 3,95
SHPP	310,25 $\pm$ 10,53	432,25 $\pm$ 13,02 ^a	114,9 $\pm$ 1,19
SHRP	307,4 $\pm$ 14,61	397,88 $\pm$ 8,82	109,6 $\pm$ 1,12

a= $p < 0,05$ vs APP;ARP; DC

b= $p < 0,05$ vs DC;SHPP;SHRP

c= $p < 0,05$ vs SHRP

IV.8. Dados bioquímicos e hematócrito do experimento 2

A tabela 8 mostra os resultados da análise bioquímica e hematológica.

Nos animais dos grupos NX, o Htc foi significativamente menor que nos controles ($38,13 \pm 0,99$ vs $44,37 \pm 0,48$, $p < 0,0001$). O grupo DC apresentou Htc superior aos grupos NX (APP e ARP) como esperado e o grupo SHRP apresentou níveis de Htc superiores ao grupo ARP.

Os níveis séricos de cálcio foram significativamente menores nos animais ARP em relação aos grupos APP e SHPP (tabela 8). Os animais que receberam dieta rica em P apresentaram níveis de cálcio sérico inferiores aos controles ($3,69 \pm 0,32$ vs $5,33 \pm 0,20$, $p < 0,0001$).

Hiperfosfatemia foi diagnosticada no grupo ARP (tabela 8). Nos grupos NX quando comparados aos controles a hiperfosfatemia foi significativamente mais elevada ($8,52 \pm 1,21$ vs $5,02 \pm 0,28$, $p < 0,05$), o mesmo ocorrendo nos grupos submetidos à dieta rica em P quando comparados ao grupo dieta pobre em P ($8,70 \pm 1,26$ vs $4,75 \pm 0,32$, $p < 0,01$).

A Cr/100g foi maior nos animais do grupo NX do que no grupo controles ($0,32 \pm 0,03$ vs $0,10 \pm 0,01$, $p < 0,0001$). Quando agrupados quanto à dieta rica e pobre em P não encontramos diferenças entre os valores de creatinina. Individualmente os grupos ARP e APP apresentaram maiores valores de Cr/100g (tabela 8).

Os níveis de PTH dos animais do grupo SHPP foram menores do que os dos demais grupos e mais elevados nos grupos ARP e APP como esperado (tabela 8).

Tabela 8. Resultados da análise bioquímica e do hematócrito (experimento 2)

	Htc (%)	Cai (mg/dL)	P (mg/dL)	Cr/100g (mg/dL.100g peso)	PTH (pg/mL)
APP	39,39±4,61	5,76±0,26 ^b	5,04±0,50	0,34±0,045 ^d	249,64±45,25 ^d
ARP	36,69±2,33	2,58±0,36	12,99±1,46 ^c	0,29±0,06 ^e	380.0±66.68 ^d
DC	46,25±2,70 ^a	4,73±0,10	5,54±0,61	0,10±0,09	50,45±13,67 ^f
SHPP	42,9±0,5	4,86±0,20 ^b	4,42±0,39	0,07±0,003	10,52±2,88
SHRP	43,5±0,5 ^b	4,67±0,12	4,95±0,32	0,11±0,009	135,9±28,56 ^e

a=p<0,05 vs APP; ARP

b=p<0,05 vs ARP

c=p<0,05 vs APP; DC; SHPP; SHRP

d=p<0,05 vs DC; SHPP; SHRP

e= p<0,05 vs DC; SHPP

f=p<0,05 vs SHPP

IV.9. Porcentagem de expansão intersticial, esclerose glomerular e apoptose no tecido renal no experimento 2

Os animais do grupo SHPP apresentaram menor porcentagem de FI dentre todos os grupos já o grupo ARP apresentou a maior porcentagem de FI dentre todos os grupos (tabela 9).

Nos animais NX à FI foi mais elevada do que nos Sham (2,74±0,38 vs 0,70±0,08, p<0,0001) porém não observamos significância estatística quando agrupados em relação ao conteúdo de P na dieta (2,11±0,50 vs 1,23± 0,23, p= 0,13).

O grupo ARP apresentou maiores percentuais de EG do que o DC e SHPP (tabela 9). Quando agrupados o grupo NX apresentou maior EG do

que os controles ($12,28 \pm 3,21$ vs $0,93 \pm 0,43$, $p < 0,01$). Não houve diferença quando agrupamos em relação à dieta.

Os animais NX que receberam infusão elevada de PTH apresentaram um menor número de células apoptóticas quando comparados aos grupos controles ($185,3 \pm 22,8$ vs $362,0 \pm 33,7$, $p < 0,0001$).

Os grupos APP e ARP apresentaram menos apoptose do que os Sham (tabela 9).

Tabela 9. Resultados da análise histológica e apoptose renal (experimento 2)

Grupos	Fibrose (%)	Esclerose glomerular (%)	Apoptose (cel/mm ²)
APP	$1,97 \pm 0,23^b$	$8,28 \pm 2,80$	$270,4 \pm 55,8$
ARP	$3,74 \pm 0,66^a$	$17,42 \pm 6,15^d$	$233,5 \pm 37,0$
DC	$0,99 \pm 0,15^c$	$0,44 \pm 0,29$	$301,2 \pm 45,2$
SHPP	$0,40 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,27$	$391,2 \pm 58,4^e$
SHRP	$0,68 \pm 0,10^c$	$2,28 \pm 1,51$	$359,8 \pm 49,5^e$

a= $p < 0,05$ vs APP; DC; SHPP; SHRP

b= $p < 0,05$ vs DC; SHPP; SHRP

c= $p < 0,05$ vs SHPP

d= $p < 0,05$ vs DC; SHPP

e= $p < 0,05$ vs APP; ARP

Figura 4. Experimento 2: quantificação da análise histológica (A e B) e apoptose renal (C)

IV.10. Expressão ED-1, α -actina, angiotensina II e TGF- β no tecido renal no experimento 2

A expressão de ED-1 nos macrófagos do tecido renal dos animais dos grupos APP e ARP foi maior que nos DC, SHPP, SHRP (tabela 10 e figura 5A). Quando comparamos os animais NX com os controles notamos aumento da expressão de ED-1 ($27,03 \pm 2,83$ vs $10,54 \pm 1,45$, $p < 0,0001$).

Com relação à expressão da α -actina, o grupo DC apresentou os menores valores comparado aos demais grupos (tabela 10 e figura 5B). Os grupos NX apresentaram maiores expressões do que os controles ($3,51 \pm 0,29$ vs $2,35 \pm 0,38$, $p < 0,05$).

Os animais do grupo SHRP apresentaram a maior expressão de Angio II dentre todos os grupos (tabela 10 e figura 5C). Quando agrupados pudemos observar que ela foi superior nos animais submetidos à dieta rica em P quando comparados aos controles ($3,73 \pm 0,66$ vs $1,89 \pm 0,32$, $p < 0,05$).

A expressão de TGF- β não foi diferente entre os grupos (tabela 10 e figura 5D).

Tabela 10. Expressão de ED-1, α -actina, Angiotensina II e TGF- β (experimento 2)

Grupos	ED-1 (cel/mm ²)	α -actina (%)	Angiotensina II (cel/mm ²)	TGF- β (%)
APP	27,84 $\pm$ 4,00 ^a	3,64 $\pm$ 0,36 ^b	1,37 $\pm$ 0,33	1,61 $\pm$ 0,26
ARP	25,99 $\pm$ 4,26 ^a	3,35 $\pm$ 0,50 ^b	1,77 $\pm$ 0,54	1,69 $\pm$ 0,41
DC	13,62 $\pm$ 2,04	0,15 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,33	1,40 $\pm$ 0,27
SHPP	6,05 $\pm$ 2,40	4,07 $\pm$ 0,25 ^b	2,47 $\pm$ 0,51	1,75 $\pm$ 0,47
SHRP	10,42 $\pm$ 2,62	3,09 $\pm$ 0,53 ^b	5,45 $\pm$ 0,71 ^c	2,52 $\pm$ 0,46

a=p<0,05 vs DC; SHPP; SHRP

b=p<0,05 vs DC

c=p<0,05 vs APP; ARP; DC; SHPP

Figura 5. Experimento 2: quantificação da análise imuno-histoquímica para ED-1 (A), α -actina (B), Angio II (C) e TGF- β (D).

IV.11. Análise univariada (experimento 2)

A tabela 11 demonstra os resultados das análises univariadas.

A creatinina corrigida correlacionou-se positivamente com a PAC, e a esclerose glomerular.

Quanto à FI notamos que a mesma correlacionou-se positivamente com a creatinina, P, e PTH, enquanto a esclerose glomerular correlacionou-se positivamente com a Cr/100g, PAC e P.

A apoptose correlacionou-se inversamente com o ED-1 e a expressão de ED-1 correlacionou-se positivamente com a PAC e negativamente com a apoptose.

A expressão de Angio II correlacionou-se positivamente com o TGF- β e inversamente com a PAC.

A expressão de TGF- β correlacionou-se positivamente com o Angio II.

Tabela 11. Resultados das análises univariadas (experimento 2)

	Cr/100g	PAC	P	PTH	Esclerose	Apoptose	Angio II	ED-1	TGF-β
Cr/100g	-	r= 0,74 p<0,0001	ns	ns	r= 0,68 p<0,0001	ns	ns	ns	ns
Fibrose	r= 0,68 p<0,0001	ns	r= 0,78 p<0,0001	r= 0,68 p<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns
Esclerose	r= 0,68 p<0,0001	r= 0,47 p=0,0026	r= 0,78 p<0,0001	ns	-	ns	ns	ns	ns
Apoptose	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	r= -0,52 p=0,0009	ns
ED-1	ns	r= 0,67 p<0,0001	ns	ns	ns	r= -0,57 p<0,0001	ns	-	ns
Angio II	ns	r= -0,44 p=0,0035	ns	ns	ns	ns	-	ns	r= 0,33 p=0,040
α-actina	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TGF-β	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,32 p=0,0403	ns	-

ns= não significativa

IV.12. Análise de regressão linear múltipla (experimento 2)

Na análise de regressão linear múltipla (tabela 12), observamos que a pressão arterial caudal e a esclerose foram fatores determinantes para o aumento da creatinina corrigida.

A FI foi dependente da PAC e do P, assim como a EG.

A apoptose foi inversamente dependente do ED-1.

A expressão de ED-1 foi dependente da PAC e inversamente dependente da apoptose conforme descrito anteriormente.

A expressão de Angio II foi dependente do TGF- β e inversamente da PAC.

Tabela 12. Resultados das análises de regressão múltipla (experimento 2)

	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Cr/100g</u>			
PAC	0,004	0,002; 0,006	<0,0001
Esclerose	0,006	0,002; 0,010	<0,0001
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Fibrose</u>			
PAC	0,030	0,016; 0,044	<0,0001
Fósforo	0,255	0,189; 0,321	<0,0001
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Esclerose</u>			
PAC	0,152	0,030; 0,270	0,018
Fósforo	1,748	1,158; 2,338	<0,0001
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Apoptose</u>			
ED-1	-6,155	-9,53; -2,77	0,001
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>ED-1</u>			
Apoptose	-0,023	-0,047; 0,000	0,053
PAC	0,370	0,186; 0,554	0,000
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>Angio II</u>			
PAC	-0,050	-0,016; -0,084	0,005
TGF- β	0,549	0,001; 1,097	0,053
	<i>B</i>	<i>Intervalo de Confiança (95%)</i>	<i>p</i>
<u>TGF-β</u>			
Angio II	0,167	0,009; 0,325	0,040

IV.13. Análise dos resultados histológicos agrupados em relação à concentração de P na dieta e PTH

Esclerose Glomerular: Quando agrupamos os ratos em relação à dieta rica em P (experimentos 1 e 2), os ratos NX que receberam dieta rica em P apresentaram mais esclerose do que os que receberam dieta pobre em P ($16,54 \pm 3,51$ vs $4,85 \pm 1,71$, $p < 0,01$).

Quando comparados em relação à concentração de PTH, ou seja, PTH alto vs PTH fisiológico não observamos diferenças estatisticamente significativa ($12,28 \pm 3,22$ vs $8,39 \pm 2,79$, $p = 0,3683$).

Fibrose Intersticial: Quando agrupamos os ratos em relação à dieta rica em P (experimentos 1 e 2), os ratos NX que receberam dieta rica em P apresentaram mais fibrose do que os que receberam dieta pobre em P ($2,83 \pm 0,46$ vs $1,48 \pm 0,19$, $p < 0,05$).

Quando comparados em relação à concentração de PTH, ou seja, PTH alto vs PTH fisiológico não observamos diferença estatisticamente significativa ($2,75 \pm 0,38$ vs $1,48 \pm 0,30$, $p = 0,1859$).

Creatinina: Quando agrupamos os ratos em relação à dieta rica e pobre em P e concentrações alta e normal de PTH (experimentos 1 e 2), não observamos diferenças estatisticamente significativas em relação à Cr/100g nas duas análises ($0,31 \pm 0,04$ vs $0,24 \pm 0,03$, $p = 0,4410$; $0,32 \pm 0,04$ vs $0,23 \pm 0,04$, $p = 0,4936$, respectivamente).

V. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o papel da proteinúria e da hipertensão arterial, na progressão da doença renal, foram muito estudados. Na década de 80, trabalhos com ratos, submetidos à nefrectomia subtotal, serviram de base para avaliar o papel da agressão mecânica na progressão da DRC. Animais que recebiam esse procedimento, desenvolviam elevada taxa de filtração e aumento da pressão glomerular evoluindo com perda da função renal. Posteriormente observou-se que, quando esses animais eram submetidos à restrição protéica, a hipertensão glomerular diminuía retardando a insuficiência renal. Estavam lançadas as bases para a “teoria hemodinâmica” (54).

Nosso estudo avaliou o papel do P e do PTH, fatores de risco não tradicionais, na progressão da doença renal. Recentemente, demonstramos que animais submetidos à sobrecarga de P e infusão fisiológica de PTH, pioravam a função renal analisada unicamente pela creatinina (36). Nesse estudo, avaliamos através de análise morfométrica e de técnicas de imuno-histoquímica, os mecanismos que participaram das lesões renais desses animais.

Classicamente, a restrição de P na DRC é proposta para evitar o desenvolvimento de complicações como o hiperparatireoidismo secundário (55; 56). Porém, recentemente Block e cols. surpreenderam a comunidade nefrológica quando demonstraram que a hiperfosfatemia reduzia a sobrevida

de pacientes em diálise aumentando a mortalidade por causas cardiovasculares (32,33).

No passado, a participação do P na progressão da doença renal já foi estudada. Em 1978 Ibels e cols. utilizando modelos animais, sugeriam pela primeira vez essa possibilidade. Entretanto esses autores não controlaram a ingestão protéica o que mascarou o efeito do P(57). Posteriormente, Lumlertgul e cols constataram os benefícios da restrição de P, independentemente do conteúdo protéico da dieta, na progressão da DRC em animais (58).

Nos modelos de uremia é difícil avaliar isoladamente o papel do P e do PTH, uma vez que esses fatores encontram-se interligados. No nosso estudo, o aporte protéico foi semelhante e como fixamos a infusão de PTH, o papel do P pode ser analisado. Nos animais com infusão fisiológica de PTH observamos que o P influenciou diretamente o desenvolvimento de FI e EG, independentemente da PAC, já nos animais com infusão elevada do hormônio a PAC associou-se ao P para promover as lesões. Além disso, os animais NX alimentados com dieta pobre em P apresentaram porcentagens de FI e EG semelhantes aos controles demonstrando de forma contundente o efeito protetor P.

Não realizamos micro punção glomerular, portanto nada podemos concluir sobre a participação do P na piora da hemodinâmica renal desses animais.

Nossos resultados sugerem que a sobrecarga de fósforo favoreceu a ativação de fatores inflamatórios. A infiltração de macrófagos intersticiais e

glomerulares (avaliada pela expressão de ED-1 no tecido) esta presente em todos os tipos de agressões renais quer sejam agudas ou crônicas, tanto em modelos clínicos como experimentais (59). Essas células, inicialmente tentam proteger o tecido lesado, porém ativam diferentes mediadores inflamatórios que terminam por agredi-lo. Estudos experimentais de glomerulonefrites, nos quais os animais eram tratados com anticorpos anti-macrófago ou onde os macrófagos eram irradiados e portanto inativados, demonstraram diminuição das lesões renais. (60). No nosso estudo, a sobrecarga de fósforo favoreceu a expressão de ED-1, especialmente nos animais que receberam infusão fisiológica de PTH confirmando que também na sobrecarga de P, os macrófagos participaram da agressão ao tecido renal.

No processo de FI, várias proteínas da matriz extracelular estão envolvidas: colágeno, laminina e fibronectina. Apesar do epitélio tubular sintetizar estas proteínas, os miofibroblastos são os principais produtores dos componentes da matriz extracelular contribuindo para FI (61).

Avaliando a expressão de α -actina, outro marcador de FI, não encontramos uma associação direta entre sua expressão e a sobrecarga de fósforo. A expressão desse marcador costuma ser mais intensa nas fases mais avançadas da doença renal (62). No nosso modelo a insuficiência renal foi moderada, talvez essa seja a explicação para a falta de associação entre a sobrecarga de P e a expressão dessa proteína. Vale lembrar que encontramos uma correlação entre a α -actina e expressão de ED-1

(experimento 1) mostrando uma associação desses fatores inflamatórios no desenvolvimento da FI, já descrita na literatura (62;63).

O TGF- β é um fator importante no processo de fibrogênese. Através de mecanismos diretos e indiretos estimula a produção de matriz extracelular, e aumenta a proliferação de fibroblastos (64). Um fato interessante sobre esta proteína é sua relação com o SRAA. A Angiotensina II estimula a expressão de TGF- β no rim, por vários mecanismos além de aumentar a expressão de seus receptores(65). No nosso estudo encontramos uma correlação positiva entre a expressão de Angiotensina II e TGF- β , tanto nos animais que receberam infusão fisiológica, como elevada de PTH, independentemente da sobrecarga de fósforo, confirmando que, na uremia, essas proteínas se associam para promover fibrogênese. Um achado interessante é que os animais controles, dos dois experimentos, alimentados com dieta rica em fósforo apresentaram expressões de Angiotensina II e TGF- β mais elevadas que os demais grupos. Desconhecemos o significado biológico desse achado, mas, aparentemente mesmo nos animais normais, a sobrecarga de fósforo estimula processos inflamatórios no tecido renal.

A deposição tecidual de fosfato de cálcio, decorrente da hiperfosfatemia, poderia também explicar a piora da função renal nos animais que receberam sobrecarga de fósforo. Recentemente demonstrou-se, em células musculares lisas de vasos, (estudo *in vitro*) que a sobrecarga de fósforo induzia alterações fenotípicas para osteoblastos e conseqüente calcificação(30). No nosso estudo não avaliamos os depósitos de cálcio no

tecido renal, dessa forma nada podemos concluir sobre sua participação na progressão da DRC.

A morte celular poderia ser um outro mecanismo para a piora da função renal nos nossos animais. Sabe-se que o aumento do P intracelular leva a perda do potencial de membrana das mitocôndrias, o que pode ativar a morte celular. Além disso estudos em cultura de células “osteoblasto like” mostraram que a sobrecarga de fósforo induz apoptose(28). Não encontramos correlação entre a função renal e o número de células apoptóticas, o que provavelmente afasta a apoptose na piora da função renal no nosso modelo. Nossos resultados também não demonstraram que a sobrecarga de fósforo aumentou o número de células apoptóticas. Entretanto os animais que receberam infusão fisiológica de PTH e dieta pobre em fósforo apresentavam mais células apoptóticas. Recentemente Rojas e cols demonstraram em biopsias ósseas de pacientes transplantados que o número de células apoptóticas era maior nos pacientes com hipofosfatemia e que o PTH aumentava o número de osteoblastos e prevenia a apoptose (66). O papel do PTH inibindo a apoptose de células ósseas também foi demonstrado no estudo de Jilka e cols (67). Os animais NX que receberam infusão elevada de PTH, apresentaram um número menor de células apoptóticas que os controles, assim aparentemente o PTH preveniu a apoptose das células renais, como demonstrado por Rojas e cols em outro tecido (66).

O FGF-23 é uma fosfatona que participa da regulação do metabolismo do fósforo, através de sua ação fosfatúrica e diminuição da

produção de calcitriol. Estudo de Fliser e cols, demonstrou em pacientes com DRC leve ou moderada, que o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF-23) foi um preditor independente de progressão da doença renal, além disso durante o seguimento, os pacientes com P sérico mais elevado evoluíram mais rapidamente para perda de função renal (68). Gutierrez e cols. encontraram um aumento nos níveis de FGF23 em estágios precoces de DRC, mesmo antes das alterações do metabolismo do cálcio e fósforo (69).

Estudos envolvendo o gene *Klotho* sugerem sua participação na progressão da DRC. Tal gene é predominantemente expresso em túbulos renais e sua deleção, em modelo experimental, leva a uma síndrome que se assemelha ao envelhecimento humano, incluindo retardo no crescimento, infertilidade, calcificações ectópicas, arteriosclerose e osteoporose (70). Apesar dos animais com deleção do gene, não demonstraram alterações renais, seres humanos com DRC, apresentam diminuição de sua expressão no tecido renal (71).

Este gene participa da regulação do metabolismo do Ca e do P diminuindo a síntese de Vit D (72).

O FGF-23 é um fator regulado pelo gene *Klotho* (73). Uma hipótese a se considerar é que, a restrição de P aumentaria a expressão do *Klotho* que por sua vez diminuiria a produção de FGF-23 protegendo o tecido renal.

Uma das principais complicações da uremia é a hipertensão arterial. Nossos resultados revelaram que elevadas concentrações de PTH agravaram a hipertensão arterial dos nossos animais.

O PTH, além de ser vital na homeostase do Ca e do P atua em vários outros tecidos. No sistema cardiovascular aumenta o inotropismo cardíaco e atua na resistência vascular periférica, portanto participa da regulação da pressão arterial (42). Nos pacientes com hiperparatireoidismo primário e secundário, a secreção cronicamente elevada de PTH, mantém o cálcio intracelular aumentado, alterando a função de vasodilatação e a produção de substâncias vasoativas, especialmente a síntese de óxido nítrico, pelas células endoteliais, favorecendo a hipertensão arterial(74). Recentemente, nosso grupo, em estudo experimental com ratos, demonstrou a relação entre PTH e calcificação vascular (CV) mesmo na presença de baixa concentração de Ca sérico e P normal ou função renal preservada (75). Portanto, a participação destas calcificações na fisiopatologia da hipertensão arterial em modelos que utilizam elevadas concentrações de PTH deve ser considerada, pelo enrijecimento de vasos nestes estudos.

Estudos experimentais ou clínicos avaliando o papel do P e do PTH na hipertensão arterial e na uremia são escassos. Recentemente, Marchais e cols. demonstraram em pacientes com DRC em hemodiálise, uma associação entre o aumento do P e gravidade da hipertensão arterial (76), porém outros autores discutem se este efeito seria decorrente, diretamente da hiperfosfatemia ou indiretamente da ação do PTH (77).

Nossos resultados sugerem que enquanto a sobrecarga de fósforo atuou na progressão ativando principalmente vias inflamatórias, o excesso de PTH, agiu, piorando a hipertensão arterial. A hipertensão arterial, por si, também participou dos mecanismos inflamatórios. Sabe-se que a inflamação

favorece a hipertensão arterial e esta por sua vez retro alimenta a inflamação (78). Os resultados das análises de regressão linear múltipla dos dois experimentos facilitaram avaliar a forma de participação desses dois fatores na função renal dos nossos animais.

O P desempenha diversas funções fisiológicas e celulares vitais para o organismo. Entretanto algumas comorbidades tem sido descritas em indivíduos com P sérico normal. Narang e cols. demonstraram em pacientes com função renal normal e doença coronariana, que o P sérico no limite superior da normalidade aumentava o risco relativo de morte, de forma semelhante ao tabagismo (79). Recentemente, Tonelli e cols. também observaram uma associação entre normo fosfatemia e mortalidade por eventos cardiovasculares em indivíduos com função renal normal (80).

Nos últimos anos, a quantidade de fósforo na dieta de indivíduos de diferentes países tem aumentado progressivamente, cerca de 17% a cada década (81). Esse fato se deve principalmente ao uso de conservantes nos alimentos.

Em todo o mundo, 500 milhões de pessoas apresentam algum grau de disfunção renal. Dessa forma o conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da DRC é de suma importância, pois a partir deste, estratégias terapêuticas mais eficazes serão aplicadas na tentativa de retardar este processo deletério. Nosso estudo traz uma nova possibilidade de intervenção na progressão da DRC a partir do controle da sobrecarga de fósforo.

VI. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados sugerem que a sobrecarga de fósforo e o excesso de paratormônio participam da progressão da doença renal.

O fósforo ativa predominantemente as vias inflamatórias e o paratormônio a hipertensão arterial.

VII. REFERÊNCIAS

1. Schieppati A, Remuzzi G. Chronic renal diseases as a public health problem: Epidemiology, social and economic implications. *Kidney Int*. 2005; 98:S7-10.
2. US RENAL DATA SYSTEM: USRDS 2004 Annual report: Atlas of end stage renal disease in United States, Bethesda, MD, National Institute of Diabetes and Digestive and kidney diseases, 2003.
3. Foley RN, Parfrey PS, Sanark MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9: S16-S23.
4. Zatz R. Mecanismos de Progressão das Nefropatias Progressivas In. Cruz J, Praxedes JN e Cruz HMM. *Nefrologia*. 2º ed. São Paulo: Sarvier; 2000. p. 125-38.
5. Ritz E, Gross ML, Dikow R. Role of calcium-phosphorous disorders in the progression of renal failure. *Kidney Int* 2005; 68(99), S66-70.
6. Brenner BM. Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J Clin Invest* . 2002; 110:1753-58.
7. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease-are interventions possible? *Nephrol Dial Transplant* . 2002; 17:363-368.

-
-
8. Wolf G, Neilson EG. From converting enzyme inhibition to angiotensin II receptor blockade: New insights on angiotensin II receptors subtypes in the kidney. *Exp Nephrol* (suppl 1). 1996; 4:8-19.
 9. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Cellular responses to protein overload: Key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004; 13:31-7.
 10. Remuzzi A, Gagliardini E, Donadoni C. Effect of angiotensin II antagonism on the regression of kidney disease in rat. *Kidney Int*. 2002; 62:885-94.
 11. Aros C, Remuzzi G. The renin–angiotensin system in progression, remission and regression of chronic nephropathies. *J Hypertension* (suppl 3). 2002; 20:S45-S53.
 12. Ruster C, Wolf G. Renin-Angiotensin-Aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2985-91.
 13. Hostetter T. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney Int*. 2004; 66:1-9.
 14. Graciano ML, Cavaglieri RC, Dominguez WV, Noronha IL. Intrarenal renin-angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15:1805-15.

-
-
15. Ng YY, Fan JM, Mu W, Paterson DJN, Yang WC, Huang TP, Atkins RC, Lan HY. Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14:2860-72.
 16. Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int*. 1996; 49:666-78.
 17. Lavelle KJ, Durland BD, Yum MN. The effect of antimacrophage antiserum on immune complex glomerulonephritis. *J Lab Clin Med*. 1981; 98(2): 195-205.
 18. Strutz F, Muller GA, Neilson EG. Transdifferentiation: a new angle on renal fibrosis. *Exp Nephrol*. 1993; 1:102-11.
 19. Wolf G, Ritz E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int*. 2005; 67(3):799-812.
 20. Gomez-Garre D, Martin-Ventura JL, Granados R, Sancho T, Torres R, Ruano M, Garcia-Puig J, Egido J. Losartan improves resistance artery lesions and prevents CTGF and TGF-beta production in mild hypertensive patients. *Kidney Int*. 2006; 69(7):1237-44.
 21. Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor- β in kidney disease. *Am J Physiol* 266: F 829-F842, 1994.

-
-
- 22.** Coll E, Cormand B, Campos B, Gonzalez-Nunez D, Inigo P, Botey A, Poch E. Association of TGF-beta1 polymorphisms with chronic renal disease. *J Nephrol.* 2004;17(6):794-9.
- 23.** Power RE, Doyle BT, Higgins D, Brandy HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Mechanical deformation induced apoptosis in human proximal renal tubular epithelial cells is caspase dependent. *J Urol.* 2004; 171: 457-61.
- 24.** Zhang G, Oldroyd SD, Huang LH, Yang BH, Li Y, Ye R, El Nahas AM. Role of apoptosis and Bcl-2/Bax in development of tubulo interstitial fibrosis during experimental obstructive nephropathy. *Exp Nephrol.* 2001; 9:71-80.
- 25.** Sener G, Sakarcan A, Sehirli O, Eksioglu-Demiralp E, Sener E, Ercan F et al. Chronic renal failure-induced multiple-organ injury in rats is alleviated by the selective CysLT1 receptor antagonist montelukast. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007; 83(4):257-67.
- 26.** Daemem MA, Van't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs Clauss M TG, Vandenabeele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest.* 1999; 104: 541-9.
- 27.** Meleti Z, Shapiro M, Adams CS. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone.* 2000; 27:359-66.
- 28.** Fukumoto S. Nephrocalcinosis. *Clin Calcium.* 2004; 14(6):34-7.

-
-
- 29.**Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 2004; 66:2293-9.
- 30.**Cozzolino M, Dusso AS, Liapis H et al. The effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on kidney calcification in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2299-308.
- 31.**Gimenez LF, Solez K, Walker WG. Relation between renal calcium content and renal impairment in 246 human renal biopsies. *Kidney Int.* 1987; 31(1):93-9.
- 32.**Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium X Phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney Dis.* 1998; 31:601-17.
- 33.**Block GA. Mineral Metabolism, Mortality and Morbidity in Maintenance Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 2208-18.
- 34.**Marchais SJ, Metivier F, Guerin AP, London GM: Association of hyperphosphatemia with hemodynamic disturbances in end stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14:2178-83.
- 35.**London GM, Marchais SJ, Guerin AP et al. Arterial structure and function in end stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17:1713-24.

-
-
- 36.** Neves K, Graccioli F, Dos Reis LM, et al. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function and bone in rats with renal failure. *Kidney Int.* 2004; 66:2237-44.
- 37.** Alfrey A. The role of abnormal phosphorus metabolism in the progression of chronic kidney disease and metastatic calcification. *Kidney Int.* 2004; 90:S13-S17.
- 38.** Schmitt CP, Huber D, Mehls et al. Altered instantaneous and calcium modulated oscillatory PTH secretion patterns in patients with secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9: 1832-44.
- 39.** Andersson P, Ryberg E, Willenheimer R. Primary hyperparathyroidism and heart disease- a review. *European Heart Journal.* 2004; 25: 1776-87.
- 40.** Hanson AS, Linas SL. Parathyroid hormone/adenylate cyclase coupling in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1994; 23:468-75.
- 41.** Shan J, Pang PK, Lin HC et al. Cardiovascular effects of human parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; 23: 38-41.
- 42.** Isales CM, Sumpio B, Bollag RJ. Functional parathyroid hormone receptors are present in an umbilical vein endothelial cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279:654-62.

-
-
- 43.** Evenepoel P, Claes K, Kuypers D, Maes B, Vanrenterghem Y. Impact of parathyroidectomy on renal graft function, blood pressure and serum lipids in kidney transplant recipients: a single centre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20(8):1714-20.
- 44.** Ichikawa I, Humes HD, Dousa TP, Brenner BM. Influence of parathyroid hormone on glomerular ultrafiltration in the rat. *Am J Physiol*. 1978;. 234:F393- 401.
- 45.** Marchand GR. Effect of parathyroid hormone on the determinants of glomerular filtration in dogs. *Am J Physiol*. 1985; 248: F 482-486.
- 46.** Lee K, Brown D, Urena P et al. Localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor mRNA in kidney. *Am J Physiol*. 1996; 270:F186-191.
- 47.** Woltz M , Schmetterer L, Dorner G, Zelger G, Entlicher J, Kapiotis S, Eichler HG. Hemodynamic effects of parathyroid hormone-related peptide (1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(8):2548-51.
- 48.** Levin A, Bakris GL, Molitch M et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the Study to Evaluate Early Kidney Disease (SEEK). *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 35 A.
- 49.** Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal*. 2005; 289: F8-F28.

-
-
- 50.** Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med.* 2002; 8:174-179.
- 51.** Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of rennin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002; 110: 229-238.
- 52.** Hirata M, Makibayashi K, Katsumata K e cols.. 22-Oxacalcitriol prevents progressive glomerulosclerosis without adversely affecting calcium and phosphorus metabolism in subtotaly nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 2132-2137.
- 53.** Agarwal R, Acharya M, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, Williams L, Battle D. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005; 68(6):2823-8.
- 54.** Brenner BM: Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol.* 1985; 249:F324-37.
- 55.** Denda M, Finch J, Slatopolsky E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1996; 28(4):596-602.
- 56.** Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem.* 1998; 273(9):5253-9.

- 57.** Ibels LS, Alfrey AC, Haut L, Huffer WE: Preservation of function in experimental renal disease by dietary restriction of phosphate. *N Engl J Med.* 1978; 298:122-6.
- 58.** Lumlertgul D, Burke TJ, Gillum DM, Alfrey AC, Harris DC, Hammond WS, Schrier RW. Phosphate depletion arrests progression of chronic renal failure independent of protein intake. *Kidney Int.* 1986 Mar;29(3):658-66.
- 59.** Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Atkins RC. Macrophages in immune renal injury. In: Neilson EG, Couser WG, editors. *Immunologic renal diseases.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.575-92.
- 60.** Lavelle KJ, Durland BD, Yum MN. The effect of antimacrophage antiserum on immune complex glomerulonephritis. *J Lab Clin Med.* 1981; 98(2):195-205.
- 61.** Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ et al. Local macrophage and myofibroblasts proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13:1967-74.
- 62.** Ide M, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S, Takeya M. Immunohistochemical analysis of macrophages and myofibroblasts appearing in hepatic and renal fibrosis in dogs. *J Comp Pathol.* 2001; 124(1):60-9.

-
-
- 63.** Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122: 103-11.
- 64.** Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 2006; 70(11):1914-9.
- 65.** Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994; 93: 2431-37.
- 66.** Rojas E, Carlini RG, Clesca P, Arminio A, Suniaga O, De Elguezal K, Weisinger JR, Hruska KA, Bellorin-Font E. The pathogenesis of osteodystrophy after renal transplantation as detected by early alterations in bone remodeling. *Kidney Int.* 2003; 63(5):1915-23.
- 67.** Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC, 1999. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999; 104: 439-46.
- 68.** Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, Ritz E, Kronenberg F; Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) Predicts Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(9):2600-8.

-
-
- 69.** Gutierrez O, Isakowa T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Juppner H, Wolf M: Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 2205-15.
- 70.** Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 6. 1997; 390(6655):45-51.
- 71.** Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, Sugimura K, Kishimoto T, Kinoshita S, Kuroki T, Nabeshima Y. Severely reduced production of *klotho* in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280(4):1015-20.
- 72.** Negri AL. The *klotho* gene: a gene predominantly expressed in the kidney is a fundamental regulator of aging and calcium/phosphorus metabolism. *J Nephrol*. 2005; 18(6):654-8.
- 73.** Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliwer SA, Kuro-o M. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem*. 2007; 282(37):26687-95.

-
-
74. Jolma P, Kööbi P, Kalliovama J, Saha H, Fan M, Jokihaara J, Moilanen E, Tikkanen I, Pörsti I. Treatment of secondary hyperparathyroidism by high calcium diet is associated with enhanced resistance artery relation in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 2560-9.
75. Neves KR, Graciolli FG, Reis LM, Graciolli RG, Magalhães AO, Custódio MR, Batista DG, Jorgetti V, Moysés RMA. Vascular calcification: Contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int*. 2007; 71:1262-70.
76. Marchais SJ, Metivier F, Guerin AP, London G. Association of hyperphosphataemia with haemodynamic disturbances in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14(9):2178-83.
77. Miyamoto K, Tatsumi S, Morita K, Takeda E. Does parathyroid “see” phosphate? *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13:2727-9.
78. Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2(10):582-93.
79. Narang R, Ridout D, Nonis C, Kooner JS. Serum calcium, phosphorus and albumin levels in relation to the angiographic severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 1997; 60(1):73-9.
80. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*. 2005; 112(17):2627-33.

- 81.** Calvo MS. Dietary phosphorus, calcium metabolism, and bone. *J. Nutr.* 1993; 123:1627-33.