Luís Eduardo Becker

**Efeito do paricalcitol e do calcitriol
sobre a doença cardiovascular
em camundongos uninefrectomizados ApoE -/-**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo
2007

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Relação entre doença renal crônica e cardiovascular	1
1.2. Relação entre calcificações vasculares e doença cardiovascular	3
1.3. Distúrbios no metabolismo do cálcio e fósforo e tratamento com vitamina D na doença renal crônica	6
1.3.1. Fisiopatologia do hiperparatireoidismo secundário	6
1.3.2. Regulação da secreção do PTH pela concentração de Ca^{+2} o receptor cálcio-sensível (CaSR)	8
1.3.3. O papel da vitamina D_3 ativa na regulação do PTH e na hiperplasia da paratireóide	9
1.4. Efeitos do tratamento com calcitriol sobre o sistema cardiovascular	14
1.4.1. Efeitos do tratamento com calcitriol sobre o coração	14
1.4.2. Efeitos da calcitriol sobre os vasos	16
1.5. Análogos da Vit D - Paricalcitol	21
1.6. Modelo experimental de uninefrectomia (UNX) em animais ApoE knockout (ApoE -/-)	24
 2. OBJETIVOS	 28

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Animais.....	29
3.2. Dietas.....	30
3.3. Modelo experimental.....	31
3.3.1. Modelo de uninefrectomia (UNX) em camundongos ApoE -/-.....	31
3.3.2. Procedimento cirúrgico.....	32
3.3.3. Anestesia.....	33
3.3.4. Cuidados pós-operatórios.....	34
3.4. Tratamento farmacológico.....	34
3.5. Grupos experimentais.....	36
3.6. Pressão arterial.....	37
3.7. Gaiolas metabólicas.....	38
3.8. Eutanásia dos animais.....	38
3.9. Análise bioquímica.....	41
3.9.1. Análise bioquímica do soro.....	41
3.9.2. Albuminúria.....	41
3.10. Preparo do tecido.....	43
3.10.1. Preparo do tecido dos animais submetidos à perfusão com glutaraldeído.....	43
3.10.2. Preparo tecidual para os animais submetidos à perfusão com solução de NaCl a 0,9%.....	49
3.11. Análise morfológica.....	49
3.11.1. Análise morfológica do coração.....	49
3.11.2. Análise morfológica da aorta.....	54
3.12. Colorações histológicas.....	55
3.12.1. Histologia comum.....	55
3.12.2. Imuno-histoquímica.....	56
3.12.3. Análise das lâminas.....	60
3.13. Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR).....	61
3.13.1. Isolamento do RNA.....	62
3.13.2. Transcrição para DNA complementar.....	62
3.13.3. PCR semiquantitativo.....	62
3.14. Análise estatística.....	63

4. RESULTADOS	64
4.1. Dados biométricos	64
4.1.1. Evolução ponderal e pressão arterial	64
4.1.2. Massa cardíaca, massa do ventrículo esquerdo (VE) e relação com massa corporal	67
4.2. Análise bioquímica	68
4.2.1. Depuração de creatinina e albuminúria	68
4.2.2. Perfil lipídico	70
4.2.3. Cálcio e fósforo	72
4.3. Análise morfológica tecidual	73
4.3.1. Tecido cardíaco	73
4.3.2. Aorta	75
4.4. Colorações histológicas e imuno-histoquímica	80
4.4.1. Tecido cardíaco	80
4.4.2. Aorta	83
4.5. PCR	89
5. DISCUSSÃO	90
6. RESUMO	109
7. CONCLUSÕES	110
8. REFERÊNCIAS	111

RESUMO

Becker LE. *Efeito do Paricalcitol e do Calcitriol sobre a doença cardiovascular em camundongos uninefrectomizados ApoE -/-* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

O estudo investigou a influência do tratamento de 10 semanas com paricalcitol (0,1µg/kg 5x/semana) e calcitriol (0,03µg/kg 5x/semana) em modelo de aterosclerose espontânea utilizando camundongos ApoE -/- sham e uninefrectomizados (UNIX).

Resultados: a densidade capilar por comprimento no tecido cardíaco foi significativamente mais baixa nos animais UNIX Controle quando comparados aos shams, o que não ocorreu nos animais UNIX tratados com paricalcitol e calcitriol. Nas aortas, a relação parede/lúmen foi significativamente menor no grupo Sham Controle quando comparada à dos grupos UNIX Controle e UNIX Calcitriol, sendo que nesses últimos, foram evidenciadas calcificações vasculares acompanhadas por células positivas para Runx-2 (cbfa-1). Houve também uma menor expressão de TGFβ nas aortas dos animais do grupo UNIX Paricalcitol em relação aos grupos UNIX Controle e UNIX Calcitriol.

Conclusões: Ambos os tratamentos preveniram alterações na capilarização cardíaca induzidas pela UNIX. O tratamento com calcitriol na dose empregada induziu significativas calcificações vasculares, o que não ocorreu com o paricalcitol.

Descritores

1. Vitamina D/análogos & derivados
2. Calcitriol
3. Aterosclerose
4. Esclerose calcificante da média de Mönckeberg
5. Doenças cardiovasculares
6. Camundongos Knockout
7. Nefrectomia

SUMMARY

Becker LE. *Effect of Paricalcitol and Calcitriol on cardiovascular disease in uninephrectomized ApoE -/- mice* [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2007.

The study investigated the influence of a 10-week treatment with Paricalcitol (0.1µg/kg, 5x/week) or Calcitriol (0.03µg/kg, 5x/week) on cardiovascular disease in spontaneously atherosclerotic ApoE -/- mice submitted to uninephrectomy (UNX).

Results: capillary length density of the heart was significantly lower in UNX Control, but not in UNX Paricalcitol and UNX Calcitriol animals, when compared to shams. In the aortas, a significantly lower wall/lumen ratio was observed in the Sham Control group when compared to UNX Control and UNX Calcitriol groups. In the latter, vascular calcifications accompanied by a significant presence of Runx-2 (cbfa-1) positive cells was observed. TGFβ aorta expression was significantly higher in UNX Control and UNX Calcitriol groups when compared to UNX Paricalcitol.

Conclusions: Both treatments were able to prevent the reduction in heart capillarization induced by the UNX model. Treatment with Calcitriol at the employed dose and duration, though, induced significant vascular calcifications.

Descriptors

1. Vitamin D/analogues & derivatives
2. Calcitriol
3. Atherosclerosis
4. Mönckeberg medial calcific sclerosis
5. Cardiovascular diseases
6. Knockout mice
7. Nephrectomy

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE -/-	Apolipoproteína E “knockout”
APS	Persulfato de amônio
AR	Área de referência
CaSR	Receptor cálcio-sensível
Cbfa1	Fator de ligação nuclear, subunidade alfa-1
cDNA	DNA complementar
DTT	1,4-Ditiotreitol
ECL	Quimioluminescência aprimorada
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
EGTA	Dietil-enol-glicol(2-amino-etil-eter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligada à enzima
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
EVG	Elástica van Gieson
FELASA	Federação Européia de Ciência Animal Laboratorial
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GV-SOLAS	Sociedade Alemã de Zoologia Experimental
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEPES	4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-ácido etanossulfônico
IBF	Biotério Central da Universidade de Heidelberg
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
NF_κ B	Fator nuclear κ B
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular

RANKL	Ativador do receptor do ligante de NF _κ B
RNAse-free	Livre de ribonucleases
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa
Runx-2	ver Cbfa1
RXR	Receptor retinóico X
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de dodecilsulfato sódico/poliacrilamida
SNX	Nefrectomia subtotal (remoção de 5/6 do parênquima renal)
SPF	Livre de patógenos específicos
TBS	Solução salina tris-tamponada
TBS-T	TBS com <i>tween 20</i> (solução emulsificadora)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TGFβ	Fator transformante do crescimento beta
UNX	Uninefrectomia
VDR	Receptor para vitamina D
VDREs	Elementos de resposta à vitamina D
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL	Lipoproteína de baixíssima densidade

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida de pacientes em diálise encontra-se reduzida em três a seis vezes, quando comparada à de indivíduos saudáveis da mesma idade, segundo dados do registro norte-americano de 2006 (USRDS). Embora esta discrepância seja em parte explicada pela própria doença de base que levou à insuficiência renal crônica, a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e otimização da abordagem terapêutica durante toda a evolução da doença renal são os principais pontos a serem abordados, para uma melhoria da sobrevida do paciente portador de doença renal crônica. Nesse contexto, atenção especial deve ser dada à doença cardiovascular, cujo risco é diretamente proporcional à queda na taxa de filtração glomerular (Zoccali, 2006).

1.1. Relação entre doença renal crônica e cardiovascular

Eventos cardiovasculares constituem a principal causa de óbito em pacientes urêmicos (Levey et al., 1998). Os processos ateroscleróticos encontram-se acelerados nesses pacientes, sendo que a mortalidade cardiovascular em um paciente em diálise é da ordem de 10 a 20 vezes maior quando comparada à da população geral (Sarnak et al., 2002), o que classifica todo o paciente portador de doença renal crônica como de alto risco para tais eventos (Levey et al., 1998).

Pacientes portadores de doença renal crônica também possuem frequentemente outros fatores de risco cardiovasculares, tais como: idade avançada, hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia (Longenecker et al., 2002). Porém, estudos transversais com pacientes com doença renal crônica mostraram que a equação de Framingham (Anderson et al., 1991), a qual estratifica o risco cardiovascular através dos fatores de risco tradicionais, não prediz integralmente o risco cardiovascular dessa classe específica de pacientes (Sarnak et al., 2002; Longenecker et al., 2002). Estudos recentes revelam que somente a redução da taxa de filtração glomerular constitui fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (Go et al., 2004), sendo que estudos observacionais de longo prazo, analisando diferentes faixas etárias, concluem que o déficit de função renal constitui fator de risco independente para a ocorrência de eventos cardiovasculares e óbito de causa cardiovascular (Fried et al., 1998). O consenso destas observações pode ser observado no “Seventh Report of Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure” (VII JOINT), no qual encontra-se estabelecido que uma taxa de filtração glomerular inferior a 60ml/min constitui fator de risco maior para o desenvolvimento de doença cardiovascular (Levey et al., 2003).

No caso da prevenção secundária de eventos cardiovasculares, esta afirmação também é verdadeira, como revelado na análise de mais de 14.000 pacientes do estudo VALIANT (Anavekar et al., 2004). Neste estudo

foi estabelecida uma correlação linear entre déficit de função renal e recorrência de eventos cardiovasculares.

1.2. Relação entre calcificações vasculares e doença cardiovascular

Calcificações vasculares praticamente acompanham a história natural da doença renal crônica e podem ser observadas antes (Schwalger et al., 2006) e após o início da terapia de reposição renal (Goodman et al., 2000; Oh et al., 2002). Entre os principais riscos para o aparecimento de calcificações vasculares na doença renal crônica encontram-se idade avançada, presença de diabetes, tabagismo e distúrbios no metabolismo de cálcio e de fósforo. Embora classicamente descritas em pacientes em diálise (Parfitt et al., 1971), o papel das calcificações vasculares na patogênese da doença aterosclerótica ganhou importância somente nos últimos dez anos, especialmente após a comprovação de que níveis elevados de fósforo no soro implicam aumento não só da mortalidade geral, mas também da mortalidade cardiovascular destes pacientes (Ganesh et al., 2001). Estudos epidemiológicos desta época também correlacionaram a presença de calcificações vasculares com o aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular na doença renal crônica (Blacher et al., 2001; London et al., 2003; Moe et al., 2004).

A calcificação vascular é definida pela deposição de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) na parede arterial e pode ocorrer tanto nas camadas íntima como média das artérias. A calcificação da camada íntima é

fundamentalmente encontrada nas lesões ateroscleróticas, sendo associadas à inflamação com infiltração predominante de macrófagos (Jeziorska et al., 1998). A calcificação da camada média, classicamente descrita por Mönckeberg (1903), afeta principalmente a camada muscular e as fibras elásticas, o que prejudica as propriedades elásticas do vaso, com conseqüentes complicações hemodinâmicas (Lamawansa et al., 1996; Shanahan et al., 1999).

Acreditava-se anteriormente que a calcificação de partes moles e de vasos na uremia fosse de um processo passivo, que ocorreria depois de excedido o limite de solubilidade de cálcio e fósforo séricos. Mais tarde, porém, foi evidenciado que a deposição de hidroxapatita em células musculares lisas vasculares é sim dependente do nível de fósforo, mas este é ativamente transportado através do co-transportador Na-P (Ghiacelli et al., 2001). Neste estudo em cultura de células em meio rico em fosfato, as células musculares lisas apresentaram uma elevada expressão de osteocalcina e Runx-2 (cbfa1), que são marcadores fenotípicos de osteoblasto, denotando uma transdiferenciação celular. No Laboratório de Patologia Renal da Universidade de Heidelberg foi mostrado experimentalmente, em modelo de nefrectomia subtotal utilizando ratos Sprague Dawley, que níveis elevados de fósforo na dieta foram capazes de induzir a um aumento de espessura da parede aórtica e ao aumento de fibrose miocárdica (Amann K et al., 2003). Recentemente, Stubbs e cols. (2007) revelaram em modelo de camundongos com deficiência de FGF23

que a hiperfosfatemia exerceu papel primordial na gênese de calcificações vasculares nestes animais.

Embora seja reconhecido que níveis elevados de fósforo e elevado produto cálcio-fósforo sejam fatores que contribuem para a calcificação vascular, tal fenômeno também pode ser observado em pacientes com idade avançada e em diabéticos que apresentam níveis normais de fósforo sérico (Everhart 1988), assim como em pacientes em uso de dicumarínicos (Holden e Booth, 2007). Experimentalmente, em estudo conduzido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, também foi mostrado que níveis de fósforo elevados ou elevado produto cálcio e fósforo nem sempre são necessários para a formação de calcificações vasculares (Neves et al., 2007). Neste estudo, somente a infusão do PTH em doses elevadas foi capaz de produzir maciças calcificações vasculares na camada média arterial independente de disfunção renal e mesmo na presença de hipocalcemia e níveis normais de fósforo.

Embora os mecanismos responsáveis pela calcificação vascular ainda não estejam totalmente esclarecidos (Moe et al., 2004; Doherty et al., 2004), as evidências clínico-experimentais asseguram que tanto o hiperparatireoidismo secundário por si só como suas conseqüências exercem papel primordial na patogenia da doença cardiovascular no paciente portador de doença renal crônica.

1.3. Distúrbios no metabolismo do cálcio e fósforo e tratamento com vitamina D na doença renal crônica

1.3.1. Fisiopatologia do hiperparatireoidismo secundário

O hiperparatireoidismo secundário constitui a resposta fisiológica da paratireóide às alterações metabólicas induzidas pela insuficiência renal. Distúrbios frequentemente presentes na insuficiência renal crônica como hipocalcemia, níveis baixos de 1,25 dihidroxicolecalciferol (Vit D₃ ativa ou calcitriol) e hiperfosfatemia são os principais fatores que levam à hiperplasia da paratireóide (Druecke et al., 1995), que responde à demanda funcional através do aumento da síntese e secreção de paratormônio (PTH). Entre outras funções, o PTH também promove um aumento da atividade da enzima 1- α -hidroxilase, que converte a Vit D₃ (25-hidroxicolecalciferol) para a forma ativa (calcitriol). Além de corrigir a hipocalcemia, em situações fisiológicas o PTH induz a um balanço negativo de fósforo.

Na situação de insuficiência renal, porém, o PTH tem a ação limitada, já que a conversão da Vit D₃ para a forma ativa é fundamentalmente realizada nos rins e a excreção renal de fosfato também se encontra deficiente. A perpetuação das alterações metabólicas leva ao estímulo contínuo da paratireóide, que não somente aumenta a síntese e secreção de PTH, mas também conduz à hiperplasia da glândula (Parfitt et al., 2001). Foi revelado experimentalmente que os clones de células hiperplásicas são originários das células hipersecretores, as quais possuem concentração menor de receptores regulatórios, tais como o receptor cálcio-sensível (CaSR) e o receptor para Vit D (VDR) (Ritter et al., 2001), que serão

descritos posteriormente. Portanto, à medida que a hiperplasia ocorre, a produção de PTH pela glândula torna-se progressivamente autônoma (figura 1). Em humanos, este processo pode ocorrer em um estágio precoce da doença renal crônica, sendo já visto no estágio 2 e freqüentemente observado no estágio 3 (Fajtova et al., 1995; Martinez et al., 1997; Levin et al., 2007).

Assim como nos estudos experimentais, foi também evidenciado em humanos que a expressão de CaSR encontrava-se diminuída em aproximadamente 60% em glândulas paratireóides hiperplásicas em comparação com glândulas normais (Kifor et al., 1996), com uma redução mais acentuada na hiperplasia nodular (Gogusev et al., 1997). Yano e cols. (2000) mostraram que além do CaSR, o VDR encontra-se diminuído em paratireóides de pacientes com hiperparatireoidismo secundário. A figura 1 ilustra o processo de hiperplasia da paratireóide e a diminuição progressiva da expressão dos receptores inibitórios.

Figura 1. Hiperplasia progressiva da glândula paratireóide e os efeitos sobre o CaSR e VDR. Adaptado de Young et al., 2003.

Os tratamentos clássicos para o hiperparatireoidismo secundário visam corrigir a fisiopatologia da doença, baseando-se fundamentalmente na redução do aporte de fósforo através de restrição dietética, no uso de quelantes orais e na reposição de calcitriol. Na hipótese de falência terapêutica é realizada a paratireoidectomia cirúrgica (Coburn et al., 1994).

1.3.2. Regulação da secreção do PTH pela concentração de Ca^{+2} - o receptor cálcio-sensível (CaSR)

O cálcio iônico citoplasmático (Ca^{+2}) atua como segundo mensageiro e exerce papel primordial no controle de processos celulares, tais como secreção, motilidade, diferenciação, proliferação e morte celular. Alterações abruptas na concentração de Ca^{+2} intracelular ocorrem normalmente durante a ativação de células excitáveis, porém, no caso do Ca^{+2} extracelular, essa concentração é mantida em uma estreita faixa fisiológica, que varia de 1,1 a 1,3mmol/l. Os níveis séricos de Ca^{+2} são fundamentalmente controlados pelo calcitriol e pelo PTH. O PTH age fundamentalmente nos ossos, rins e indiretamente, através do calcitriol no intestino delgado para mobilizar Ca^{+2} para o meio extracelular. Em situações normais, a secreção do PTH é rapidamente inibida pelo aumento do Ca^{+2} extracelular, caracterizando uma relação recíproca (Brown, 1991).

Em estudos com células de paratireóide bovinas em cultura, Nemeth e Scapa (1986, 1987) observaram que meios de cultura com Ca^{+2} e outros cátions di- e trivalentes eram capazes de influenciar níveis intracelulares de Ca^{+2} , sugerindo a existência de um receptor de membrana celular sensível a

cátions extracelulares, possibilitando a essas células responder a pequenas variações de Ca^{+2} extracelular. Esse mecanismo sensível aos cátions foi posteriormente identificado como receptor cálcio-sensível (CaSR), que pertence à superfamília dos receptores com proteína G acoplada (Brown, 1999). O CaSR da paratireóide é capaz de detectar mínimas flutuações (1-2%) na concentração de Ca^{+2} e controla imediatamente a secreção de PTH, garantindo uma homeostase precisa da concentração extracelular de Ca^{+2} . Compostos que ativam o CaSR e inibem a secreção de PTH são definidos como calcemiméticos, pelo fato de imitarem ou potencializarem os efeitos do Ca^{+2} na função da paratireóide (Nemeth, 1996), sendo também utilizados no controle do hiperparatireoidismo secundário.

1.3.3. O papel da vitamina D₃ ativa na regulação do PTH e na hiperplasia da paratireóide

A Vit D₃ (1,25(OH)₂D₃) faz parte do grupo das vitaminas lipossolúveis, sendo um pró-hormônio que exerce papel primário na homeostase do cálcio. Ela é raramente obtida através da dieta, sendo fundamentalmente sintetizada no organismo a partir da conversão fotolítica do 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D₃, seguida de uma isomerização térmica formando Vit D₃. A Vit D₃ é ativada metabolicamente após dois processos de hidroxilação, o primeiro no carbono da posição 25, que ocorre primariamente no fígado através do citocromo CYP2R1, o segundo no carbono da posição 1, que ocorre nas células tubulares proximais renais através da enzima 25-hidroxivitamina D₃-1- α -hidroxilase (1- α -hidroxilase) (figura 2). A inativação genética da 1- α -hidroxilase ou do receptor para vitamina D (VDR) resulta em

hipocalcemia, hiperparatireoidismo e raquitismo (Li et al., 1997; Dardenne et al., 2001).

Figura 2. Vitamina D – síntese, ativação e catabolismo

A ação do calcitriol é dada através de um receptor de alta afinidade e especificidade, o VDR. Este é um membro da superfamília de receptores para hormônios esteroidais, que atua como um fator de transcrição dependente da ligação com o calcitriol (Brown et al., 1999) e sua presença já foi descrita em mais de 30 tecidos humanos distintos (Reichel et al, 1989). O VDR encontra-se ilustrado na figura 3, na qual estão esquematizadas as regiões de ligação com o receptor. O domínio de ligação com o calcitriol está localizado na porção carboxi-terminal, sendo 100 vezes mais específico para o calcitriol do que para a 25-hidroxi-Vit D₃. A ligação do anel A, que contém o grupo 1-α-hidroxila, é altamente específica para o receptor, induzindo uma

mudança na conformação tridimensional (“ligand-dependent activation function 2” – AF2) que torna o complexo calcitriol-VDR resistente à digestão proteolítica. Esta ligação possibilita aos outros sítios do calcitriol interagirem com os demais domínios, como o receptor retinóico X (RXR), responsável pela transativação (transcrição do DNA), que é dada no domínio de ligação com o DNA. Este domínio contém dois processos digitais de ligação com o DNA (caracterizados por conter zinco na composição), responsáveis pela interação do VDR com seqüências de DNA específicas promotoras de genes-alvo da Vit D, também conhecidas como elementos de resposta à vitamina D (VDREs) (Peleg & Posner, 2003; Dusso et al, 2005).

No caso da célula da paratireóide, a interação calcitriol-VDR provoca uma direta inibição do gene codificador do PTH, além de regular a resposta da glândula paratireóide à concentração de cálcio, através da indução da transcrição do gene codificador do CaSR (Brown AJ et al., 1996; Canaff e Hendy, 2002). A interação calcitriol-VDR também induz a um aumento da expressão de VDR no tecido da paratireóide, não somente por um aumento na transcrição gênica para o receptor, mas também por inibir-lhe a degradação (Wiese et al., 1992). Nesse contexto, a administração profilática de calcitriol inibe o decréscimo progressivo da expressão de VDR na célula da paratireóide, que normalmente ocorre durante a evolução da doença renal crônica.

Diversos fatores podem influenciar a ligação Vit D₃-receptor. Llach e Massry (1985) revelaram, em estudo com 4 pacientes em regime de restrição dietética de fósforo, que o excesso de fósforo intracelular prejudica

a conversão da Vit D para a forma ativa, prejudicando o controle do hiperparatireoidismo. Além do fósforo, toxinas urêmicas são capazes de prejudicar a interação calcitriol-VDR, como demonstrado experimentalmente por Hsu e cols. (1992, 1993) em modelo animal.

Figura 3. Domínios funcionais do receptor do VDR humano. Estão representados o domínio de ligação com o DNA (localização nuclear), a região de heterodimerização com o receptor retinóico X (RXR) e a região de transativação. Os locais indicados com "P" são os principais sítios de fosforilação. Adaptado de Dusso e cols., 2005.

O principal mecanismo compensatório para a manutenção dos níveis de cálcio em situação de carência de calcitriol é a hipersecreção de PTH. Takahashi e cols. (1978) mostraram que a infusão necessária de PTH para manutenção da homeostase do cálcio pode ser dez vezes maior em animais que receberam dieta carente em vitamina D, quando comparados aos do grupo com dieta normal. Outro estudo em ratos com dieta pobre em Vit D

mostrou um aumento significativo da expressão de RNAm para PTH nas células isoladas de paratireóide, em comparação às dos ratos controle (Naveh-Many e Silver 1990). Em modelo canino com dieta pobre em Vit D, foi mostrado que presença da Vit D é fundamental para a adequada regulação na concentração extracelular de cálcio, já que mesmo concentrações elevadas de PTH foram incapazes de regular adequadamente situações de hipocalcemia aguda (Hendy et al., 1989).

Diversos estudos foram conduzidos para avaliar a capacidade da suplementação de calcitriol em prevenir ou atenuar o hiperparatireoidismo secundário na doença renal crônica. Szabo e cols. (1989) mostraram que a administração de calcitriol foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hiperparatireoidismo em ratos urêmicos, caso fosse iniciado bem no início do desenvolvimento da doença, porém não apresentava eficácia adequada se a hiperplasia já se encontrava estabelecida. Em pacientes com doença renal crônica em fase inicial, foi também mostrado que pequenas doses de calcitriol oral foram capazes de controlar efetivamente o hiperparatireoidismo (Ritz et al., 1995). Em pacientes em diálise, foi revelado que a administração intravenosa de calcitriol foi capaz de reduzir os níveis de PTH (Slatopolsky et al., 1984) em pacientes com diagnóstico de hiperparatireoidismo secundário, porém outro estudo demonstrou que o uso do calcitriol pode não ser efetivo para controle a longo prazo da doença em até 30% dos casos (Malberti et al., 1999).

Em estudo realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em pacientes com hiperplasia documentada de paratireóide e

hiperparatireoidismo severo, mesmo a injeção local na paratireóide de calcitriol não foi efetiva para um controle adequado do hiperparatireoidismo secundário. Neste estudo foi também selecionado um grupo para injeção local de etanol, que também se mostrou ineficaz para o controle da doença avançada (de Barros Gueiros et al., 2004).

Os principais efeitos colaterais da terapia com calcitriol no controle do hiperparatireoidismo secundário envolvem o risco de hipercalcemia e hiperfosfatemia (Qualles et al., 1994). Nesse contexto, uma inibição mais seletiva da glândula paratireóide com um análogo do calcitriol constitui uma alternativa interessante para o controle dos níveis de PTH no hiperparatireoidismo secundário.

1.4. Efeitos do tratamento com calcitriol sobre o sistema cardiovascular

1.4.1. Efeitos do tratamento com calcitriol sobre o coração

A carência de Vit D está relacionada à patogênese da insuficiência cardíaca congestiva (ICC). No estudo de Zitterman e cols. (2003) avaliando 88 pacientes, 54 com diagnóstico de insuficiência cardíaca classe 2 ou superior pelos critérios da “New York Heart Association” e 34 pacientes sem cardiopatia, o grupo portador de ICC apresentava aumento considerável do peptídeo pró-peptídeo natriurético atrial e níveis reduzidos tanto de 25-hidroxivitamina D₃ como de calcitriol. A conclusão foi que existia uma relação inversa entre níveis de Vit D e a presença de ICC na população estudada.

Em um estudo prévio analisando pacientes com doença renal crônica já havia sido sugerida uma correlação inversa entre função ventricular esquerda e déficit de Vit D. Tal estudo avaliou pacientes com disfunção e hipertrofia ventricular esquerda, porém o tratamento de 6 semanas com 25-hidroxivitamina D₃ resultou em apenas uma discreta melhora na função ventricular (Mc Gonigle et al., 1984). Mais tarde, Park e cols. (1999) mostraram que o tratamento endovenoso de 15 semanas com calcitriol em pacientes em diálise com hiperparatireoidismo secundário e hipertrofia ventricular esquerda resultou em uma significativa redução da hipertrofia ventricular.

Os achados clínicos motivaram estudos experimentais *in vitro* e com animais, com o objetivo elucidar os mecanismos responsáveis por esta correlação inversa. Weisharr e Simpson (1987) descreveram uma série de experimentos em ratos investigando o papel do calcitriol sobre a função cardíaca, nos quais foi mostrado que a carência de nove semanas de Vit D provocou anormalidades na função miocárdica, com aumento significativo de CPK e aumento de contratilidade. Mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa mostrou em ratos, que a depleção de Vit D induziu à hipertrofia ventricular esquerda, à diminuição da área miofibrilar cardíaca com concomitante aumento da expressão de colágeno no tecido (Weisharr et al., 1990).

Já em estudos envolvendo cultura de células de miócitos jovens, isolados de ratos em idade neonatal, foi evidenciado que o tratamento com calcitriol inibiu a proliferação celular, fenômeno este acompanhado pela inibição dos antígenos de proliferação *c-Myc* e nuclear de proliferação

celular (PCNA). Em outro estudo, utilizando também cultura de miócitos, Wu e cols. (1996) revelaram que o calcitriol inibiu a hipertrofia miocítica induzida pela endotelina-1 (ET-1), sendo também observados paralelamente inibição da expressão de alfa-actina e do gene codificador do peptídeo natriurético atrial, ambos associados à hipertrofia miocárdica e à insuficiência cardíaca. Tal achado também foi descrito em estudo com animais deficientes de vias de sinalização da Vit D, como os VDR “knockout” ou CYP27B1 nos quais foi verificado um aumento de expressão do peptídeo natriurético atrial e renina, levando à hipertensão e à hipertrofia cardíaca (Wu-Wong et al., 2006).

Analizando em conjunto os achados clínicos e experimentais, corrobora-se a hipótese de que o calcitriol exerce efeito protetor sobre a estrutura e a função miocárdica.

1.4.2. Efeitos da calcitriol sobre os vasos

Calcificações vasculares

O papel do calcitriol na patogênese das calcificações vasculares ainda não está totalmente elucidado. Analisando 173 pacientes de alto e moderado risco para eventos cardiovasculares através de tomografia com emissão de feixe de elétrons, Watson e cols. (1997) estabeleceram uma correlação inversa entre os níveis séricos de calcitriol e calcificações coronarianas. Outro estudo observacional do mesmo grupo de pesquisa com a mesma metodologia avaliou 283 indivíduos assintomáticos de alto risco para doença coronariana divididos em dois grupos étnicos (brancos e negros), demonstrando a mesma correlação inversa entre níveis de calcitriol e

calcificações vasculares independentemente para cada grupo. Em ambos os estudos os pacientes apresentavam função renal normal.

Embora níveis fisiológicos mais elevados de calcitriol em pacientes com função renal normal pareçam exercer efeito protetor sobre as calcificações vasculares, a reposição de Calcitriol em pacientes com doença renal crônica está comprovadamente associada ao efeito inverso. Acentuadas calcificações vasculares são há muito tempo descritas como complicações do tratamento com calcitriol em pacientes urêmicos, mesmo em crianças (Fleckenstein, 1977; Milliner et al, 1990). Nenhum dos estudos clínicos, porém, foi capaz de isolar adequadamente o efeito do calcitriol sobre a calcificação, sendo esta sempre associada à hiperfosfatemia, ou a um elevado produto cálcio x fósforo (Wolisi and Moe, 2005). Especula-se, portanto, que o calcitriol possua uma curva de resposta bifásica sobre a calcificação vascular, com conseqüências deletérias tanto no excesso, como na falta do mesmo (Zittermann et al, 2007).

Em estudos experimentais com cultura de células foi mostrada uma curva de calcificação concentração-dependente na incubação de células musculares lisas vasculares bovinas com calcitriol (Jono et al., 1998). Vale ressaltar, porém, que concentrações de calcitriol de 10^{-7} ou 10^{-9} M utilizadas no estudo, acarretariam no soro um aumento da concentração de cálcio e de fósforo em uma situação *in vivo*. Analisando os efeitos do calcitriol em modelo de nefrectomia 5/6, Hirata e cols. (2003) evidenciaram exacerbadas calcificações vasculares na aorta resultantes do tratamento. As doses de Calcitriol empregadas no estudo foram elevadas (1,25 a 6,25µg/kg

3x/semana), o que levou inclusive à deterioração da função renal e alterações na arquitetura tubular no grupo de animais tratado com calcitriol. Recentemente Mizobuchi e cols. (2007) mostraram significativas calcificações vasculares em animais urêmicos submetidos ao tratamento com calcitriol mesmo em doses baixas (0,04µg/kg 3x/semana por 4 semanas), porém tal efeito não pôde ser isolado do aumento de produto cálcio x fósforo.

Outros efeitos do tratamento com calcitriol sobre os vasos

A parede vascular arterial é dotada de toda a maquinaria tecidual para responder a um estímulo com calcitriol. Merke e cols. (1987, 1989) documentaram a presença de VDR em células bovinas endoteliais e musculares lisas vasculares. Nestas últimas foi inclusive evidenciada a presença de 1-α-hidroxilase, que promovendo localmente a hidroxilação da 25-OH-Vit D₃ para o calcitriol. Este achado alerta para os potenciais riscos de uma toxicidade vascular do calcitriol, já que, assim como na paratireóide, a expressão do VDR em células vasculares aumenta conforme a concentração de calcitriol, como mostrado em estudo experimental avaliando a hipervitaminose D (Rajasree et al, 2002).

Mas o real papel do tratamento com calcitriol sobre as células musculares lisas vasculares é um assunto controverso. Em estudo experimental utilizando ratos submetidos à lesão arterial induzida por balão foi evidenciado uma significativa hiperplasia intimal das carótidas no grupo de animais tratados com calcitriol em relação aos sem tratamento

(Lamawansa et al., 1996). Foi demonstrado que o calcitriol interage com o sistema hormonal de células vasculares, aumentando a liberação de VEGF e a proliferação de células musculares lisas (Yamamoto et al., 2002, Cardus et al., 2006), o que é de potencial interesse na formação de neoangiogênese em placas. Além disso, foi também evidenciado em cultura de células um aumento da síntese de DNA e glicosaminoglicanas na incubação com calcitriol, o que seria de potencial interesse para a investigação de uma matriz na patogênese da calcificação vascular. Porém outro estudo, avaliando o perfil de expressão gênica de células musculares lisas coronarianas humanas em cultura utilizando “micro array”, foi revelada ação inibitória do tratamento com calcitriol e paricalcitol sobre a proliferação dessas células (Wu-Wong et al., 2005).

Outros resultados alimentam a controvérsia sobre a ação vascular do calcitriol. Em culturas de células foi evidenciado que a incubação com calcitriol leva a um aumento da produção do inibidor de calcificação de matriz *gla* (Farzaneh-Far et al., 2001) e de prostaciclina (Wakasugi et al., 1991). Além disso, foi demonstrado também que a Vit D modula a ação vascular de estrógenos vasoprotetores (Somjen et al., 2000, 2004), mas também sensibiliza a reatividade vascular à catecolaminas (Hatton et al., 1994). A figura 4 ilustra alguns dos efeitos da ativação dos VDR nos vasos.

Os resultados heterogêneos sobre a influência do calcitriol sobre os vasos não permitem traçar um mecanismo coerente da ação vascular do calcitriol.

É necessário considerar que mecanismos inflamatórios também exercem considerável papel na progressão da lesão aterosclerótica. Nesse contexto, o tratamento com calcitriol já foi descrito por exercer ação anti-inflamatória sobre células Th1 e Th2, em modelo de asma (Topilski et al., 2004). Em estudo experimental de transplante de aorta em ratos, o análogo da Vit D (MC1288) exacerbou significativamente a ação supressora exercida pelo tratamento com ciclosporina sobre a proliferação e ativação de células T, além de reduzir o espessamento intimal característico do processo de rejeição (Raisanen-Sokolowski et al., 1997). Tais efeitos, se investigados em modelo experimental de uremia, poderiam trazer perspectivas para uma melhor compreensão do processo de aterosclerose em doença renal crônica.

Figura 4. Efeitos vasculares da ativação do VDR. A ativação do VDR promove um “feedback” positivo na síntese de VDR, aumento da proliferação endotelial, mas apresenta ação fibrinolítica e modula a ação de estrógenos sobre o endotélio. A ação sobre a camada media não é totalmente elucidada, com resultados controversos em relação ao relaxamento vascular e à proliferação de células musculares lisas. Adaptado de Koleganova NW, Promotionsarbeit, Heidelberg, 2007.

Embora o tratamento com calcitriol esteja relacionado à calcificações vasculares e possivelmente à proliferação de células musculares nas artérias, a sobrevida da ativação sistêmica dos VDR exerce impacto positivo sobre a mortalidade geral e cardiovascular dos pacientes com doença renal crônica, independente dos níveis de cálcio e fósforo, ressaltando a importância do controle do hiperparatireoidismo secundário sobre a mortalidade (Wu-Wong et al., 2006).

1.5. Análogos da Vit D – Paricalcitol

Análogos da Vit D como o paricalcitol foram desenvolvidos no intuito de exercer efeito inibitório sobre a paratireóide, mas, ao mesmo tempo, não elevar acentuadamente os níveis de cálcio e fósforo dos pacientes quando empregado em doses terapêuticas (Drüeke TB, 2005).

O paricalcitol (19-nor-1,25(OH)₂D₂) apresenta modificações tanto na cadeia lateral como no anel A, quando comparado ao calcitriol. Embora nem todas as questões em relação às diferenças que essas alterações conferem na interação paricalcitol-VDR estejam esclarecidas, foi mostrado em cultura de células de câncer de mama que a afinidade de ligação paricalcitol-VDR é dez vezes menor que a ligação calcitriol-VDR, sendo a primeira bem mais suscetível à proteólise que a última (Issa et al., 2002), possivelmente por conta da ausência do carbono 19 no anel A (figura 5). Clinicamente, observa-se que a dose de paricalcitol empregada é de 3 a 4 vezes superior à de calcitriol (Peleg e Posner, 2003), possivelmente devido a esse efeito. O mesmo efeito foi observado com a homodimerização, que foi

significativamente mais baixa na ligação paricalcitol-VDR do que na ligação calcitriol-VDR. Por outro lado, a heterodimerização VDR-RXR foi significativamente mais ativa com a ligação paricalcitol-VDR do que com a calcitriol-VDR. Isso possivelmente deve-se à metilação do carbono 24, que confere ao paricalcitol uma seletividade de coativação (Issa et al, 2002).

Tal seletividade pôde ser observada experimentalmente, já que foi comprovado que o paricalcitol estimula o transporte intestinal de cálcio de maneira menos intensa que o calcitriol (Brown et al, 2002). Caso isso também seja aplicável em humanos, acarretaria em um balanço positivo de cálcio menos intenso e numa diminuição no risco de calcificações vasculares, já que o balanço positivo de cálcio constitui fator de risco para calcificações coronarianas. (Goodman et al., 2000). Entretanto, isso não excluiria um efeito adicional do calcitriol sobre a calcificação da camada íntima (aterosclerose) e média (esclerose de Mönckeberg) quando comparado ao paricalcitol.

Clinicamente, a seletividade da ativação do VDR pode ser comprovada através de uma maior potência inibitória sobre a glândula paratireóide, quando respeitada a proporção de dosagem de 3:1 a 4:1 em relação ao calcitriol. Em estudo prospectivo multicêntrico randomizado com 266 pacientes em diálise conduzido por Sprague e cols. (2003), o tratamento com paricalcitol resultou em uma queda significativamente mais rápida e persistente dos níveis de PTH além de promover menores níveis de cálcio e de produto cálcio x fósforo. Porém, não houve diferença significativa nos níveis de fósforo entre os grupos.

Estudos multicêntricos retrospectivos mostraram que o paricalcitol exerceu impacto positivo sobre a mortalidade de pacientes em diálise, possivelmente por conta de uma influência sobre proliferação celular, inflamação e aterosclerose (Dobrez et al., 2004; Teng et al., 2003). Análises retrospectivas, porém, não podem servir como prova definitiva para uma conclusão sobre ambos os tratamentos, como comentado por Druecke e McCarron, em editorial (2003). Um melhor entendimento da influência desses tratamentos na fisiopatologia da aterogênese pode trazer novas evidências para os potenciais efeitos benéficos do tratamento com paricalcitol sobre a aterosclerose.

Figura 5. Análogos da calcitriol. Em azul estão indicadas as modificações dos átomos de carbono na molécula. A metilação do carbono 24 na cadeia lateral do paricalcitol (seta vermelha) é responsável pela seletividade da ativação do VDR promovida pelo paricalcitol.

1.6. Modelo experimental de uninefrectomia (UNX) em animais ApoE *knockout* (ApoE -/-)

A apolipoproteína E (ApoE) é uma proteína anfipática que exerce papel primordial na estabilização, solubilização e no catabolismo de partículas lipoprotéicas ricas em triglicérides. A ApoE é constitutiva dos quilomícrons, mas também pode ser encontrada nas VLDL, IDL e HDL, ligando-se a um receptor específico presente nos hepatócitos e em células do tecido periférico. Esta ligação promove a remoção dos lipídios presentes nas moléculas de transporte, sendo que após esse processo, as lipoproteínas remanescentes são rapidamente removidas da circulação através de endocitose no hepatócito (Mahley RW, 1988). A ApoE é fundamentalmente sintetizada no fígado, mas também é produzida por células de origem hematopoiética, tais como macrófagos.

Foi também evidenciado que a ApoE afeta a formação de lesões ateroscleróticas por inibir a agregação plaquetária. O HDL-E, proteína formada a partir da ligação do HDL com a ApoE, interage com receptores de superfície plaquetária inibindo-lhes a agregação (Desai et al., 1989). Neste estudo experimental comparando os efeitos antiagregantes da HDL-E e HDL a uma concentração de 0,1mg/ml, a agregação plaquetária foi inibida em 26% sob o efeito de HDL-E em relação ao HDL (Desai et al., 1989).

Em humanos, o gene codificador da ApoE encontra-se no cromossomo 19, em um *cluster* com APOC1 e APOC2. Defeitos na síntese de ApoE resultam em disbetalipoproteinemia familiar, ou hiperlipoproteinemia tipo III, em que os níveis de triglicérides e de colesterol

plasmático encontram-se elevados, como consequência de um metabolismo inadequado de quilomícrons e VLDL.

Camundongos ApoE $-/-$ foram desenvolvidos por Piedrahita e cols. (1992) a partir da inativação em camundongos do locus responsável pela produção de apolipoproteína E. A manipulação genética foi realizada em células embrionárias de camundongos selvagens do tipo C57BL/6 através da técnica de *gene targeting*, que permite romper um gene ou introduzir alterações sutis na sequência de um gene via recombinação homóloga. Por conta da disfunção genética, esses animais apresentam elevadas taxas de colesterol total e frações e aterosclerose espontânea. Zhang e cols. (1992) demonstraram que os camundongos ApoE $-/-$ apresentam colesterol plasmático da ordem de 5x o normal quando comparados ao genótipo selvagem e desenvolvem lesões ateroscleróticas ricas em infiltrado celular nas aortas proximais com idade aproximada de 3 meses. Essas lesões espontâneas crescem, causando oclusão do óstio coronário e óbito aproximadamente aos 8 meses de idade. Camundongos Apo E $-/-$ são normotensos e desenvolvem as placas ateroscleróticas mesmo em dieta com conteúdo normal de colesterol.

Em estudos anteriores foi possível evidenciar que camundongos ApoE $-/-$ submetidos à uninefrectomia (UNX) apresentaram um acentuado crescimento das placas ateroscleróticas na aorta em relação aos controles, mesmo sem apresentarem um aumento significativo da creatinina sérica (Buzello et al., 2003). Um estudo em nosso laboratório com o modelo de nefrectomia 5/6 por ablação nesses camundongos apresentou uma taxa de

mortalidade pós-operatória de 70%, o que inviabiliza o modelo. Além disso, o modelo UNX afeta menos significativamente a pressão arterial do que a nefrectomia 5/6, o que melhor isola o efeito da disfunção renal. Além disso, como déficits de calcitriol são observados em estágios precoces da doença renal crônica como previamente citado, é plausível que os efeitos benéficos da ativação do VDR já possam ser observados neste modelo, contanto que se utilize de um longo período de tratamento.

Uma terapia efetiva para evitar as calcificações vasculares e o processo acelerado aterosclerose em pacientes com doença renal crônica não existe até o presente momento. Como estudos retrospectivos mostram que diferentes derivados de Vit D exercem influência diferente sobre a mortalidade cardiovascular em pacientes em diálise, é plausível investigar, através de modelo experimental utilizando animais, tais mecanismos fisiopatológicos e alternativas terapêuticas para esta população. O modelo de aterosclerose espontânea em camundongos ApoE ^{-/-} uninefrectomizados, recebendo dieta normofosfatêmica, constitui uma interessante alternativa para a investigação da aterosclerose e calcificações vasculares em vigência dos tratamentos com paricalcitol e calcitriol.

Figura 6. Camundongos ApoE^{-/-}, com 8 semanas de vida

2. OBJETIVOS

O presente estudo foi desenhado com o intuito de comparar o efeito de duas modalidades de tratamento (paricalcitol e calcitriol) para o hiperparatireoidismo secundário em um modelo de aterosclerose espontânea utilizando camundongos ApoE -/- uninefrectomizados. A ação dos tratamentos foi investigada no sistema cardiovascular, sendo focados o aparecimento de lesões ateroscleróticas e as alterações na arquitetura tecidual cardíaca e aórtica induzidas pelo modelo.

Para tanto, foram analisados parâmetros biométricos, metabólicos, amostras de tecidos cardíaco e aórtico sob o seguintes aspectos:

- evolução da massa corporal, relação entre massa cardíaca, massa do ventrículo esquerdo e massa corporal ao final do estudo
- análise bioquímica do soro (cálcio ionizado, fósforo, creatinina e perfil lipídico) e da urina (albumina e creatinina)
- análise estereológica da arquitetura tecidual cardíaca e índice de capilarização tecidual
- comparação dos efeitos sobre a remodelação da parede aórtica e sobre o surgimento de placas ateroscleróticas e calcificadas
- avaliação das placas calcificadas no âmbito da transdiferenciação celular osteoblástica concomitante à calcificação
- investigação da influência sobre as vias de acúmulo de matriz extracelular, incluindo TGF β , deposição de colágeno e fibronectina
- análise da expressão de endotelina (ET-1) e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)
- análise da expressão do receptor cálcio-sensível (CaSR) e do receptor para Vitamina D (VDR) em tecido cardíaco

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

No presente estudo foram utilizados 96 camundongos “knockout” para o gene codificador da apolipoproteína E (ApoE -/-), adquiridos na Charles River Laboratories, Bruxelas, Bélgica. Os animais foram entregues com a idade de 8 a 10 semanas e permaneceram em ambiente livre de patógenos específicos “specific pathogen free” (SPF) na Unidade 1 do biotério central da Universidade de Heidelberg “Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung” (IBF) durante todo o estudo. O período mínimo de adaptação no biotério antes da cirurgia foi de 2 semanas. Nas únicas ocasiões em que os animais foram transportados para fora do ambiente SPF (transporte ao centro cirúrgico e para a sala de perfusão), as gaiolas permaneceram cobertas com tampa especial de policarbonato com barreira de celulose, para evitar contato direto com o ambiente externo.

O controle do ambiente SPF, das condições de temperatura e umidade foi realizado respeitando as normas da Federação Europeia das Associações de Laboratórios de Experimentação Animal “Federation of European Laboratory Animal Science Association” (FELASA). Os padrões gerais para o ambiente de criação camundongos empregados foram:

- Gaiolas de policarbonato transparentes (Makrolon II®, Bayer, Leverkusen, Alemanha) com área de 360cm² para até 5 camundongos
- Temperatura de 22±2 °C

- Umidade relativa do ar $55\pm 5\%$
- Nível de ruído $<70\text{dB}$ para frequências inferiores a 200Hz
- Luminosidade sobre a gaiola inferior a 50 Lux , período de 12 horas/dia

O acesso de pessoal aos animais foi controlado pelo IBF, que autoriza o tratamento dos animais somente após certificação pela FELASA, categoria A no caso de tratadores e categoria B no caso de pesquisadores. A certificação é obtida mediante curso preparatório e prova, supervisionados pela FELASA.

Os controles bacteriológico e parasitológico foram realizados pelo laboratório de Microbiologia interno do IBF. O controle sorológico dos animais foi realizado por empresa terceirizada, a “Biodoc Biomedical Diagnosis” em Hannover, Alemanha.

3.2. Dietas

Os animais receberam dieta padrão *ad libitum* (modelo V1534-300, Sniff Spezialdiäten, Soest, Alemanha), normossódica ($0,16$ a $0,24\text{mg/kg}$ de sódio), normofosfatêmica ($0,7\%$ de fósforo) e tiveram livre acesso à água durante todo o estudo. A análise dos fatores nutricionais após o processo de autoclavagem da dieta (107°C por 30 min) foi realizada conforme rotina interna do IBF, sendo que a dieta oferecida aos animais respeitou os critérios da Sociedade Alemã de Zoologia Experimental “Gesellschaft für

Versuchstierkunde” (GV-SOLAS). Os principais parâmetros nutricionais da dieta padrão encontram-se exibidos na tabela 1.

Tabela 1. Tolerância máxima permitida de constituintes para dieta padrão conforme diretrizes da GV-SOLAS, resolução A-08-2001

Componente	Conteúdo percentual na dieta	Desvio percentual máximo permitido do valor desejado
Proteínas totais	10-20%	-10 a +15%
Gorduras totais	8-15%	-10 a +15%
Fibras totais	6-10%	-22,5 a +15%
Minerais	5-10%	-30 a +10%
P, Ca	1-6%	-15 a +22,5%
Na, K, Mg	0,7-5%	-15 a +22,5%
Cu, Co, Fe, Mn, Zn, F, S	abaixo de 5mg/kg	± 50%
Vitamina A	<4000-100000 UI/kg	± 25%
Vitaminas hidrossolúveis, K e E	25mg/kg	± 40%
Aminoácidos essenciais	Metionina, Lisina, Treonina	± 20% do total de aminoácidos

3.3. Modelo experimental

3.3.1. Modelo de uninefrectomia (UNX) em camundongos ApoE -/-

O modelo de aterosclerose espontânea utilizando camundongos ApoE -/- é um modelo já bem estabelecido de aterogênese. Por conta da disfunção genética, esses animais apresentam elevadas taxas de colesterol total e frações e aterosclerose espontânea (Zhang et al, 1992). O modelo UNX induz uma disfunção renal leve a moderada nesses animais, comparável à de um paciente com insuficiência renal nos estágios 2 a 3. Eventos secundários da insuficiência renal crônica em estágio avançado, tais como anemia e acidose metabólica geralmente não são observados. Em estudos

preliminares no Laboratório de Patologia Renal da Universidade de Heidelberg foi possível evidenciar que camundongos ApoE -/- submetidos à UNX apresentaram um acentuado crescimento das placas ateroscleróticas na aorta em relação aos controles, além de diminuição da densidade capilar por comprimento no tecido cardíaco, mesmo sem apresentarem um aumento significativo da creatinina sérica ou da pressão arterial (Buzello et al, 2003). Tais achados revelam que o modelo UNX em camundongos ApoE -/- representa uma boa alternativa para o estudo de intervenções terapêuticas destinadas à população portadora de doença renal crônica e aterosclerose, porém sem disfunção renal severa.

3.3.2. Procedimento Cirúrgico

A cirurgia realizada foi a nefrectomia unilateral direita, realizada através de incisão no flanco do animal. Após a tricotomia foi realizada uma incisão longitudinal na pele de aproximadamente 1,5 cm, com dissecção e hemostasia do subcutâneo e planos musculares até atingir-se a loja renal direita. Em seguida o rim foi cuidadosamente pinçado com pinça anatômica, sendo clampeados o hilo renal e o ureter com clamp apropriado (Moskito, Aesculap BH 104R). Foi realizada a dupla ligadura do hilo renal e ureter com fio de seda (Ethicon Mersilk® 4-0, Ethicon Germany, Norderstedt, Alemanha) com posterior secção dos mesmos, sendo, por último, retirado o rim.

Após a nefrectomia foi feita a revisão da hemostasia seguida da sutura da musculatura e do subcutâneo com fio absorvível de poliglactina 910 (Vicryl 5-0® Ethicon Germany, Norderstedt, Alemanha). Para a

aproximação da pele foram utilizados clamps metálicos de 7,5 x 1,75mm (Michel[®], Allgeier Instrumente, Frittlingen, Alemanha). Para o fechamento da pele de cada animal foram necessários 2 a 3 clamps, conforme o tamanho da incisão.

Após o fechamento os animais receberam pomada anti-séptica (Braunewidon[®], B. Braun Petzhold, Meslungen, Alemanha) sobre a incisão e Bepantol (Bepanthen[®], Bayer, Leverkusen, Alemanha) nos olhos de modo a evitar eventual ressecamento da córnea durante a anestesia geral. A cirurgia sham incluiu todos os passos da uninefrectomia, exceto pela retirada do rim.

3.3.3. Anestesia

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral, sendo a indução realizada com coquetel de ketamina/xilazina (Ketanest[®], Pfizer Germany, Karlsruhe, Alemanha / Ronpum[®], Bayer, Leverkusen, Alemanha) preparado no ato da anestesia e aplicado intraperitoneal na dose de 80mg/kg/3,0mg/kg. A manutenção foi realizada através de anestesia inalatória utilizando misturador de gases independentes (SurgiVet[®] modelo V701001, Waukesha, Wilmington, EUA) acoplado a um vaporizador (Fluovac[®], Harward Aparatus, Holliston, Massashussets, EUA). A mistura empregada foi de isoflurano (Isofluran[®], Baxter Germany, Unterschleissheim, Alemanha) em oxigênio, administrada com ar comprimido na proporção de 1:1, o que forneceu uma fração inspirada de oxigênio de aproximadamente 60% durante a cirurgia.

O acesso e uso dos medicamentos anestésicos e analgésicos utilizados no biotério foram protocolados e supervisionados pelo IBF, conforme padronização interna.

3.3.4. Cuidados pós-operatórios

Ainda sob anestesia, todos os animais receberam Buprenorfina intramuscular (Tengesic[®]; Schering-Plough Germany, Munique, Alemanha) diluída em solução fisiológica na dose de 0,05mg/kg. O período de pós-operatório foi de responsabilidade do pesquisador, sendo por ele julgada a necessidade de aquecimento das gaiolas, necessidade de revisão cirúrgica ou eutanásia. Na reavaliação pós-operatória, realizada antes de 24h de pós-operatório, a dose de Buprenorfina foi repetida em todos os animais exceto se contra-indicado pelo pesquisador. Nas avaliações subseqüentes, a dose de Buprenorfina pôde ser repetida mais duas vezes (após 48 e 72h da cirurgia), caso o animal ainda apresentasse sinais de dor. Os clamps metálicos utilizados para o fechamento da pele foram retirados em 10 dias após a cirurgia.

3.4. Tratamento farmacológico

Os animais receberam tratamento farmacológico a depender do grupo experimental. As medicações empregadas foram:

- 19-Nor-1alpha,25-dihidroxitamina D₂ (paricalcitol, lote nº 09110DP00, Abbott Laboratories Chicago Illinois, EUA) na dose de 0,1µg/kg, 5x/semana
- 1-alfa,25-dihidroxitamina D₃ (calcitriol, lote nº CT-034, Abbott Laboratories Chicago, Illinois, EUA) na dose de 0,03µg/kg, 5x/semana

Os fármacos foram obtidos através de acordo de colaboração científica com o laboratório fornecedor. O tratamento farmacológico foi iniciado 15 dias após a cirurgia e perdurou por 10 semanas.

As medicações foram fornecidas na forma de pó solúvel pelo fabricante, sendo necessária diluição em solução veículo, composta por 20% de etanol a 100%, 30% de 1,2 propilenoglicol (C₃H₈O₂) e 50% de água destilada. Todo o preparo da medicação foi realizado com material esterilizado em câmara de fluxo laminar.

Os cálculos das concentrações desejadas visaram atingir as doses programadas de 0,1µg/kg/dose de paricalcitol e de 0,03µg/kg/dose de calcitriol com 0,1ml de composto. Este volume está dentro das recomendações do IBF, sendo considerado ideal para a injeção intraperitoneal em camundongos, já que proporciona uma boa distribuição do fármaco no peritônio, sem promover distensão abdominal significativa, o que ocasionaria uma sensação dolorosa adicional.

As concentrações dos fármacos nas soluções foram estabelecidas baseando-se nas quantidades de pó solúvel fornecidas pelo fabricante e posteriormente confirmadas em espectrofotômetro (ND 1000®, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, EUA). Os dados para calibração do

espectrofotômetro foram fornecidos pelo fabricante das medicações, que forneceu o coeficiente de extinção molar de cada fármaco para 3 faixas distintas de comprimento de onda. Antes das medidas, o aparelho foi calibrado com a solução veículo, sendo esta considerada o valor zero. A concentração final dos fármacos foi determinada através da média aritmética dos valores obtidos para cada faixa de comprimento de onda no espectrofotômetro.

Após o estabelecimento das concentrações foi realizada nova filtragem da solução com filtro de 0,22 µm (OptiScale®, Millipore Germany, Schwalbach, Alemanha) antes do armazenamento. As seringas para injeção foram preparadas a cada 30 dias, permanecendo estocadas a -20 °C até o dia do uso.

3.5. Grupos experimentais

Para o estudo foram utilizados 96 animais divididos em 6 grupos. Pelo fato da perfusão do animal com glutaraldeído a 3% dificultar a realização posterior de técnicas de imuno-histoquímica e biologia molecular nos tecidos obtidos, o experimento foi realizado com grupos de 16 animais: em 8 animais de cada grupo foi realizada a perfusão com glutaraldeído, cujos tecidos foram destinados à análise morfológica, nos demais foi realizada a perfusão com NaCl 0,9%, cujo coração e aorta foram destinados aos estudos de imuno-histoquímica e biologia molecular. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Sham Controle: n=16 animais submetidos à uninefrectomia sham que receberam solução veículo intraperitoneal por 10 semanas
- Sham Paricalcitol: n=16 animais submetidos à uninefrectomia sham que receberam tratamento com paricalcitol intraperitoneal na dose de 0,1 µg/kg 5x/semana por 10 semanas
- Sham Calcitriol: n=16 animais submetidos à uninefrectomia sham que receberam tratamento com calcitriol intraperitoneal na dose de 0,03 µg/kg 5x/semana por 10 semanas
- UNIX Controle: n=16 animais submetidos à UNIX que receberam solução veículo intraperitoneal 10 semanas
- UNIX Paricalcitol: n=16 animais submetidos à UNIX que receberam tratamento com paricalcitol intraperitoneal na dose de 0,1 µg/kg 5x/semana por 10 semanas
- UNIX Calcitriol: n=16 animais submetidos à cirurgia UNIX que receberam tratamento com calcitriol intraperitoneal na dose de 0,03 µg/kg 5x/semana por 10 semanas

3.6. Pressão arterial

A pressão arterial foi aferida através do método de pletismografia de cauda, realizado na semana final do experimento, 24 a 48 horas antes da colocação dos animais nas gaiolas metabólicas. O aparelho utilizado foi o “BP Measuring System” 9102-1-NI (TSE Systems GmBH, Bad Homburg, Alemanha), com kit específico de manguito e sensor para camundongo do fabricante. A pressão máxima do manguito foi regulada para 210mmHg, suficiente para a aferição da PA sistólica em todos os animais do estudo.

As gaiolas permaneceram aquecidas em cama térmica antes do procedimento, de modo a promover a vasodilatação necessária para detecção do pulso caudal pelo sensor. A sala para aferição da PA é isolada e o ambiente permaneceu silencioso durante as aferições.

Os dados de pressão do manguito e de detecção de onda de pulso pelo sensor foram impressos em papel milimetrado, sendo a interpretação realizada após a obtenção de uma curva satisfatória, com clara definição do início da onda de pulso (valor da pressão arterial sistólica).

3.7. Gaiolas metabólicas

Dois dias antes do término do experimento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais específicas para camundongos (Techniplast, Buguggiate, Itália) por 24h para a coleta de urina. Os animais permaneceram com livre acesso à dieta e à água. A urina foi posteriormente utilizada para aferição de albuminúria e clearance de creatinina.

3.8. Eutanásia dos animais

Após o período de tratamento, os animais foram transportados à sala de procedimentos do Departamento de Patologia da Universidade de Heidelberg para a perfusão. Os animais foram anestesiados através de

injeção intraperitoneal do coquetel ketamina/xilazina utilizado para indução anestésica, administrado na dose letal de 120mg/kg/16mg/kg.

Com os animais anestesiados foi realizada a cateterização do ventrículo esquerdo com “butterfly” 19G (Abbott, Sligo, Irlanda) e a coleta de sangue através da punção da veia cava inferior. Imediatamente após a coleta sangüínea foi iniciada a perfusão através do cateter inserido no ventrículo esquerdo, inicialmente com solução de cloridrato de procaína (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,1% em soro fisiológico em temperatura ambiente, a uma pressão de 110mmHg, por 5 minutos. Em seguida, foi realizada uma infusão de 12 minutos sob mesma pressão, porém a solução infundida foi escolhida conforme o destino do material estudado: glutaraldeído a 3% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão fosfato a 0,2mol/l para o material destinado à morfometria, ou NaCl 0,9% a 4°C para o material destinado a imuno-histoquímica e biologia molecular. Por último, a eutanásia foi realizada através da retirada do coração, utilizado na pesquisa. Para a realização de colorações histológicas foram utilizados materiais de ambas as perfusões. O procedimento de perfusão encontra-se esquematizado na figura 7.

As carcaças foram colocadas em sacos apropriados para descarte de material biológico e novamente transportadas ao IBF, onde permaneceram congeladas em freezer -20°C até a data da incineração.

Figura 7. Fluxograma representando protocolo de perfusão durante a eutanásia dos animais

3.9. Análise bioquímica

3.9.1. Análise bioquímica do soro

O sangue coletado foi imediatamente analisado em ionômetro íon-seletivo (Fresenius EH-F®, Bad Homburg, Alemanha) para a determinação do cálcio ionizado. O ionômetro foi regulado para amostras de tamanho reduzido, diante da pequena quantidade de sangue obtido, o que confere uma exatidão dos resultados de 90% em relação ao padrão conforme dados fornecidos pelo fabricante. A análise do material foi iniciada em tempo máximo de 30 segundos após a coleta do sangue, respeitando as orientações do fabricante em relação ao Ph, heparinização da amostra, calibração e desproteinização do aparelho. O material restante foi centrifugado e encaminhado ao Laboratório de Central de Rohrbach (Laborlimbach, Heidelberg, Alemanha) para análise de Fósforo, Uréia, Creatinina, Colesterol total e frações por método colorimétrico.

3.9.2. Albuminúria

A albuminúria foi aferida no próprio laboratório de Patologia Renal, através método de “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (ELISA) quantitativo, com kit específico para camundongo (“Mouse Albumin Elisa Quantitation Kit®”, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, EUA). Cada placa de ELISA (Nunc, Wiesbaden, Alemanha) possui 96 poços, o que possibilita a análise de 38 amostras de urina, já que as análises foram

realizadas em duplicata e 10 análises foram destinadas à curva padrão. As amostras de urina analisadas foram previamente centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos em centrífuga (Amicon Bioseparations, Mannheim, Alemanha), sendo desprezado o sedimento.

As placas de ELISA foram inicialmente incubadas por solução contendo o anticorpo de captura (Capture Antibody A90-134A, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, EUA) na concentração de 1:100 em tampão bicarbonato 0,05mol, pH 9,6, por 60 minutos a 37°C. Após o primeiro passo, as placas foram incubadas em solução de bloqueio (Tris 50mM, NaCl 0,14M, albumina bovina 1%, pH 8,0) por 30 min. Entre cada passo do procedimento, os poços foram aspirados e lavados com solução de lavagem (Tris 50mM, NaCl 0,14M, Tween20 0,05%, pH 8,0).

Em seguida, foram realizadas as diluições das amostras de urina em solução diluente (Tris 50mM, NaCl 0,14M, albumina bovina 1%, Tween 20 0,05%, pH 8,0) na proporção de 1:250. As soluções controle para elaboração da curva de análise foram preparadas com albumina de camundongo (Calibrator RS10-101-5, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, EUA) em solução diluente, em concentrações que variaram de 500 a 7,8ng/ml. Foram preparadas oito soluções para o estabelecimento da curva. Todas as amostras diluídas foram incubadas nas placas por 60 min a 37°C, sendo destinados dois poços para cada amostra.

A detecção foi realizada com anticorpo conjugado (A90-134P, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, EUA) a 1:10000 em solução diluente, incubado na placa por 60 minutos a 37°C, seguido de reação enzimática

com 3,3',5,5'-tetrametihbenzidina em água oxigenada (TMB/H₂O₂ 50-76-00, Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, Maryland, EUA) em temperatura ambiente. Após 5 minutos de reação a placa foi analisada em leitor de absorbância ótica (Dinex MRXII[®], Dinex Technologies, West Sussex, Reino Unido) calibrado para comprimento de onda de 450nm. Os valores foram exportados ao computador acoplado ao leitor e analisados através de software (Revelation 3.2[®], Dinex Technologies, West Sussex, Reino Unido), que traçou a curva padrão de concentração de albumina a partir das soluções controle e calculou o resultado das amostras conforme a média aritmética dos dois valores encontrados para cada poço.

3.10. Preparo do tecido

O preparo tecidual foi realizado de acordo com as normas protocolares da divisão de Patologia Renal do Departamento de Patologia da Universidade de Heidelberg. Em cada animal foi realizada a retirada de amostras de fígado, mesentério, músculo psoas, rim, coração e aorta torácica, sendo realizadas as pesagens do coração e do rim.

3.10.1. Preparo do tecido dos animais submetidos à perfusão com glutaraldeído

Para os animais submetidos à perfusão com glutaraldeído, o material retirado permaneceu incubado durante 48h em solução de

glutaraldeído a 3% em tampão fosfato a 0,2mol/l antes de ser encaminhado para a fixação.

Preparo do tecido cardíaco

Após o período de incubação em solução de glutaraldeído, o coração foi retirado e o ventrículo esquerdo separado e pesado.

Em tecidos isotrópicos tais como fígado, pulmão e baço, os parâmetros estereológicos podem ser avaliados independentemente do ângulo de corte, sem dificuldades. O tecido cardíaco, contudo, apresenta uma estrutura parcialmente anisotrópica, sendo que capilares, vasos sangüíneos e outras estruturas encontram-se distribuídas de diferentes maneiras a depender do ângulo de corte tecidual (Delesse MA, 1847). A densidade capilar por comprimento assim como os volumes relativos de cada componente do tecido cardíaco também são influenciados por esse fenômeno, sendo, portanto, necessária a randomização do corte tecidual como maneira de uniformizar as amostras. Este procedimento torna a análise estereológica de uma estrutura parcialmente anisotrópica semelhante à de uma estrutura isotrópica, sendo denominada a estrutura assim cortada isotrópica por randomização (Mattfeld et al, 1990).

As amostras de tecido cardíaco foram preparadas de acordo com o método de Mattfeld, no qual o ventrículo esquerdo foi seccionado longitudinalmente a partir do ponto médio do septo em 2 metades, as quais foram seccionadas transversalmente em cortes de idêntica espessura a

partir de um ponto aleatório de partida. As amostras permaneceram úmidas em solução de glutaraldeído a 3% durante todo o processo de preparo.

Três cortes de ventrículo esquerdo foram escolhidos aleatoriamente e embebidos em meio Agar, sendo posicionados aleatoriamente conforme demonstrado na figura 8. Em seguida, o cilindro de Agar foi posicionado no círculo polar de coordenadas (figura 9), sendo que o primeiro plano de corte foi escolhido de maneira aleatória e três fragmentos de tamanho semelhante foram separados com dois cortes perpendiculares.

Foram obtidos três fragmentos de cada corte de ventrículo esquerdo, totalizando nove fragmentos. Oito desses foram utilizados para fixação em Epon-Araldite, o último permaneceu em solução de glutaraldeído a 3% com as demais amostras teciduais obtidas na perfusão.

**Primeiro grau de liberdade
(posicionamento)**

**Terceiro grau de liberdade
(ângulo de corte)**

Figura 8. Cilindro de Agar com amostra. Demonstração dos graus de liberdade (1º- posicionamento aleatório da amostra tecidual no agar; 2º- rolamento aleatório do cilindro de Agar; 3º escolha aleatória do ângulo de secção)

Figura 9. Círculo de coordenadas

Para a fixação, os fragmentos foram lavados em de sacarose a 7,5% (Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha) em tampão fosfato 0,2 mol/l e subsequentemente incubados em solução de tetraóxido de ósmio a 1% (Serva, Heidelberg, Alemanha) em tampão fosfato 0,2 mol/l por 60 minutos. Em seguida, os fragmentos foram novamente lavados na solução de sacarose a 7,5% e desidratados através de banhos em etanol em concentrações crescentes (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 3×99.9%) e em óxido de propileno (Serva, Heidelberg, Alemanha), sendo, por último, fixados em resina de Epon-Araldite. A mistura da resina é composta de 25 ml 1,2,3-propanotriol-glicidil-éter (glycid ether 100, Serva,

Heidelberg, Alemanha), 15 ml de Araldite CY 212[®] (Serva, Heidelberg, Alemanha), 55 ml de ácido 2-dodecenilsuccínico (Serva, Heidelberg, Alemanha), 4 ml de ácido fatálico dibutil-éster (Serva, Heidelberg, Alemanha), e 2,5 ml de 2,4,6-Tris(dimetil-amino-metil)fenol (DMP 30[®], Serva, Heidelberg, Alemanha). A polimerização do composto foi realizada por 24 horas a 60°C.

Os blocos resultantes de Epon-Araldite foram encaminhados para cortes ultrafinos de 0,8µm, realizados em micrótomo específico (Ultracut E[®], Reichert-Jung, Nussloch, Alemanha) e corados com azul de toluidina.

Preparo da aorta

Após a incubação por 48h em solução de glutaraldeído a 3%, a aorta foi seccionada transversalmente em sua porção torácica, em topografia de transição do arco aórtico para a aorta descendente. Foram obtidos 2 fragmentos transversais de cada animal, o primeiro de 1 mm de espessura, para fixação em Epon-Araldite, o segundo de 3 mm, para fixação em parafina. O material restante permaneceu conservado na solução de glutaraldeído. O local de secção da aorta está exposto na figura 10.

Figura 10. Aorta torácica. Local de secção.

Os fragmentos de aorta destinados à fixação em Epon-Araldite foram processados da mesma maneira que os do tecido cardíaco, exceto pelo posicionamento, que foi realizado de modo que o lúmen arterial permanecesse paralelo ao plano de corte. Oito cortes ultrafinos de $0,8\mu\text{m}$ foram preparados para cada fragmento, da mesma maneira que para o tecido cardíaco. Os cortes foram em seguida corados com azul de toluidina.

Os fragmentos destinados à fixação em parafina foram destinados para as colorações histológicas de von Kossa e Elástica van Giesson (EVG). A fixação em parafina foi realizada em processador automático de tecido (Histokine[®], Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha). O posicionamento do fragmento no bloco foi realizado da mesma maneira que na fixação com Epon-Araldite.

3.10.2. Preparo tecidual para os animais submetidos à perfusão com solução de NaCl a 0,9%

Para os animais submetidos à perfusão com solução fisiológica a 4°C, os ventrículos foram logo separados e seccionados transversalmente em 3 partes: a primeira foi embebida em formaldeído tamponado a 4%, pH 7,0, para posterior fixação em parafina em Histoquine®, destinada para colorações histológicas e imuno-histoquímica; os outros 2 fragmentos foram colocados em tubos apropriados *RNAse-free* de 2,0ml (Cryo.s®, Greiner, Kremsmünster, Áustria) e congelados em nitrogênio líquido a -80°C para posterior extração de proteína.

A aorta foi dividida em 2 partes: o primeiro fragmento foi destinado à fixação em parafina pelo mesmo procedimento e o segundo para a extração de proteína. O tecido fixado em parafina foi cortado longitudinalmente, de modo a se obter uma superfície de corte maior, tornando a contagem mais acurada.

3.11. Análise Morfológica

3.11.1. Análise Morfológica do coração

Foram avaliados o volume e a densidade por comprimento dos componentes do miocárdio. Para isso foram determinados o volume relativo de capilares, tecido intersticial, fibrócitos e miócitos, assim como a capilarização tecidual cardíaca, cuja medida é dada pela densidade capilar por comprimento ou “capillary length density”.

A área relativa de cada componente do tecido cardíaco foi determinada a partir da observação sistemática de oito campos através de grade de contagem com 100 pontos inserida na lente ocular (figura 12).

No caso do músculo cardíaco, foram contados os pontos dos seguintes componentes na grade:

- Capilares: $p(\text{cap})$
- Grandes Vasos: $p(\text{vasc})$
- Tecido intersticial: $p(\text{inter})$
- Fibrócitos: $p(\text{fibr})$
- Perócitos: $p(\text{peroc})$
- Espaço vazio: $p(\text{vazio})$

Os pontos de miócitos $p(\text{mioc})$ foram calculados a partir dos pontos totais da grade (100), subtraindo-se os pontos de todos os outros componentes.

Como a área relativa de cada componente é determinada pela contagem de pontos da mesma, pode-se calcular o volume relativo de cada estrutura a partir da contagem média de pontos na grade. Para isso, foram utilizadas áreas de referência (AR) para se estabelecer os valores percentuais de cada componente do tecido:

- AR para volume capilar: $100 - [p(\text{vasc}) + p(\text{vazio})]$
- AR para volume de miócitos: $100 - [p(\text{vasc}) + p(\text{vazio})]$
- AR para volume de fibrócitos: $p(\text{miócitos})$
- AR para volume intersticial: $p(\text{miócitos})$

A extrapolação da área observada para o volume relativo de cada componente foi deduzida aplicando-se o método de Mattfeld (Mattfeld et al, 1990) ao princípio de Delesse (Delesse MA, 1847), no qual o volume relativo

de cada componente de uma estrutura isotrópica é equivalente à área observada na superfície de corte.

A densidade capilar por comprimento é independente da densidade anatômica do miocárdio, portanto foi calculada através do número de capilares em uma determinada área de tecido utilizando-se a equação de Weibel (Weibel ER, 1979), válida para estruturas isotrópicas por randomização.

Densidade capilar por comprimento = $2 \times n^\circ$ de capilares/área tecidual

A densidade por comprimento é dada em mm/mm³ ou em 1/mm².

Método de aferição

Todas as lâminas foram analisadas com microscópio ótico (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipados com grade de 100 pontos na lente ocular já mencionada. Os componentes teciduais foram contados sob aumento de 1000x (10x na lente ocular, 100x na lente objetiva) com óleo de imersão (Imersionsöl, Merck, Darmstadt, Alemanha).

A análise foi realizada em 8 campos visuais por corte (8 fragmentos por animal, totalizando 64 campos para cada animal). A padronização para análise dos campos foi realizada conforme técnica exposta na figura 11. O método de contagem dos componentes do tecido cardíaco está ilustrado na figura 13.

Figura 11. Princípio de escolha de campos visuais por amostra de tecido cardíaco. Os campos numerados foram analisados. Via de regra, após cada campo de análise foram omitidos 3 campos para a análise do subsequente.

Figura 12. Grade de aferição (Integrationsplatte® II Carl Zeiss, Alemanha). A grade foi colocada em uma das oculares e se projeta sobre o tecido. Consiste de 100 pontos de cruzamento, portanto, cada ponto contado corresponde a 1% de área relativa da estrutura sobre a qual a grade está projetada.

Figura 13. Método de aferição por pontos, utilizado para determinação do volume relativo dos componentes do músculo cardíaco. As estruturas que se encontram no cruzamento entre as linhas perpendiculares foram contadas. No exemplo, vaso sangüíneo em vermelho, capilares em amarelo, espaço intersticial em verde e fibrócito em azul claro

Figura 14. Exemplo do princípio de Gundersen empregado na contagem capilar por área. Neste caso, somente as bordas superior e esquerda foram escolhidas para a contagem (capilares em verde), sendo que os capilares das bordas inferior e direita (amarelos) não foram contados.

A grade de medição foi calibrada com uma lâmina de calibração (Karl Zeiss, Göttingen, Alemanha), na qual a área de cada grade correspondeu a $0,0081\text{mm}^2$ sob aumento de 1000x.

A área para determinação da densidade capilar por comprimento foi definida pelas 4 bordas da grade. Para evitar uma superestimação, de acordo com o princípio de Gundersen (Kroustrup JP et al., 2001) duas bordas perpendiculares foram escolhidas para contagem, a exemplo da figura 14.

3.11.2. Análise morfológica da aorta

A análise morfológica foi realizada a partir de cortes seriados ultrafinos da artéria. A aferição dos diâmetros da aorta foi determinada por planimetria. Imagens dos cortes foram adquiridas por câmera fotográfica (Polaroid DMC1[®], Polaroid Corp., Cambridge, Reino Unido) acoplada a um microscópio ótico (Olympus BX45[®], Olympus Corp., Tóquio, Japão). As imagens foram transferidas para um software de análise (Optimas v. 6.0, Optimas Corp., Seattle, Washington, EUA), que estabeleceu automaticamente os contornos externos e internos da aorta. Automaticamente o software forneceu os cálculos das áreas (a) dos anéis externo e interno da aorta e, conseqüentemente, a área da parede.

A partir dos valores encontrados das áreas estabeleceu-se o diâmetro da parede a partir da seguinte fórmula:

$$\text{diâmetro} = \sqrt{\frac{a(\text{Lúmen}) + A(\text{Parede})}{\pi}} - \sqrt{\frac{a(\text{Lúmen})}{\pi}}$$

A relação diâmetro da parede/diâmetro do lúmen foi estabelecida através da divisão dos diâmetros médios de parede e lúmen.

Todas as investigações foram realizadas sem que o investigador tivesse ciência dos grupos de animais.

3.12. Colorações histológicas

3.12.1. Histologia comum

A coloração de Elastica van Gieson (EVG) foi utilizada para detecção de placas ateroscleróticas e para documentação do posicionamento das fibras elásticas nas lesões aórticas. Os fragmentos foram submetidos à desparafinização, em seguida, as lâminas foram imersas em solução de resorcina/fucsina (solução de Weigert) a 4 °C durante a noite. As lâminas foram retiradas e lavadas em água corrente por 1 minuto. Após isso, os fragmentos passaram por uma série de lavagens rápidas com etanol a 96%, a 70% e água destilada até a descoloração do tecido muscular, permanecendo somente as fibras elásticas coradas. Ao final, as lâminas foram imersas em solução de van Gieson (composta por ácido fucsínico e ácido pícrico) por 7 min para coloração do colágeno, sendo por último lavadas com álcool e imersas em xilol antes de serem cobertas. As lamínulas foram fixadas utilizando cola solúvel em xilol (Histofluid[®], Paul Marienfeld, Lauda-Koenigshofen, Alemanha).

Para a aferição do grau de calcificação aórtica foi utilizada a coloração de von Kossa, empregada também nos cortes de tecido dos

animais submetidos à perfusão com glutaraldeído fixados em parafina. As lâminas foram desparafinizadas e, em seguida, imersas em solução de nitrato de prata a 5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) sob luz solar por 1 hora. Após o primeiro passo, as lâminas foram lavadas e imersas em solução de ácido pirogálico a 1% por 50 segundos sendo novamente lavadas em água destilada para serem imersas em solução de tiosulfato pentahidratado de sódio a 5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 4 min. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água encanada e coradas em vermelho rápido nuclear por 3 minutos, lavadas e imersas em xilol para serem cobertas.

Para a análise do conteúdo de colágenos I e III no tecido foi utilizada a coloração de vermelho Sirius. Os cortes foram desparafinizados e, em seguida imersa por uma hora em solução de água destilada contendo ácido pícrico e vermelho Sirius na concentração de 1:1000. Após a coloração, as lâminas foram imersas em solução de 0,01N HCl por 2 minutos para cessar a reação do corante. Finalmente, as lâminas foram lavadas e imersas em xilol para serem cobertas.

3.12.2. Imuno-histoquímica

Para as técnicas de imuno-histoquímica foram utilizados anticorpos específicos para colágeno IV, fibronectina, fator transformante do crescimento beta (TGFB), endotelina-1 (ET-1), fator de transdiferenciação osteoblástica (RUNX-2/cbfa-1), receptores cálcio-sensível (CaSr), receptores para Vit D (VDR) e óxido-nítrico sintase endotelial (eNOS).

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada nos tecidos obtidos dos animais perfundidos com solução fisiológica a 4 °C, em cortes de parafina de 3µm realizados em micrótomo (Leica, Solms, Alemanha).

O procedimento consistiu na desparafinização das lâminas em xilol, com posterior dissolução do xilol e rehidratação dos fragmentos em banhos de 2 minutos com concentrações decrescentes de álcool (99,9%, 99,9%, 90%, 70%). Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo primário durante uma hora em estufa a 37 °C, incubação com anticorpo secundário e incubação com complexo contendo uma enzima que poderia ser uma fosfatase ou uma peroxidase. Dependendo da reação do anticorpo primário foi definido qual complexo seria utilizado: estreptavidina-biotina/fosfatase-alcalina (Biogenex, SanRamon, Califórnia, EUA) ou avidina/biotina com complexo HRP (horseradish peroxidase complex, Dako Germany, Hamburgo, Alemanha), incubado em estufa a 37 °C durante 20 minutos.

Entre cada passo acima citado as lâminas foram lavadas três vezes por 5 minutos em solução de Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris, Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha) tamponada em solução salina (TBS, pH 7.6) no caso do complexo fosfatase, ou em solução fosfatada (PBS, pH 7,2) no caso do complexo peroxidase.

O complexo marcado com fosfatase alcalina foi revelado com substrato Fast Red (Dako, Copenhagen, Dinamarca) originando uma coloração avermelhada no tecido, o complexo com peroxidase foi revelado com solução de H₂O₂ a 0.01%, 3,3'-Diaminobenzidina 0.05M a 0,02% em tampão, pH 7,6 (Dako REAL Detection System[®], Dako Germany, Hamburgo,

Alemanha), gerando coloração acastanhada. O tempo de reação foi controlado sob microscópio, sendo a mesma interrompida com as soluções tampão TBS ou PBS conforme a reação. A contra coragem para ambos foi realizada utilizando solução corante azul “Mayers Hämalauen” (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 30 segundos.

Os controles negativos das colorações foram realizados através da omissão do anticorpo primário. Para reduzir as variações inerentes ao ambiente, todas as lâminas de cada anticorpo foram coradas em, no máximo, 2 sessões.

Todos os anticorpos foram previamente testados para especificidade em tecido de camundongo. A concentração ideal do anticorpo primário foi determinada através de testes utilizando múltiplas diluições.

O princípio da imuno-histoquímica encontra-se esquematizado na figura 15.

Os anticorpos primários assim como os respectivos anticorpos secundários e as técnicas de exposição antigênica encontram-se enumerados na tabela 2.

Figura 15. Princípio da imuno-histoquímica, técnica de estreptavidina-biotina. A estreptavidina marcada com fosfatase alcalina reage com o anticorpo secundário biotilado (adaptado de www.uiowa.edu).

Tabela 2. Anticorpos utilizados para coloração de imuno-histoquímica de tecido aórtico e cardíaco

Marcador	Método de exposição antigênica	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
Colágeno tipo IV	Nenhum	Anticorpo policlonal de coelho (BioTrend BT, Colônia, Alemanha) 1:100 em diluente universal (DCS, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-coelho biotilado (BioGenex, San Ramon, Califórnia (EUA) pronto para uso
Fibronectina	Nenhum	Anticorpo policlonal de coelho, (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha) 1:100 em diluente universal (DCS, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-coelho biotilado (BioGenex, San Ramon, Califórnia, EUA) pronto para uso
TGFβ	Nenhum	Anticorpo policlonal de coelho (Abcam, Cambridge, Reino Unido) 1:50 em soro caprino a 2% (Dako, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-coelho (BioGenex, San Ramon, Califórnia, EUA) pronto para uso

Marcador	Método de exposição antigênica	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
Endothelina-1 (ET-1)	Incubado com solução de desmascaramento antigênico (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) a 80 °C por 20 min	Anticorpo policlonal de coelho (BioTrend BT, Colônia, Alemanha) 1:50 em soro caprino a 1% (Dako, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-coelho biotilado (BioGenex, San Ramon, Califórnia, EUA) pronto para uso
Receptor calico-sensível (CaSR)	Incubado em solução de tripsina a 0,1% em CaCl ₂ a 0,1% por 20min a 37 °C + bloqueio de imunoglobulinas endógenas com fragmento Fab caprino anti-camundongo (Jackson ImmunoResearch Labs, Suffolk, Reino Unido) a 0,1 % por 20min a 37 °C	Anticorpo policlonal de camundongo (Affinity BioReagents, Golden, Colorado, EUA) 1:200 em diluente universal (DCS, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-camundongo biotilado (Jackson ImmunoResearch Labs, Suffolk, Reino Unido) pronto para uso
RUNX/cbfa-1	Incubado em solução de tripsina a 0,1% em cloreto de cálcio a 0,1% por 20min a 37 °C	Anticorpo policlonal de coelho (Abcam, Cambridge, Reino Unido) 1:50 em soro caprino a 2% (Dako, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-coelho biotilado (BioGenex, San Ramon, Califórnia, EUA) pronto para uso
Receptor para Vit D (VDR)	Incubado por 20 min em solução tampão citrato 10mM (pH 6,0) aquecida em microondas	Anticorpo policlonal de coelho (Abcam, Cambridge, Reino Unido) 1:100 em diluente universal (DCS, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-coelho biotilado (BioGenex, San Ramon, Califórnia, EUA) pronto para uso
Óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS)	Incubado por 20 min em solução tampão citrato 10mM (pH 6,0) aquecida em microondas	Anticorpo policlonal de coelho (Abcam, Cambridge, Reino Unido) 1:100 em diluente universal (DCS, Hamburgo, Alemanha)	Anticorpo policlonal caprino anti-coelho biotilado (BioGenex, San Ramon, Califórnia, EUA) pronto para uso

3.12.3. Análise das lâminas

Em todos os experimentos a análise foi realizada de maneira que o pesquisador não tivesse ciência de qual grupo seria analisado.

A análise da coloração de von Kossa e vermelho Sirius foram realizadas utilizando escore semiquantitativo (0-4) de acordo com a superfície média corada do tecido. Para a análise de imuno-histoquímica dos anticorpos de coloração citoplasmática e intersticial, associado ao escore de superfície corada foi integrado um escore de intensidade de coloração (0 a

3). Os valores dos escores foram multiplicados, gerando valores de 1 a 12. Para determinação do valor final foi realizada a média aritmética de todos os escores encontrados no fragmento. O escore está descrito na tabela 3.

Nas aortas, a análise das lâminas não levou em conta as áreas das placas ateroscleróticas, com exceção feita para os anticorpos com marcação exclusivamente nuclear (Runx-2 e VDR). Além disso, análise das lâminas coradas com estes anticorpos foi realizada utilizando aumento de 400x, sendo o resultado expresso em células positivas por campo de visão.

Tabela 3. Escore semiquantitativo para análise de imuno-histoquímica

Escore de superfície	Escore de intensidade
0 – superfície não corada	0 – sem coloração
1 – até 10% de superfície corada	1 – coloração de intensidade leve
2 – 11 a 50% de superfície corada	2 – coloração de intensidade moderada
3 – 51 a 80% de superfície corada	3 – coloração expressiva
4 – mais que 80% de superfície corada	
Exemplo: Campo visual apresenta 30% da superfície corada (valor 2) com coloração expressiva (valor 3). Valor final do campo $2 \times 3 = 6$	

3.13. Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)

A reação de RT-PCR foi realizada em amostras de tecido cardíaco, cujo processo pode ser dividido em três etapas: o isolamento do RNA, a transcrição reversa e a amplificação. Foram realizadas reações de RT-PCR para o gene codificador de TGF β .

3.13.1. Isolamento do RNA

O RNA total foi isolado do tecido utilizando kit de isolamento (Peq-Gold RNA pure[®], peq Lab, Erlangen, Alemanha) de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. A concentração do RNA foi determinada utilizando espectrofotômetro. Foi realizada checagem do RNA em gel de agarose a 1% para verificar sinais de degradação.

3.13.2. Transcrição para DNA complementar

Cada 1µg de RNA foi transcrito reversamente através de kit (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR[®], Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) através de um “primer” randômico até uma concentração final de 3.2µg/µl. A mistura obtida foi incubada por 10 min a 25°C, em seguida por 60 min a 42°C, por 5 min a 99°C e, ao final, resfriada a 4°C por 5 min.

3.13.3. PCR semiquantitativo

Para assegurar a fidelidade da extração do RNA mensageiro e da transcrição do mesmo, todas as amostras foram submetidas à amplificação por PCR com primers de oligonucleotídeos para um gene constitutivamente expresso, no caso, para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e os dados foram corrigidos de acordo com o valor encontrado. Para este procedimento foi utilizado o kit (LightCycler-FastStart DNAMaster SYBR Green I[®], Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha).

Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando o mesmo kit acima mencionado e quantificadas. Os primers e as condições de ciclo utilizadas no estudo estão enumerados abaixo:

TGF β

primer codificante 5-CACCATCCATGACATGAACC-3

primer molde 5-TCATGTTGGACAACCTGCTCC-3

denaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15s, 57°C por 5s e 72°C por 16s usando o kit LightCycler (cloreto de magnésio a 3.5mM, concentração final do *primer* de 0,5 μ M). Medidas coletadas a 80°C ao final de cada ciclo.

Para cada quantificação foi realizada uma curva controle, sendo os resultados determinados conforme a curva padrão obtida. Para todos os animais foi realizado o experimento três vezes, sendo o resultado final obtido a partir da média aritmética dos três experimentos.

3.14. Análise Estatística

Após a verificação para distribuição Gaussiana, todos os dados foram avaliados com o teste da análise de variância (ANOVA), com subsequente teste *t* (*Student* ou *Mann Whitney caso indicado*), no caso de resultados estatisticamente significantes. Os dados de contingência foram analisados com o teste exato de Fisher.

Todos os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Dados biométricos

4.1.1. Evolução ponderal e pressão arterial

A evolução ponderal foi variável entre os grupos, sendo que ao final do estudo os animais sham apresentaram massa corporal significativamente maior quando comparados aos UNX ($27,8 \pm 0,45$ vs. $29,4 \pm 0,46$ g, $p < 0,05$). No entanto, analisando os grupos isoladamente, tal diferença não foi observada. Os resultados encontram-se ilustrados na figura 16.

Durante o período de tratamento, os animais que receberam tratamento com calcitriol apresentaram perda transitória de massa corporal, sendo esta mais expressiva no grupo UNX Calcitriol, durante a sexta semana de tratamento. Neste momento a massa corporal dos animais UNX Calcitriol chegou a ser significativamente menor que a dos UNX Controle ($25,1 \pm 3,34$ vs. $28,6 \pm 2,92$ g, $p < 0,01$). Este fenômeno foi transitório, sendo que os animais do grupo UNX Calcitriol apresentaram recuperação espontânea da massa corporal. À exceção deste episódio pontual, não foi observada diferença significativa na massa corporal entre os grupos tratados e os respectivos controles. A evolução da massa corporal ao longo do tratamento encontra-se ilustrada na figura 17.

A pressão arterial caudal foi semelhante entre os grupos estudados, inclusive quando analisados todos os animais shams vs. todos os UNX. Os resultados encontram-se ilustrados na figura 16.

Figura 16. Massa corporal e pressão arterial ao final do estudo: análise do modelo experimental e dos grupos individuais

Figura 17. Evolução ponderal ao longo do período de tratamento

4.1.2. Massa cardíaca, massa do ventrículo esquerdo (VE) e relação com massa corporal

Ao final do estudo, a massa cardíaca e a massa do VE foram semelhantes entre os grupos. Não houve também diferença estatística na relação da massa cardíaca pela massa corpórea, assim como na relação da massa do VE pela massa corpórea.

Os dados encontram-se resumidos na tabela 4 e as relações entre massa cardíaca e massa do VE pela massa corpórea também podem ser observadas na figura 18.

Tabela 4. Massa corporal final, massa cardíaca, massa do ventrículo esquerdo (VE) e relação entre massa corporal e as massas cardíaca e do VE

Grupo	Massa Corporal (g)	Massa Cardíaca (g)	Massa do VE (g)	Relação massa cardíaca/massa corporal (mg/g)	Relação massa do VE / massa corporal (mg/g)
Sham Controle (n=16)	29,8±2,72	0,17±0,028	0,1±0,012	5,54±0,75	3,61±0,27
Sham Paricalcitol (n=16)	29,3±2,88	0,17±0,022	0,1±0,014	5,89±0,61	3,55±0,28
Sham Calcitriol (n=16)	29,6±3,02	0,16±0,016	0,1±0,029	5,73±0,9	3,77±0,67
UNX Controle (n=16)	28,9±3,14	0,18±0,031	0,13±0,033	6,29±0,88	4,36±0,91
UNX Paricalcitol (n=16)	27,7±3,17	0,17±0,02	0,11±0,012	6,08±0,88	4,13±0,5
UNX Calcitriol (n=16)	26,7±3,04	0,16±0,026	0,1±0,021	5,95±0,93	4,1±0,68
p (ANOVA)	ns	ns	ns	ns	ns

Valores expressos em média±desvio padrão

Figura 18. Relação entre massa cardíaca e massa do VE e massa corpórea.

4.2. Análise bioquímica

4.2.1. Depuração de creatinina e albuminúria

Embora não tenha sido observada diferença estatística nos valores de creatinina sérica entre os animais Sham e UNX, os animais Sham

apresentaram depuração de creatinina significativamente maior em comparação aos UNX, considerando-se todos os grupos em conjunto. Na análise entre os grupos individuais, porém, não foi observada diferença estatística tanto na concentração quanto na depuração de creatinina entre os diferentes grupos. Os dados encontram-se ilustrados na figura 19.

Figura 19. Creatinina sérica e depuração de creatinina dos animais Sham e UNX, depuração de creatinina nos diferentes grupos.

Em relação à albuminúria e à relação albumina/creatinina urinária, não foi observada diferença estatística entre os modelos Sham e UNX. Da mesma maneira, não foi observada diferença entre os grupos individuais. Os dados de depuração de creatinina e albuminúria encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Função renal e albuminúria nos diferentes grupos

Grupo	Creatinina sérica (mg/dl)	Clearance de creatinina (μl/min)	Albuminúria (mg/24h)	Relação albumina/creatinina urinárias (mg/g)
Sham Controle (n=16)	0,18±0,085	246±65	0,04±0,041	10,31±9,03
Sham Paricalcitol (n=16)	0,15±0,035	276±125	0,047±0,035	8,59±4,97
Sham Calcitriol (n=16)	0,21±0,013	202±64	0,044±0,3	7,57±3,71
UNX Controle (n=16)	0,18±0,044	201±33	0,033±0,22	10,74±4,06
UNX Paricalcitol (n=16)	0,24±0,084	167±34	0,035±0,026	8,34±3,86
UNX Calcitriol (n=16)	0,24±0,068	142±102	0,024±0,027	10,71±6,12
p (ANOVA)	ns	ns	ns	ns

Valores expressos em média e desvio padrão

4.2.2. Perfil lipídico

Devido à pequena quantidade de soro obtida dos camundongos para a análise bioquímica, o perfil lipídico foi realizado somente 8 animais sham e em 16 animais UNX, com o objetivo de se comparar os modelos experimentais. Todos os grupos experimentais estavam representados nas amostras enviadas, sendo que os valores individuais apresentaram

considerável semelhança. Isto pode ser comprovado através do desvio padrão dos grupos, que, na maioria das vezes foi inferior a 10% da média.

Não foi observada diferença significativa nas taxas de colesterol total e frações entre os modelos sham e UNX. Os dados encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Perfil lipídico dos animais sham e UNX

Modelo experimental	Colesterol total (mg/dl)	Colesterol LDL (mg/dl)	Colesterol HDL (mg/dl)	Triglicérides (mg/dl)
Sham (n=8)	527±25,6	347±28,9	128±3,4	168±24,3
UNX (n=16)	465±48,5	303±39	111±8,7	149±19,7
p (t Student)	ns	ns	ns	ns

Valores expressos em média e desvio padrão

Tabela 7. Metabolismo de cálcio e fósforo nos diferentes grupos

Grupo	Cálcio Ionizado (mEq/l)	Cálcio Ionizado (mmol/l)	Fósforo (mmol/l)	Cálcio x Fósforo (mmol ² /l ²)
Sham Controle (n=16)	1,13±0,05	2,28±0,1	2,53±0,43	5,76±0,98
Sham Paricalcitol (n=16)	1,17±0,09	2,34±0,18	3±0,52	6,77±1,53
Sham Calcitriol (n=16)	1,15±0,12	2,31±0,23	3,25±0,26 ^{*,&,%}	6,94±0,45 [*]
UNX Controle (n=16)	1,1±0,08	2,09±0,15	2,67±0,35	5,92±0,79
UNX Paricalcitol (n=16)	1,13±0,09	2,26±0,18	2,75±0,27	6,16±0,77
UNX Calcitriol (n=16)	1,21±0,11	2,42±0,2	3,35±0,81 [*]	7,62±1,53 ^{*,&}
p (ANOVA)	ns	ns	p<0,05	p<0,05

Valores expressos em média e desvio padrão

^{*}p<0,05 vs. Sham Controle

[&]p<0,05 vs. UNX Controle

[%]p<0,05 vs. UNX Paricalcitol

4.2.3. Cálcio e fósforo

Embora tenha sido encontrada uma tendência para níveis mais elevados de cálcio ionizado nos grupos tratados com calcitriol, não foi observada diferença estatística entre os níveis de cálcio ionizado nos diferentes grupos. No caso do fósforo, porém, foram encontrados valores significativamente mais elevados nos grupos que receberam tratamento com calcitriol, sendo que esta diferença refletiu-se também no produto cálcio x fósforo. Os resultados estão expostos na tabela 7 e ilustrados na figura 20.

Figura 20. Valores de cálcio, fósforo e produto cálcio x fósforo ao final do estudo

4.3. Análise morfológica tecidual

4.3.1. Tecido cardíaco

A análise porcentual de volume dos diferentes componentes do tecido cardíaco não revelou diferença estatística entre os grupos estudados. A densidade capilar por comprimento, porém, foi significativamente mais baixa no grupo UNX Controle quando comparada aos demais grupos. Os animais do grupo UNX Calcitriol apresentaram também uma densidade capilar por comprimento significativamente mais baixa que dos animais do grupo Sham Controle. Os dados encontram-se expostos na tabela 8. A figura 21 mostra secções representativas de músculo cardíaco obtidas de animais dos diferentes grupos.

Tabela 8. Análise estereológica do tecido cardíaco e músculo psoas: volumes porcentuais e densidade capilar por comprimento

Grupo	Volume capilar (%)	Volume intersticial (%)	Volume fibrocítico (%)	Densidade capilar por comprimento - coração (mm/mm ³)	Densidade capilar por comprimento - psoas (mm/mm ³)
Sham Controle (n=8)	4,86±0,58	0,69±0,09	0,94±0,1	5855±121 ^{&&,@}	879±144
Sham Paricalcitol (n=8)	4,98±0,74	0,6±0,1	0,9±0,13	5838±511 ^{&&}	934±129
Sham Calcitriol (n=8)	4,74±0,28	0,68±0,08	0,82±0,21	5839±298 ^{&&}	911±150
UNX Controle (n=9)	4,44±0,55	0,68±0,14	1,02±0,16	5147±338	863±79
UNX Paricalcitol (n=9)	4,77±0,72	0,67±0,15	0,93±0,18	5610±727 ^{&}	830±128
UNX Calcitriol (n=9)	4,45±0,74	0,67±0,11	0,93±0,07	5538±314 ^{&}	920±81
p (ANOVA)	ns	ns	ns	p<0,01	ns

[&] p<0,05 vs. UNX Controle

^{&&} p<0,01 vs. UNX Controle

[@] p<0,05 vs. UNX Calcitriol

Figura 21. Cortes ultrafinos de miocárdio, coloração azul de toluidina, aumento 500x. **(A)** Sham Controle, **(B)** UNIX Controle, **(C)** Sham Paricalcitol, **(D)** UNIX Paricalcitol, **(E)** Sham Calcitriol, **(F)** UNIX Calcitriol

Diferentemente do músculo cardíaco, na análise estereológica do músculo psoas não foi encontrada diferença na densidade por comprimento entre os grupos, revelando que tal fenômeno não acometeu a musculatura esquelética. Amostras representativas de tecido estão ilustradas na figura 22 e os resultados na análise estão expostos na Tabela 8.

Figura 22. Secções de parafina de músculo psoas, coloração de PAS, aumento 400x. **(A)** Sham Controle, **(B)** UNX Controle. A densidade capilar por comprimento foi semelhante entre os grupos.

4.3.2. Aorta

A exceção do grupo UNX Paricalcitol, o diâmetro da parede aórtica foi significativamente maior nos grupos UNX quando comparados aos dos grupos Shams. Estas diferenças estatísticas foram acentuadas após o cálculo da relação entre diâmetro da parede aórtica pelo diâmetro luminal, embora não tenha sido evidenciada diferença estatística no diâmetro luminal entre os grupos. Os resultados encontram-se expostos na tabela 9. A figura 23 mostra secções representativas das aortas do estudo.

Tabela 9. Diâmetro da parede, diâmetro luminal e relação entre diâmetro da parede e luminal

Grupo	Diâmetro da parede (mm)	Diâmetro do lúmen (mm)	Relação diâmetro da parede/diâmetro do lúmen
Sham Controle (n=8)	0,047±0,003	0,81±0,04	0,057±0,002
Sham Paricalcitol (n=8)	0,046±0,005	0,88±0,08	0,053±0,005
Sham Calcitriol (n=8)	0,046±0,009	0,80±0,11	0,058±0,01
UNX Controle (n=8)	0,054±0,007 ^{*,#,%}	0,84±0,12	0,064±0,005 ^{**,###}
UNX Paricalcitol (n=8)	0,044±0,007	0,74±0,08	0,06±0,006 [#]
UNX Calcitriol (n=9)	0,056±0,009 ^{*,#,%}	0,75±0,11	0,075±0,013 ^{**,###,@,%}
p (ANOVA)	p<0,05	ns	p<0,001

Valores expressos em média e desvio padrão

* p<0,05 vs. Sham Controle
 # p<0,05 vs. Sham Paricalcitol
 ### p<0,001 vs. Sham Paricalcitol
 @ p<0,05 vs. UNX Calcitriol
 % p<0,05 vs. UNX Paricalcitol

** p<0,01 vs. Sham Controle
 ## p<0,01 vs. Sham Paricalcitol

Analisando-se os diâmetros das camadas íntima e média na parede arterial, em cortes de aorta seriados através da coloração de EVG, observou-se que a relação entre a camada íntima/camada média estava elevada nos grupos Sham Calcitriol, UNX Controle e UNX Calcitriol em relação ao Sham Controle. O grupo Sham Calcitriol apresentou ainda uma relação íntima/média significativamente mais elevada quando comparado ao Sham Paricalcitol e UNX Paricalcitol. Os resultados estão expostos na tabela 10.

Figura 23. Cortes ultrafinos de aorta, coloração azul de toluidina. **(A)** Sham Controle, 100x. **(B)** UNX Controle com lesão aterosclerótica 100x. **(C)** Sham Paricalcitol, 200x. **(D)** Sham Calcitriol, sinais de calcificação subintimal no detalhe (setas), 200x. **(E)** UNX Paricalcitol, 200x. **(F)** UNX Calcitriol com lesão aterosclerótica e sinais de calcificação subendotelial, 200x.

A incidência de placas ateroscleróticas foi analisada tanto nos animais perfundidos com glutaraldeído como nos animais perfundidos com NaCl e mostrou-se semelhante em todos os grupos. Da mesma maneira, não foi evidenciada diferença estatística em relação à área das placas nos grupos estudados devido à extrema variabilidade individual dos diâmetros as placas. Entretanto, a área das placas ateroscleróticas influenciou de maneira significativa os resultados da relação íntima média, já que as lesões ateroscleróticas estão incluídas na camada íntima. Os resultados estão expostos na Tabela 10. Amostras representativas das secções da aorta encontram-se ilustradas na figura 24.

Tabela 10. Relação íntima-média da parede arterial, incidência e área de placas ateroscleróticas

Grupo	Incidência de placas ateroscleróticas	Área média das placas μm^2	Relação camada íntima/camada média
Sham Controle (n=16)	7(43,8%)	120±166	0,053±0,08
Sham Paricalcitol (n=16)	6(37,5%)	91±115	0,06±0,018
Sham Calcitriol (n=16)	6(37,5%)	1212±1739	0,099±0,03 ^{**##%}
UNX Controle (n=16)	7(43,8%)	2157±1922	0,076±0,013 ^{**}
UNX Paricalcitol (n=16)	7(43,8%)	326±384	0,064±0,018
UNX Calcitriol (n=16)	7(43,8%)	2929±5005	0,095±0,043 [*]
p (ANOVA)	ns	ns	p<0,01

Valores expressos em média e desvio padrão

^{**} p<0,01 vs. Sham Controle
[#] p<0,05 vs. Sham Paricalcitol
[%] p<0,05 vs. UNX Paricalcitol

^{##} p<0,01 vs. Sham Paricalcitol

Figura 24. Secções de parafina de aorta, coloração de EVG, aumento 200x. **(A)** Sham Controle, sem lesões. **(B)** UNX Controle com espessamento da parede arterial e lesão aterosclerótica. **(C)** Sham Paricalcitol, com pequena lesão aterosclerótica. **(D)** UNX Paricalcitol com lesão aterosclerótica, 200x. **(E)** Sham Calcitriol, com sinais de calcificação vascular (setas) e extensa lesão aterosclerótica. **(F)** UNX Calcitriol com espessamento da parede arterial, importante lesão aterosclerótica e sinais de calcificação vascular (setas).

4.4. Colorações histológicas e imuno-histoquímica

4.4.1. Tecido cardíaco

Marcadores para fibrose e TGF β

Na marcação com vermelho Sirius a expressão de colágeno foi significativamente mais elevada nos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol em relação aos Shams. Não foi evidenciada diferença estatística na expressão de colágeno entre o grupo UNX Paricalcitol e os demais grupos estudados. Amostras da expressão de colágeno estão representadas na figura 25.

Já na análise por imuno-histoquímica, na marcação para colágeno IV foi evidenciada diferença significativa entre os animais dos grupos sham e UNX, porém sem diferença significativa entre os tratamentos empregados. Para os marcadores fibronectina e TGF β não houve diferença estatística entre os grupos. Os resultados encontram-se expostos na tabela 11.

Marcação para ET-1, eNOS, CaSR, VDR

A marcação para ET-1 foi significativamente maior nos grupos UNX Controle quando comparada à dos grupos Sham Controle e Sham Paricalcitol. A marcação no grupo UNX Calcitriol foi significativamente maior quando comparada à do grupo Sham Controle. Tal fenômeno não ocorreu com o grupo UNX Paricalcitol, cuja marcação não apresentou diferença estatística quando comparada aos grupos shams. Em relação à expressão de CaSR e VDR, não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Os resultados de ambas as marcações encontram-se expostos

na Tabela 12. A figura 26 ilustra a marcação para endotelina-1 no tecido cardíaco.

Tabela 11. Expressão de marcadores para fibrose no tecido cardíaco, quantificada por escore semiquantitativo (0-12)

Grupo	Colágeno (Vermelho Sirius)	Colágeno IV	Fibronectina	TGF-β1
Sham Controle (n=9)	1,52±0,16	2,01±0,37	3,37±0,43	1,98±0,16
Sham Paricalcitol (n=9)	1,43±0,14	2,02±1,08	3,30±0,41	1,79±0,38
Sham Calcitriol (n=8)	1,43±0,14	2,02±0,49	3,24±0,84	2,14±0,49
UNX Controle (n=8)	1,72±0,15 ^{*,##,\$\$}	3,13±0,39 ^{*,,\$}	4,13±0,79	2,59±0,78
UNX Paricalcitol (n=8)	1,57±0,27	3,14±1,15 ^{*,\$}	3,35±0,65	2,07±0,43
UNX Calcitriol (n=9)	1,73±0,15 ^{*,##,\$\$}	3,48±0,38 ^{*,#,\$\$}	3,54±0,26	2,52±1,12
p (ANOVA)	p<0,01	p<0,01	ns	ns

Tabela 12. Expressão de marcadores para stress oxidativo, CaSR (escore semiquantitativo (0-12) e VDR (células positivas/campo)

Grupo	Endotelina-1	eNOS	CaSR	VDR
Sham Controle (n=9)	2,87±0,39	2,10±0,30	2,65±0,37	2,01±0,38
Sham Paricalcitol (n=9)	2,98±0,41	2,26±0,21	3,11±0,63	2,02±0,33
Sham Calcitriol (n=8)	3,32±0,28	2,14±0,29	2,26±0,63	2,1±0,22
UNX Controle (n=8)	3,55±0,54 ^{*,#}	1,92±0,28	2,54±0,59	1,87±0,22
UNX Paricalcitol (n=8)	3,35±0,68	2,05±0,49	2,48±0,61	1,89±0,2
UNX Calcitriol (n=9)	3,77±0,81 [*]	2,05±0,25	2,63±0,26	2,01±0,37
p (ANOVA)	p<0,05	ns	ns	ns

Valores expressos em média e desvio padrão

* p<0,05 vs. Sham Controle

p<0,05 vs. Sham Paricalcitol

\$ p<0,05 vs. Sham Calcitriol

** p<0,01 vs. Sham Controle

p<0,01 vs. Sham Paricalcitol

\$\$ p<0,01 vs. Sham Calcitriol

Figura 25. Expressão de colágenos I e III no tecido cardíaco dos animais UNX (Vermelho Sirius, 40x). **(A)** UNX Controle, com área de fibrose subvalvar (seta azul) e lesão aterosclerótica na raiz da aorta (seta preta). **(B)** UNX Paricalcitol, **(C)** UNX Calcitriol, com extensa lesão aterosclerótica (setas).

Figura 26. Expressão de endotelina-1 no tecido cardíaco, 200x. **(A)** Sham Controle, com expressão no endotélio vascular **(B)** Sham Paricalcitol, idem **(C)** Sham Calcitriol, com expressão mais acentuada no vaso **(D)** UNX Controle, com expressão tecidual importante **(E)** UNX Paricalcitol, com expressão tecidual, porém pouco contraste **(F)** UNX Calcitriol, com maciça expressão tecidual e visível contraste.

4.4.2. Aorta

Marcadores para calcificação vascular

Na camada média, a análise através da coloração de von Kossa revelou que os animais do grupo UNX Calcitriol apresentaram marcação positiva significativamente mais expressiva que nos demais grupos, a exceção do grupo Sham Calcitriol. A incidência de células positivas para o marcador de diferenciação osteoblástica Runx-2 seguiu a mesma tendência.

Na análise da íntima, resultados semelhantes foram observados. Na coloração de von Kossa, a marcação foi mais expressiva no grupo UNX Calcitriol em comparação aos Sham e UNX Controles, na imuno-histoquímica para Runx-2, o número de células positivas para o marcador foi significativamente mais elevado em comparação com os grupos Sham Controle, UNX Controle e UNX Paricalcitol. Os resultados encontram-se expostos na tabela 13.

Sinais de calcificação vascular foram somente observados nos animais tratados (Paricalcitol ou Calcitriol), sendo que em 50% dos casos, os animais pertenciam ao grupo UNX Calcitriol. Amostras de aorta coradas com von Kossa e com a marcação para Runx-2 estão ilustradas na figura 27.

Marcadores para fibrose

A marcação para vermelho Sirius revelou uma impregnação significativamente mais intensa na camada média no grupo UNX Controle quando comparado ao Sham Controle e ao Sham Paricalcitol e no grupo UNX Calcitriol quando comparado ao grupo Sham Paricalcitol. Não foi

observada diferença estatística na coloração de vermelho Sirius na camada íntima.

A marcação para Colágeno IV na camada média foi também significativamente mais intensa no grupo UNX Controle quando comparada a todos os outros grupos exceto o grupo UNX Calcitriol. A marcação para colágeno IV foi significativamente mais acentuada nos grupos UNX Paricalcitol e UNX Calcitriol quando comparados ao grupo sham Controle. Na camada íntima, a marcação foi significativamente mais intensa em todos os grupos UNX quando comparados ao Sham Controle. Os resultados estão expressos na Tabela 14.

Tabela 13. Marcadores de calcificação da parede aórtica e incidência de placas ateroscleróticas com sinais de calcificação

Grupo	Coloração de von Kossa escore semiquantitativo (0-4)		Marcação com Runx-2 (cbfa1) (cél/s/campo 400x)		Incidência de placas com sinais de calcificação
	Íntima	Média	Íntima	Média	
Sham Controle (n=8)	0,036±0,087	0,083±0,109	0,100±0,120	0,194±0,219	0
Sham Paricalcitol (n=9)	0,090±0,164	0,347±0,687	0,109±0,116	0,281±0,540	1 (11%)
Sham Calcitriol (n=8)	0,354±0,379	1,103±1,178	0,126±0,194	0,575±1,436	2 (25%)
UNX Controle (n=8)	0,028±0,079	0,106±0,175	0,066±0,070	0,129±0,098	0
UNX Paricalcitol (n=8)	0,184±0,260	0,440±0,602	0,078±0,107	0,236±0,157	2 (25%)
UNX Calcitriol (n=9)	0,458±0,471 ^{*,&}	1,593±1,03 ^{*,#,&,%}	0,251±0,225 ^{#,&,%}	1,326±2,193 ^{*,#,&}	5 (55,5%) ^{*,&}
p (ANOVA)	p<0,05	p<0,0001	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Valores expressos em média e desvio padrão

* p<0,05 vs. Sham Controle
p<0,05 vs. Sham Paricalcitol
& p<0,05 vs. UNX Controle

** p<0,01 vs. Sham Controle
&& p<0,01 vs. UNX Controle
% p<0,05 vs. UNX Paricalcitol

Figura 27. Coloração de von Kossa (secções da esquerda) e marcação para Runx-2 correspondente (direita), 200x. **(A), (B)** Sham Controle: ausência de calcificação e de positividade para o marcador. **(C), (D)** UNX Controle: placa aterosclerótica não calcificada com mínima marcação positiva para Runx-2. **(E), (F)** UNX Paricalcitol: presença de duas placas ateroscleróticas com mínimos sinais de calcificação e discreta marcação para Runx-2. **(G), (H)** UNX Calcitriol: calcificação da média e das placas ateroscleróticas com grande número de células positivas para o Runx-2, especialmente na região da placa.

Tabela 14. Expressão de colágeno por vermelho Sirius e imuno-histoquímica para colágeno IV, camadas íntima e média.

Grupo	Coloração de vermelho Sirius		Colágeno IV	
	Íntima	Média	Íntima	Média
Sham Controle (n=8)	1,92±0,34	2,67±0,61	2,83±0,3	2,52±0,23
Sham Paricalcitol (n=9)	1,76±0,65	2,53±0,53	2,84±1	2,88±1,06
Sham Calcitriol (n=8)	2,75±1,35	3,79±1,56	3,2±1,16	3,14±0,83
UNX Controle (n=8)	2,57±0,54	3,59±0,54 ^{*,#}	4,42±1,1 ^{*,#}	4,60±0,82 ^{***,#,\$,%}
UNX Paricalcitol (n=8)	2,09±0,69	2,84±0,38	3,86±0,79 [*]	3,62±0,72 ^{**}
UNX Calcitriol (n=9)	3,48±2,37	4,38±2,06 [#]	4,33±1,05 ^{*,#}	3,91±0,63 ^{***}
p (ANOVA)	ns	p<0,05	p<0,05	p<0,001

Valores expressos em média e desvio padrão

- * p<0,05 vs. Sham Controle
- *** p<0,001 vs. Sham Controle
- # p<0,05 vs. Sham Paricalcitol
- \$ p<0,05 vs. Sham Calcitriol
- % p<0,05 vs. UNX Paricalcitol

No caso da marcação para fibronectina, não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados, tanto na camada média como na camada íntima.

A marcação de TGFβ foi significativamente mais acentuada nos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol, tanto na camada íntima quanto na camada média, quando comparada à expressão nos grupos Sham Controle, Sham Paricalcitol e UNX Paricalcitol. Os resultados são apresentados na tabela 15. A figura 28 mostra a expressão de TGFβ na aorta nos grupos Sham e UNX Controle em topografia livre de lesões ateroscleróticas.

Tabela 15. Expressão de Fibronectina e de TGF β em aorta, camadas íntima e média. Valores expressos em escore semiquantitativo (0-12)

Grupo	Fibronectina		TGF β	
	Íntima	Média	Íntima	Média
Sham Controle (n=8)	2,14 $\pm$ 0,29	2,16 $\pm$ 0,36	0,34 $\pm$ 0,31	0,47 $\pm$ 0,17
Sham Paricalcitol (n=9)	2 $\pm$ 0,96	2,12 $\pm$ 0,35	0,36 $\pm$ 0,3	0,47 $\pm$ 0,28
Sham Calcitriol (n=8)	2,19 $\pm$ 0,91	2,12 $\pm$ 0,62	0,46 $\pm$ 0,2	0,56 $\pm$ 0,18
UNX Controle (n=8)	3,13 $\pm$ 1,06	2,52 $\pm$ 0,82	0,92 $\pm$ 0,54 ^{*,#,%}	0,85 $\pm$ 0,18 ^{**,#,\$,%}
UNX Paricalcitol (n=8)	2,24 $\pm$ 0,74	2,26 $\pm$ 0,3	0,41 $\pm$ 0,25	0,58 $\pm$ 0,2
UNX Calcitriol (n=9)	2,83 $\pm$ 0,64	2,53 $\pm$ 0,36	0,74 $\pm$ 0,24 ^{*,#,\$,%}	0,82 $\pm$ 0,14 ^{**,#,\$,%}
p (ANOVA)	ns	ns	p<0,05	p<0,01

Valores expressos em média e desvio padrão

* p<0,05 vs. Sham Controle
 # p<0,05 vs. Sham Paricalcitol
 \$ p<0,05 vs. Sham Calcitriol
 % p<0,05 vs. UNX Paricalcitol

** p<0,01 vs. Sham Controle

Figura 28. Expressão de TGF β em parede aórtica, camadas íntima e média. **(A)** Sham Controle, com mínima expressão. **(B)** UNX Controle com espessamento endotelial e expressão do marcador, que pode também ser observada na camada média. Aumento: 400x

Marcadores para stress oxidativo e VDR

Para a expressão de ET-1 e de eNOS não foi evidenciada diferença estatística entre os grupos estudados, tanto na camada íntima como na camada média da aorta. Da mesma maneira, a expressão de células positivas para VDR também não diferiu estatisticamente entre os grupos estudados. Os resultados encontram-se expostos na tabela 16.

Tabela 16. Expressão de ET-1, eNOS e VDR em aorta, camadas íntima e média. Valores expressos em escore semiquantitativo (0-12) para ET-1 e eNOS e em células positivas/mm² para VDR.

Grupo	ET-1		eNOS		VDR (célis/mm ²)	
	Íntima	Média	Íntima	Média	Íntima	Média
Sham Controle (n=8)	0,35±0,16	0,38±0,27	1,75±0,25	1,85±0,23	0,082±0,035	0,077±0,024
Sham Paricalcitol (n=9)	0,29±0,18	0,38±0,15	1,78±0,21	1,81±0,34	0,06±0,026	0,096±0,054
Sham Calcitriol (n=8)	0,31±0,19	0,45±0,18	1,47±0,29	1,62±0,39	0,07±0,032	0,093±0,038
UNX Controle (n=8)	0,51±0,21	0,38±0,12	1,36±0,26	1,73±0,31	0,041±0,031	0,033±0,015
UNX Paricalcitol (n=8)	0,37±0,17	0,34±0,13	1,71±0,37	1,55±0,35	0,039±0,022	0,042±0,028
UNX Calcitriol (n=9)	0,46±0,18	0,47±0,06	1,32±0,37	1,69±0,41	0,064±0,036	0,053±0,019
p (ANOVA)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Valores expressos em média e desvio padrão

4.5. PCR

Na análise por PCR do tecido cardíaco, a expressão gênica para TGF β foi significativamente mais elevada nos grupos UNX Controle (1,41 $\pm$ 0,12 ratios/GADPH) e UNX Calcitriol (1,42 $\pm$ 0,27 ratios/GADPH) quando comparado ao grupo Sham Paricalcitol (0,75 $\pm$ 0,09 ratios/GADPH). Não foi evidenciada diferença estatística entre os demais grupos estudados. Os resultados encontram-se expostos na figura 29.

Figura 29. Expressão para gene codificador de TGF β em tecido cardíaco nos diferentes grupos

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, o tratamento de 10 semanas de camundongos ApoE^{-/-} uninefrectomizados ora com paricalcitol ou calcitriol foi capaz de prevenir a rarefação na capilarização miocárdica induzida pelo modelo UNX. Além disso, o tratamento com paricalcitol exerceu impacto positivo sobre a prevenção da fibrose miocárdica induzida pelo modelo. Esses efeitos foram independentes de alterações na pressão arterial.

Na aorta, os tratamentos exerceram efeitos distintos, já que o calcitriol promoveu extensas calcificações vasculares também infiltrando as lesões ateroscleróticas, com significativa hipertrofia da camada íntima e presença de células positivas para Runx-2 (cbfa-1). Já o paricalcitol foi capaz de atenuar o remodelamento arterial, sendo que a estrutura das artérias permaneceu semelhante às do modelo sham.

Embora não tenha sido evidenciada diferença estatística entre os grupos quanto à massa corporal ao final do estudo, pôde-se observar que os animais UNX tratados com calcitriol foram os únicos a apresentarem a massa corporal ao final do estudo inferior à inicial. Houve uma diminuição significativa neste parâmetro em relação aos controles na sexta semana, com uma recuperação espontânea nas semanas seguintes. A discreta, porém significativa diferença na massa corpórea encontrada entre os animais Sham e UNX ao final do estudo foi influenciada fundamentalmente pelos animais do grupo UNX Calcitriol. De acordo com dados prévios de nosso grupo de pesquisa, o modelo UNX em camundongos ApoE^{-/-} não foi

capaz de induzir isoladamente a um menor ganho de peso que os Shams, mesmo ao longo de um período de observação mais prolongado.

Uma possível explicação para tal mudança na curva de ganho de peso pode estar relacionada a uma hipercalcemia transitória induzida pelo calcitriol nas primeiras semanas, levando à hipotonia muscular esquelética e diminuição na ingestão alimentar, com uma posterior adaptação dos animais a esta condição ao longo do tratamento, embora não existam dados que comprovem essa hipótese. A própria redução de massa renal do modelo experimental poderia também ter contribuído para uma maior sensibilidade dos animais UNX à dose administrada de calcitriol em comparação aos Shams, por uma diminuição do clearance da droga (Hsu et al., 1991, 1992). Maiores detalhes da aferição do cálcio ionizado serão discutidos adiante.

A pressão arterial não constituiu um fator de confusão no estudo. Apesar das limitações no método de pletismografia de cauda, tais como ausência de monitoramento do ciclo sono-vigília, obtenção exclusiva do valor sistólico e necessidade de aquecimento e restrição dos animais, tanto o modelo experimental quanto os tratamentos empregados não influenciaram a pressão arterial. Como apenas uma porcentagem dos animais tratados apresentou calcificações vasculares significativas com conseqüente enrijecimento da parede arterial, tal influência não exerceu papel significativo no resultado final.

O modelo UNX pode ser considerado apenas como sensibilizador para hipertensão induzida por sobrecarga salina, como mostrado por Carlström e cols. (2007), mas não como indutor da mesma (Buzello et al.,

2003). Em humanos, a simples redução de massa renal pela uninefrectomia ainda é discutida como fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão (Saran et al, 1997, Gosmann et al., 2005).

Os tratamentos com paricalcitol e calcitriol também já foram descritos como indutores de hipertensão em modelo experimental em ratos, porém os achados encontravam-se associados a altas doses dos fármacos que provocaram calcificações vasculares. Em humanos, a infusão de calcitriol na dose de 0,02µg/kg promoveu significativo aumento transitório da pressão arterial em pacientes previamente hipertensos, mas não em controles saudáveis. O mecanismo proposto foi um efeito não-genômico promovendo um aumento agudo na resistência periférica induzido pelo calcitriol, até o presente momento, não elucidado (Jerspersen et al., 1998).

Diferenças na pressão arterial não seriam observadas mesmo com metodologias mais precisas de aferição no presente estudo, por conta de um período de observação não suficientemente longo para um animal UNX em vigência de dieta normossódica. A ativação do VDR exercendo efeito inibitório sobre a produção de renina (Andress D, 2007, Richard et al., 2007) também poderia ser levantada para um possível efeito preventivo da hipertensão em longo prazo, mas, mesmo camundongos com deficiência do VDR, nos quais este efeito é bem mais acentuado, a hipertensão arterial começa a ser detectável somente a partir do 9º mês de observação (Simpson et al., 2007).

Em relação aos valores de bioquímicos, de acordo com dados obtidos do estudo piloto prévio avaliando o tratamento de 4 semanas em

camundongos ApoE ^{-/-} com diferentes doses de paricalcitol e calcitriol, a dose de 0,03µg/kg de calcitriol foi considerada segura para uso, por não alterar significativamente as concentrações de cálcio e fósforo tanto nos animais Sham como nos UNX (dados não apresentados).

Ao final do estudo de 10 semanas de tratamento, o valor numérico da concentração de cálcio ionizado do grupo UNX foi o maior entre todos os grupos, porém, sem diferença estatística em relação aos demais. Vale ressaltar que a coleta de sangue para análise bioquímica realizada em vigência do tratamento farmacológico 5x/semana (e 2 horas após a última dosagem) seria capaz de garantir a detecção de um efeito indutor de hipercalcemia gerado pelo calcitriol (Beer et al., 2001, Bailie & Johnson, 2002). Entretanto, a regulagem do ionômetro Fresenius EH-F[®] utilizada para amostras de tamanho reduzido não é capaz de avaliar a amostra com 100% de precisão. Este potencial fator de erro poderia mascarar uma diferença significativa entre os grupos.

Em relação ao fósforo, porém, os animais tratados com calcitriol apresentaram elevação significativa em relação aos controles. O lote da medicação empregada no estudo real foi o mesmo utilizado para o estudo piloto, assim como as rotinas de preparação. Embora os dados referentes à fosfatúria e recuperação da função tubular após a uninefrectomia ainda sejam conflitantes (Friedlander et al., 1988, Gossmann et al., 2005), uma especulação para esta diferença nos níveis de fosfato sérico encontrada ao final de ambos os experimentos com mesma metodologia seria uma manutenção da fosfatúria elevada após 6 semanas de UNX (2 de

recuperação e 4 de tratamento no estudo piloto). Esta recuperação da função tubular poderia ter ocorrido em 12 semanas (2 de recuperação e 10 de tratamento no presente estudo), ocasionando as diferenças detectadas entre as duas observações. Infelizmente, dados da fosfatúria não foram incluídos no protocolo do estudo.

Mesmo com a relação de dosagem entre paricalcitol e calcitriol correspondente às recomendações da prática clínica (3:1 a 4:1), a dose de 0,1µg/kg de paricalcitol não induziu a alterações nos níveis de cálcio e fósforo em relação aos controles, o que está de acordo com a seletividade de ativação do VDR promovida pelo paricalcitol (Brown et al., 2002, Druecke TB, 2005).

Em relação à depuração de creatinina, os animais UNX apresentaram uma queda média do clearance de 28% quando comparados aos controles, sem uma albuminúria significativa, o que se assemelha aos dados de doadores renais estudados para função renal e albuminúria após a doação. Neste estudo foi revelada uma queda média imediata de filtração glomerular de 25% e uma incidência de albuminúria em 10% dos casos após 10 anos de acompanhamento (Gossmann et al., 2005).

Os tratamentos com paricalcitol e calcitriol também não exerceram qualquer impacto na função renal dos animais.

Para se obter uma diferença significativa na depuração de creatinina entre os grupos individuais e possibilitar a avaliação do impacto dos tratamentos sobre a função renal seria necessário aplicar o modelo de nefrectomia subtotal (nefrectomia 5/6). No estudo piloto realizado no

Laboratório de Patologia Renal avaliando este modelo experimental foi evidenciada uma taxa de mortalidade pós-operatória superior a 20%. O método utilizado foi o de secção de 2/3 do parênquima do rim remanescente, que garante uma remoção mais exata da massa renal, reproduzível em todos os animais. A taxa de mortalidade, contudo, foi considerada acima do limite pelo para o uso de um modelo experimental sem um erro de amostragem em relação aos outros grupos, mesmo em se tratando de uma espécie do tipo isogênica.

No que diz respeito à análise morfológica cardíaca, o modelo UNX promoveu uma redução média de 12% na densidade capilar por comprimento no tecido cardíaco quando comparada aos controles. Tal diferença foi também significativamente atenuada por ambos os tratamentos farmacológicos empregados. Embora o grupo UNX Calcitriol tenha apresentado uma densidade capilar por volume significativamente menor quando comparado ao Sham Controle, esta diferença não foi vista na comparação com os demais grupos Shams. Ademais, a proximidade dos valores de densidade capilar por comprimento apresentados pelos grupos UNX Paricalcitol e UNX Calcitriol revelou que o efeito benéfico de ambos os tratamentos foi semelhante.

O remodelamento miocárdico constitui uma das principais complicações da doença renal crônica e ocorre mesmo em pacientes normotensos (Huting et al., 1988, Amann et al., 1998). No atual estudo, embora não tenha sido evidenciada diferença estatística na relação entre massa cardíaca/massa corpórea entre os grupos, houve uma tendência para

um aumento dessa relação nos animais UNX, especialmente no grupo UNX Controle. Em suma, foram evidenciadas alterações histológicas que presumivelmente precedem à hipertrofia do VE propriamente dita.

As alterações na densidade capilar por comprimento encontradas no estudo não podem ser consideradas como avançadas, já que não foram detectadas através do método estereológico outras alterações significativas nos volumes percentuais dos componentes do tecido cardíaco concomitantes. Em estudos com ratos em modelo de nefrectomia subtotal já foi revelada uma redução na densidade capilar por comprimento da ordem de 25% no tecido cardíaco, acompanhada de um pequeno, mas significativo aumento no volume intersticial (Amann et al., 1992). Os autores deste estudo propõem, contudo, que a redução da capilarização miocárdica na uremia seja isolada, sem necessariamente ocasionar outra alteração estrutural significativa. Apesar dos mecanismos causadores desproporção de capilares pela massa muscular ainda não estarem elucidados, existe evidência suficiente para se acreditar que o déficit na função renal exerce papel fundamental neste fenômeno (Amann et al, 2006).

Mesmo que não tão expressiva, a rarefação significativa encontrada na capilarização miocárdica apenas com o modelo de UNX, na ausência de hipertensão e hipertrofia cardíacas significativas constitui um fator intrigante, já que leva a uma diminuição da interface capilar-miócito, que constitui o parâmetro biológico de maior relevância para o fornecimento de oxigênio ao tecido. Essa condição torna o miocárdio mais susceptível à isquemia, comprometendo o suprimento de oxigênio em situações de demanda

elevada. Extrapolando-se este risco para a prática clínica, tal condição aumenta o risco cardíaco de pacientes com insuficiência renal mesmo sem lesões ateroscleróticas significativas nos grandes vasos.

Da mesma maneira, o impacto positivo dos tratamentos com paricalcitol e calcitriol sobre a capilarização miocárdica evidenciados no presente estudo pode constituir um dos fatores que esclarecem a melhor sobrevida de pacientes urêmicos que recebem tratamento com ativadores do VDR em relação aos controles. Possíveis mecanismos para este efeito residem no efeito anti-proliferativo sobre células musculares de ambas as drogas, além da inibição da produção de renina exercida por ambos os fármacos (Andress D, 2007).

Em amostras de tecido cardíaco obtidas em material de autópsia foi mostrado, que o tecido cardíaco recuperado dos pacientes em hemodiálise apresentou uma redução significativa da capilarização miocárdica, em comparação com controles de pacientes hipertensos com espessura semelhante da parede do VE (Amann et al. 1998). Experimentalmente, foi observado que animais submetidos à nefrectomia subtotal apresentaram áreas infartadas significativamente maiores após a ligadura da artéria coronária esquerda em relação aos controles, um efeito presumivelmente relacionado à diminuição da capilarização miocárdica (Dikow et al., 2004).

Um fator interessante do estudo foi a ausência de comprometimento da capilarização da musculatura esquelética no modelo UNX. Este dado aponta para uma seletividade do acometimento da capilarização cardíaca em um déficit moderado na função renal. Em humanos, porém, em um

estudo avaliando massa e força muscular de pacientes em diálise foi revelado que os indivíduos que recebiam tratamento com paricalcitol ou calcitriol apresentaram parâmetros superiores aos de pacientes sem reposição (Gordon et al., 2007). As causas da diferença de força muscular entre os grupos não foram esclarecidas.

Em se tratando de aterogênese, o modelo de aterosclerose em camundongos ApoE $-/-$ é o primeiro a induzir rapidamente consideráveis alterações ateroscleróticas na ausência de intervenções dietéticas. O modelo de UNX de 12 semanas em camundongos ApoE $-/-$ foi capaz de promover um aumento de diâmetro médio da parede aórtica e da relação entre diâmetro da parede/diâmetro luminal, secundário ao agravamento destas lesões, o que está de acordo com achados prévios, que associam redução da massa renal ao aumento de lesões ateroscleróticas (Buzello et al., 2003, Ivanovski et al., 2005).

No presente estudo não houve diferença estatística na a incidência de placas ateroscleróticas entre os grupos, mas sim na relação entre as camadas íntima e média, o que leva-nos a concluir que o modelo UNX e o tratamento com calcitriol promoveram um aumento das placas pré-existentes, mas não o surgimento de novas placas. Não foi detectada diferença estatística na área das placas entre os grupos, o que se deve à grande variabilidade nas placas ateroscleróticas em todos os grupos. Há de se reconhecer, porém, que os métodos para avaliação de placas ateroscleróticas empregado não foi do tipo “en face”, que constitui o padrão ouro para este tipo de análise. Foi priorizada uma análise morfológica dos

anéis, avaliando-se preferencialmente uma relação entre parede e lúmen em cortes seriados.

Possivelmente diante do volume das placas ateroscleróticas houve um aumento da relação entre íntima e média do grupo Sham Calcitriol, cujo diâmetro total do vaso não foi elevado. Em todos os casos o percentual ocupado pela camada íntima foi baixo (inferior a 10% do valor da média), o que revela que o processo de aterosclerose na aorta, embora presente, não se encontra demasiadamente avançado no modelo. Isso poderia ser alcançado através de um período de observação mais prolongado.

Espessamento e calcificações arteriais promovem um aumento da rigidez arterial com conseqüente aumento de sobrecarga cardíaca levando a um maior risco cardiovascular. O espessamento da parede da aorta nos animais UNX Calcitriol foi semelhante ao dos UNX Controle, o que se deveu fundamentalmente à deposição mineral na camada média e às placas ateroscleróticas. Já no grupo UNX Paricalcitol tal fenômeno não ocorreu de forma significativa, sendo que o diâmetro da parede aórtica foi semelhante ao dos controles.

Apesar de não ter havido comprovação de hipercalcemia nos grupos Sham Calcitriol e UNX Calcitriol, os níveis de fósforo e o produto cálcio fósforo estavam elevados nestes grupos, os quais apresentaram significativas calcificações vasculares concomitantes, tanto na camada média, como nas lesões ateroscleróticas. A presença de células positivas para Runx-2 com a formação de calcificações em placas ateroscleróticas até

agora não havia sido documentada em modelo experimental e merece especial atenção, já que placas ateroscleróticas calcificadas estão associadas a um maior risco cardiovascular (Jeziorska et al., 1998) .

Os processos que levam à calcificação de células musculares lisas é multifatorial e ainda não está completamente elucidado. No presente estudo, o achado do aumento de expressão do marcador Runx-2 (cbfa-1) está de acordo com o postulado de que células musculares lisas quando imersas em um meio rico em fósforo, que conduz ao aumento da concentração de fósforo intracelular, sofrem transdiferenciação para o fenótipo osteoblástico (Jono et al., 2000). Outras propriedades apresentadas por estas células em cultura são a expressão de fosfatase alcalina, produção de osteocalcina, osteopontina e deposição de matriz extracelular rica em colágeno, especialmente do tipo I (Giachelli et al., 2001, Jono et al, 2000). Além do fósforo intracelular, outros fatores ainda não identificados promovem a expressão de Runx-2 em células musculares, como evidenciado por Moe e cols. (2003), através da incubação das células com soro diluído de pacientes urêmicos. Neste estudo, embora o fator hiperfosfatemia tenha sido descartado como desencadeante para a transdiferenciação celular, o principal fator de confusão descrito no soro obtido dos pacientes urêmicos como possível gerador do fenótipo osteoblástico foi o calcitriol.

Em modelos experimentais *in vivo*, porém, até o momento não foi relatada a presença de um aumento de células positivas para Runx-2 nos vasos induzido pela hiperfosfatemia isolada. Da mesma maneira ainda não foram descritos modelos experimentais que mostraram a presença de

calcificações vasculares induzidas por calcitriol sem a presença de hiperfosfatemia, ou de um elevado produto cálcio x fósforo concomitantes. Assim como o estudo experimental de Mizobushi e cols. (2007), com dosagem considerada baixa calcitriol, o presente estudo não conseguiu isolar completamente o efeito do calcitriol sobre a calcificação vascular ativa da hiperfosfatemia.

O fato dos animais tratados com Paricalcitol não terem apresentado calcificações vasculares significativas nem expressão significativa de células positivas para Runx-2 não pode ser associado somente a diferenças no produto cálcio e fósforo, já que os grupos Sham Paricalcitol e Sham Calcitriol apresentaram valores numericamente semelhantes dos marcadores. Em cultura de células já foi revelado que as curvas de incorporação de cálcio de células musculares lisas vasculares em concentrações crescentes de ambos os fármacos é distinta, fenômeno explicado por uma relação de expressão de proteínas pró e anti-calcificação (RANKL/Osteoprotegerina) mais elevada apresentada pelo calcitriol (Cárdus et al., 2007). Neste mesmo estudo foi mostrado em ratos que o tratamento com paricalcitol exerceu efeitos significativamente menores sobre na calcificação vascular do que o calcitriol, sendo que ambos os grupos apresentaram elevações semelhantes do produto cálcio x fósforo.

Em conjunto com os dados de literatura, os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a ativação do seletiva do VDR pelo paricalcitol promove calcificações vasculares menos acentuadas que a

ativação não-seletiva do VDR pelo calcitriol, independentemente do produto cálcio x fósforo.

Em relação ao depósito de matriz extracelular nos tecidos, o colágeno fibrilar é o principal componente da matriz de sustentação para os cardiomiócitos e para os vasos do miocárdio. Ele é composto fundamentalmente pelos colágenos do tipo I e III, detectados na coloração de vermelho Sirius e exibe uma grande força tensional que exerce um importante papel nas propriedades mecânicas do ventrículo durante o ciclo cardíaco, impedindo inclusive a deformação do músculo cardíaco (de Souza RR, 2002). Um aumento da expressão de colágeno fibrilar, porém, leva a um aumento da rigidez passiva e diminuição da elasticidade cardíaca levando à disfunção diastólica (Janicki JS, 1992). O pequeno, porém significativo aumento de expressão de colágenos I e III nos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol em relação aos shams indica uma situação de lesão cardíaca inicial nesses grupos, aparentemente prevenida pelo paricalcitol.

Na camada média da aorta, o perfil de expressão de colágeno I e III foi semelhante ao do coração, com exceção feita ao grupo Sham Calcitriol, cuja expressão foi semelhante à dos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol. O principal fator contributivo para esse perfil foi a calcificação vascular, que promove o remodelamento da parede arterial com produção inicial de colágeno do tipo I (Simonescu et al. 2007). Além disso, a expressão de colágeno também reflete a presença do TGF β , que promove a produção de colágenos I e III em células musculares lisas da parede arterial (Majesky et al., 1991).

A fibronectina, proteína componente da matriz extracelular encontrada fundamentalmente em processos de reparação aguda, também costuma estar aumentada em situações de fibrose miocárdica. No caso do presente estudo, como a expressão de colágeno foi em geral pouco acentuada, não se detectou um reflexo na diferença de expressão de fibronectina por imuno-histoquímica. Além disso, não foram detectadas áreas de lesões cardíacas agudas nos grupos estudados, o que implicaria uma expressão mais elevada deste marcador.

No tecido cardíaco, o colágeno IV funciona como proteína de ligação entre o miócito e a matriz extracelular, exercendo papel menos claro na patogênese do no remodelamento miocárdico. No presente estudo a expressão mais elevada de colágeno IV nos grupos UNX controle, UNX Paricalcitol e UNX Calcitriol seguiu a tendência de expressão dos colágenos I e III, embora na coloração de vermelho Sirius não tenha sido evidenciado uma diferença estatística na expressão do marcador entre os grupos UNX Paricalcitol e os shams.

Na aorta, a expressão de colágeno IV praticamente refletiu o grau de espessamento arterial apresentado nos diferentes grupos. Embora o colágeno IV tenha sido descrito como fator de inibição para calcificações vasculares (Andress D, 2007), a expressão significativamente mais elevada do marcador no grupo UNX Calcitriol em relação aos controles não foi suficiente para impedir o aparecimento das mesmas.

TGF β é uma citocina multifuncional envolvida na regulação de processos de proliferação, diferenciação, migração e sobrevida de diferentes

tipos celulares (Roberts e Sporn, 1993). Acredita-se que o TGF β seja um importante gatilho para a fibrogênese no coração hipertrofiado, já que estimula a deposição de colágeno na matriz extracelular (Ignotz RA e Massague J). Experimentalmente foi revelado que o bloqueio do sinal do TGF β é capaz de prevenir o depósito de matriz extracelular em diferentes tecidos (Border et al, 1994). Em humanos foi documentada uma expressão 2,5x maior no coração hipertrofiado quando comparada ao controle em biópsias de miocárdio (Li et al., 2002).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com esta observação, já que a expressão de mRNA para TGF β foi significativamente maior nos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol que no grupo Sham Paricalcitol, fenômeno que se refletiu na deposição de matriz colágena.

Na vasculatura o TGF β exerce efeito sobre a proliferação, diferenciação, adesão celular e depósito de matriz extracelular. Expressão elevada de TGF β foi evidenciada experimentalmente em lesões vasculares estando associadas à reparação vascular, mas também ao espessamento intimal com o aumento de matriz extracelular (Majesky et al., 1991). No presente estudo, a expressão de TGF β esteve aumentada tanto na camada íntima como na camada média das artérias dos animais UNX Controle e UNX Calcitriol em relação a todos os outros grupos, exceção feita ao Sham Calcitriol na camada íntima. Isto reflete uma situação dinâmica de lesão secundária ao modelo UNX ou às calcificações vasculares com concomitante reparação vascular mediada por TGF β . Esta reparação, quando crônica, leva a um excessivo depósito de matriz extracelular.

A influência in vivo da ativação do VDR sobre a expressão de TGF β foi melhor documentada em estudos de progressão de nefropatias (Tan et al., 2006, Mizobuchi et al., 2007). Em estudo de lesão renal por obstrução, o tratamento com paricalcitol esteve associado a uma menor expressão de TGF β e do receptor para TGF β além de uma diminuição no acúmulo de matriz extracelular. De acordo com o estudo de Yanagisawa (1999), o TGF β e o VDR compartilham a mesma via de sinalização, conhecida por Smad e podem atuar de maneira sinérgica ou antagônica a depender do tecido estudado.

No caso do tecido cardíaco, as ações anti-inflamatórias da ativação do VDR foram possivelmente suplantadas pelo efeito da calcificação vascular pró-fibrótico, o que ocasionou a expressão mais elevada do TGF β no grupo UNX Calcitriol, que foi semelhante à do UNX Controle. Já no caso dos animais tratados com paricalcitol, a expressão de TGF β foi semelhante à do grupo Sham Controle.

A expressão de ET-1 mais elevada em células intersticiais e endoteliais cardíacas nos grupos UNX Controle em relação aos Sham Controle e Sham Paricalcitol está de acordo com achados prévios de literatura, que propõem um papel importante deste potente vasoconstritor na patogenia do remodelamento miocárdico e na diminuição da relação capilar-miócito na insuficiência renal experimental (Nabokov et al., 1999).

Foi mostrado em células em cultura que o tratamento com calcitriol induziu a uma diminuição na hipertrofia cardíaca induzida pela endotelina, além de diminuir a expressão de receptores para o marcador em

osteoblastos (Wu et al., 1996, Nambi et al., 1995). No presente estudo, a expressão de ET-1 foi significativamente mais elevada nos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol quando comparada à do grupo Sham Controle, o que não ocorreu com o grupo UNX Paricalcitol. Possivelmente a existência de calcificações vasculares e em órgãos sólidos (19% no grupo UNX Calcitriol, dados não apresentados) neste grupo foi responsável pela manutenção da expressão elevada do marcador, como mostrado por Çamsari e cols. (2003) em pacientes com calcificação valvar mitral. Este fato também explica a expressão elevada de ET-1 nos animais Sham Calcitriol (com calcificações em partes moles em 12,5% dos animais), cujo valor numérico foi próximo ao dos animais UNX. Em estudo observando os efeitos do calcitriol sobre a pressão arterial em humanos foi revelado que a infusão de calcitriol não exerceu qualquer efeito sobre os níveis séricos de ET-1 (Jespersen et al, 1998).

Na aorta, a expressão de ET-1 já foi identificada como um importante fator na gênese de lesões ateroscleróticas, inclusive em estudo com modelo ApoE -/- em vigência de dieta rica em lipídeos (Maguire et al., 2006). No presente estudo, porém, não foi possível detectar através de imuno-histoquímica diferenças significativas na expressão do marcador induzida pelo modelo. Houve sim tendências para uma maior expressão na camada média nos grupos UNX Calcitriol e Sham Calcitriol, por conta de calcificações vasculares e, na camada íntima, nos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol por conta de lesões ateroscleróticas.

Dentre as três isoformas de NO sintase e seus papéis controversos no remodelamento miocárdico, a eNOS é mais bem classificada como cardioprotetora por atuar positivamente em lesões induzidas por diferentes modelos experimentais (Massion et al., 2007). Nosso estudo não foi capaz de detectar diferença na expressão de eNOS induzidas pela UNX ou pelos tratamentos no tecido cardíaco ou nas aortas através da imuno-histoquímica, ao contrário do que já foi observado por Tatematsu e cols. em modelo de UNX e nefrectomia subtotal em cães. Vale ressaltar que neste estudo a diminuição da taxa de filtração glomerular com a UNX foi de 50% e que a queda na expressão de eNOS foi somente comprovada por PCR no grupo com nefrectomia subtotal em relação aos controles. O mecanismo fisiopatológico proposto para a queda de expressão de eNOS em artérias coronárias em vigência de déficit de função renal foi a supressão da enzima por níveis elevados de dimetilarginina assimétrica (ADMA).

Até o momento não foram publicados estudos sobre os efeitos da ativação do VDR sobre marcadores de stress oxidativo no coração.

Em concordância com os achados prévios da literatura, a expressão de CaSR foi evidenciada no presente estudo em cardiomiócitos na parede vascular no tecido cardíaco (Wang et al., 2003). Ao contrário do que se observaria na paratireóide, a expressão de CaSR no tecido cardíaco não foi afetada pela UNX (Kifor et al., 1996). Da mesma maneira, também não foi observado aumento significativo na expressão do CaSR após os tratamentos com paricalcitol e calcitriol, embora já tenham sido evidenciados VDREs

funcionais no CaSR, o que justificaria uma ação promotora da ativação do VDR sobre a síntese do CaSR (Canaff e Hendy, 2002).

A relação inversa entre expressão do VDR e uremia já foi estabelecida na paratireóide (Fukuda et al, 1993). A expressão de VDR já foi evidenciada em miócitos cardíacos tanto em roedores (O'Connel et al, 1997) como em humanos (Wu et al., 1996), sendo que as ações do calcitriol descritas sobre os miócitos cardíacos são de inibição de maturação e de deposição de miosina. Seguindo a mesma linha de raciocínio, camundongos deficientes no VDR apresentaram hipertrofia cardíaca (Simpson et al, 2007), acompanhado por diminuição da área miofibrilar, aumento do espaço extracelular e aumento do colágeno miocárdico. No presente estudo, os animais UNX apresentaram uma expressão do VDR numericamente inferior aos Shams, porém sem diferença estatística, fenômeno que se repetiu nas aortas. Os tratamentos farmacológicos também não exerceram impacto sobre a expressão do VDR nos órgãos estudados. Uma investigação por outras metodologias poderia auxiliar na resposta desta questão.

6. RESUMO

1. Os tratamentos de 10 semanas com paricalcitol (0,1 μ g/kg) e calcitriol (0,03 μ g/kg) preveniram diminuição da capilarização miocárdica induzida pela UNX
2. Tanto o modelo UNX como os tratamentos farmacológicos empregados não exerceram influência sobre a pressão arterial
3. Não foram evidenciadas alterações na capilarização da musculatura esquelética induzidas pelo modelo de UNX ou pelos tratamentos empregados
4. O tratamento com paricalcitol exerceu efeito benéfico sobre o acúmulo de matriz colágena no tecido cardíaco, possivelmente por conta de uma menor expressão de endotelina-1 e TGF β . Na aorta, o tratamento com paricalcitol esteve associado a uma menor expressão de TGF β em relação aos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol.
5. Não foi comprovada influência do modelo experimental ou dos tratamentos sobre a expressão de CaSR ou VDR tanto no tecido cardíaco como na aorta
6. O tratamento de dez semanas com calcitriol na dosagem de 0,03 μ g/kg induziu a importantes calcificações vasculares, tanto na camada média como na camada íntima arterial, com o aparecimento de células positivas para Runx-2 (cbfa1)
7. Não foi possível isolar o efeito pró-calcificação exercido pelo tratamento com calcitriol do elevado produto cálcio-fósforo apresentado pelo grupo

7. CONCLUSÕES

1. Os tratamentos com paricalcitol na dose de 0,1µg/kg 5x/semana e com calcitriol na dose de 0,03µg/kg 5x/semana mostraram-se capazes de prevenir a diminuição da capilarização miocárdica induzida pelo modelo de uninefrectomia em camundongos ApoE -/-
2. O tratamento com calcitriol na dose mencionada promoveu expressivas calcificações vasculares nas camadas íntima e média, que provocaram alterações na arquitetura vascular. As calcificações foram marcadas pela presença de células positivas para Runx-2
3. O tratamento com paricalcitol mostrou-se mais seguro que o tratamento com calcitriol por prevenir as alterações cardiovasculares no modelo de UNX em camundongos ApoE -/-, sem induzir tais efeitos colaterais

8. REFERÊNCIAS

- Amann K, Breitbach M, Ritz E, Mall G. Myocyte/capillary mismatch in the heart of uremic patients. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9: 1018-22.
- Amann K, Münter K, Wessels S, Wagner J, Balajew V, Hergenröder S, Mall G, Ritz E. Endothelin A receptor blockade prevents capillary/myocyte mismatch in the heart of uremic animals. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11: 1702-11.
- Amann K, Tornig J, Kugel B, Gross ML, Tyralla K, El-Shakmak A, Szabo A, Ritz E. Hyperphosphatemia aggravates cardiac fibrosis and microvascular disease in experimental uremia. *Kidney Int*. 2003; 63: 1296-01.
- Amann K, Wanner C, Ritz E. Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2112-19.
- Amann K, Wiest G, Zimmer G, Gretz N, Ritz E, Mall G. Reduced capillary density in the myocardium of uremic rats: A stereological study. *Kidney Int*. 1992; 42: 1079-85.
- Anavekar NS, McMurray JJ, Velazquez EJ, Solomon SD, Kober L, Rouleau JL, White HD, Nordlander R, Maggioni A, Dickstein K, Zelenkofske S, Leimberger JD, Califf RM, Pfeffer MA. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2004; 351 (13): 1285-95.
- Anderson KM, Odell PM, Wilson PWF, Kannel WB. Cardiovascular disease risk profiles. *Am Heart J*. 1991; 121: 293-98.
- Andress D. Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation. *Drugs*. 2007; 67; 1999-12.
- Bailie GR, Johnson CA. Comparative review of the pharmacokinetics of vitamin D analogues. *Semin Dial*. 2002; 15: 352-57.
- Beer TM, Munar M, Henner WD. A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation. *Cancer*. 2001; 91: 2431-39.
- Blacher J, Guerin AP, Pannier P, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001; 38: 938-42.
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-92.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

- Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999; 277: F157-75.
- Brown AJ, Finch J, Slatopolsky E. Differential effects of 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D(2) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on intestinal calcium and phosphate transport. *J Lab Clin Med*. 2002; 139: 279-84.
- Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, McCracken R, Morrissey J, Slatopolsky E. Rat calcium-sensing receptor is regulated by Vit D, but not by calcium. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 1996; 270: F454-60.
- Brown EM. Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiological Reviews* 1991; 71: 371-11.
- Brown EM. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Am J Med*. 1999;106: 238-53.
- Buzello M, Törnig J, Faulhaber J, Ehmke H, Ritz E, Amann K. The Apolipoprotein E Knockout Mouse: A Model Documenting Accelerated Atherogenesis. In Uremia *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:311-16.
- Çamsari A, Pekdemir H, Çiçek D, Katircibasi T, Parmaksiz T, Doven O, Cin VG. Endothelin-1 and nitric oxide levels in patients with mitral annulus calcification. *Jpn Heart J*. 2004; 45: 487-95.
- Canaff L, Hendy GN. Human calcium sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem*. 2002; 277: 30337-50.
- Cardús A, Parisi E, Callego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int*. 2006; 69(8):1377-84.
- Cardús A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res*. 2007; 22: 860-66.
- Carlström M, Sällström J, Skøtt O, Larsson E, Persson AE. Uninephrectomy in young age or chronic salt loading causes salt-sensitive hypertension in adult rats. *Hypertension*. 2007; 49: 1342-50.
- Coburn JW, Salusky IB. Hyperparathyroidism in renal failure. In: The Parathyroids. Bilezikian JP, Levine MA and Marcus R, eds. 1994: 721-45.
- Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH and St-Arnaud R. Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin d(3)-1(alfa)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology*. 2001; 142: 3135-41.

- de Barros Gueiros JE, Chammas MC, Gerhard R, da Silva Dias Boilesen CFD, de Oliveira IRS, Moysés RMA, Jorgetti V. Percutaneous ethanol (PEIT) and calcitriol (PCIT) injection therapy are ineffective in treating severe secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transpl.* 2004; 19: 657-63.
- de Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology.* 2002; 3: 325-35.
- Delesse MA. Procède mécanique pour déterminer la composition des roches. *Compt Rend Acad Sci.* 1847; 25: 544-45.
- Desai K, Bruckdorfer R, Hutton R, Owen J. Binding of apo-E rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *Journal of Lipid Research.* 1989; 30: 831-40.
- Dikow R, Kihm LP, Zeier M, Kapitza J, Törnig J, Amann K, Tiefenbacher C, Ritz E. Increased infarct size in uremic rats: reduced ischemia tolerance? *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 1530-36.
- Dobrez DG, Mathes A, Amdahl M, Marx SE, Melnick JZ, Sprague SM. Paricalcitol-treated patients experience improved hospitalization outcomes compared with calcitriol-treated patients in real-world clinical settings. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19(5): 1174-81.
- Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, Shah PK, Rajavashisth TB. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocr Rev.* 2004; 25: 629-72.
- Doherty TM, Tang W, Dascalos S, Watson KE, Demer LL, Shavelle RM, Detrano RC. Ethnic Origin and Serum Levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Are Independent Predictors of Coronary Calcium Mass Measured by Electron-Beam Computed Tomography. *Circulation* 1997; 96: 1477-81.
- Drüeke TB, McCarron DA. Paricalcitol as compared with calcitriol in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2003; 349: 496-99 Revisão.
- Drüeke TB: Which vitamin D derivative to prescribe for renal patients. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005; 14: 343-49. Revisão.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: F8-28. Revisão.
- Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia* 1988; 31: 16-23.
- Fajtova VT, Sayegh MH, Hickey N, Aliabadi P, Lazarus JM, LeBoff MS. Intact parathyroid hormone levels in renal insufficiency. *Calcif. Tissue Int* 57; 1995: 329-35.
- Farzaneh-Far A, Weissberg PL, Proudfoot D, Shanahan CM. Transcriptional regulation of matrix gla protein. *Z Kardiol.* 2001; 3: 38-42.

- Fleckenstein A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1977; 17: 149-66.
- Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension.* 2007;49: 1063-69.
- Fried LP, Kronmal RA, Newman AB, Bild DE, Mittelmark MB, Polak JF, Robbins JA, Gardin JM. Risk factor for 5-year mortality in older adults: The cardiovascular Health Study. *JAMA.* 1998 279; 585-92.
- Friedlander MA, Lemke JH, Horst RL. The effect of uninephrectomy on mineral metabolism in normal human kidney donors. *Am J Kidney Dis.* 1988; 11: 393-01.
- Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1436-43.
- Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Sharon T, Port FK. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2131-38.
- Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38: S34-37.
- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1296-05.
- Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovannini M, Goureau Y, Sarfati E, Drüeke TB. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 1997; 51: 328-36.
- Goodman WG, Godlin J, Kulzon BD, Yoon C, Gales B, Silder D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 2000; 342(20): 1478-83.
- Gordon PL, Sakkas GK, Doyle JW, Shubert T, Johansen KL. Relationship between vitamin D and muscle size and strength in patients on hemodialysis. *J Ren Nutr.* 2007; 17: 397-07.
- Gossmann J, Wilhelm A, Kachel HG, Jordan J, Sann U, Geiger H, Kramer W, Scheuermann EH. Long-term consequences of live kidney donation follow-up in 93% of living kidney donors in a single transplant center. *Am J Transplant.* 2005; 5: 2417-24.

- Hendy GN, Stotland MA, Grundbaum D, Fraher LJ, Loveridge N, Goltzman D. Characteristics of secondary hyperparathyroidism in vitamin D-deficient dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1989; 256: E756-72.
- Hirata M, Katsumata K, Endo K, Fukushima N, Ohkawa H, Fukagawa M. In subtotaly nephrectomized rats 22-oxacalcitriol suppresses parathyroid hormone with less risk of cardiovascular calcification or deterioration of residual renal function than 1,25(OH)₂ Vitamin D₃. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 1770-76.
- Holden RM and Booth SL. Vascular calcification in chronic kidney disease: the role of vitamin k. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007; 3: 522-23.
- Hsu CH, Patel S, Buchsbaum BL. Calcitriol metabolism in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1991; 17: 185-90.
- Hsu CH, Patel SR, Vanholder R. Mechanism of decreased intestinal calcitriol receptor concentration in renal failure. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1993; 264: F662-69.
- Hsu CH, Patel SR, Young EW, Vanholder R. Mechanism of decrease calcitriol degradation in renal failure. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1992; 262: F192-98.
- Hüting J, Kramer W, Schütterle G, Wizemann V. Analysis of left-ventricular changes associated with chronic hemodialysis. A noninvasive follow-up study. *Nephron.* 1988; 49: 284-90.
- Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1986; 261: 4337-45.
- Ivanovski O, Szumilak D, Nguyen-Khoa T, Ruellan N, Phan O, Lacour B, Descamps-Latscha B, Drüeke TB, Massy ZA. The antioxidant N-acetylcysteine prevents accelerated atherosclerosis in uremic apolipoprotein E knockout mice. *Kidney Int.* 2005; 67: 2288-94.
- Issa LL, Leong GM, Sutherland RL, Eisman JA. Vitamin D analogue-specific recruitment of vitamin D receptor coactivators. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(5): 879-90.
- Janicki JS. Myocardial collagen remodeling and left ventricular diastolic function. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25: 975-82.
- Jespersen B, Randløv A, Abrahamsen J, Fogh-Andersen N, Olsen NV, Kanstrup IL. Acute cardiovascular effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1998; 11: 659-66.
- Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE. Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: associations with mast cells and macrophages. *J Pathol.* 1998; 185(1): 10-17.

- Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 1998; 98(13): 1302-06.
- Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000; 87: E10-17.
- Kifor O, Moore FD Jr, Wang P, Goldstein M, Vassilev P, Kifor I, Hebert SC, Brown EM. Reduced immunostaining for the extracellular Ca²⁺-sensing receptor in primary and uremic secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 1598-06.
- Koh E, Morimoto S, Nabata T, Takamoto S, Kitano S, Ogihara T. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the syntheses of DNA and glycosaminoglycans by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Life Sci*. 1990; 46: 1545-51.
- Kroustrup JP, Gundersen HJ. Estimate the number of complex particles using the ConnEulor principle. *J Microsc*. 2001; 203: 314-20.
- Lamawansa MD, Wysocki SJ, House AK, Norman PE. Vitamin D3 exacerbates intimal hyperplasia in balloon-injured arteries. *Br J Surg*. 1996; 83: 1101-03.
- Levey AS, Beto JA, Coronado BE, Eknoyan G, Foley RN, Kasiske BL, Klag MJ, Mailloux LU, Manske CL, Meyer KB, Parfrey PS, Pfeffer MA, Wenger NK, Wilson PW, Wright JT Jr. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: What do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis*. 1998; 32: 853-06.
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic kidney disease :Evaluation, classification, and signification. *Ann Inter Med*. 2003; 139: 137-47.
- Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL. 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. *Kidney Int*. 2007; 71: 31-8.
- Li G, Borger MA, Williams WG, Weisel RD, Mickle DA, Wigle ED, Li RK. Regional overexpression of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta1 in the myocardium of patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002; 123: 89-95.
- Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 9831-35.

- Llach F and Massry SG. On the mechanism of secondary hyperparathyroid in moderate renal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985; 61: 601-6.
- London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage-renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 1731-40.
- Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A, Klag MJ. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population. The CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1918-27.
- Maguire JJ, Wiley KE, Kuc RE, Stoneman VE, Bennett MR, Davenport AP. Endothelin-mediated vasoconstriction in early atherosclerosis is markedly increased in ApoE^{-/-} mouse but prevented by atorvastatin. *Exp Biol Med.* 2006; 231: 806-12.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988; 240: 622-30.
- Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy MA. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest.* 1991; 88: 904-10.
- Malberti F, Marcelli D, Feruccio C, Limido A, Spotti D, Locatelli F. Parathyroidectomy in patients on renal replacement therapy: an epidemiologic study. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1242-48.
- Martinez I, Saracho R, Montenegro J, Llach F. The importance of dietary calcium and phosphorous in the secondary hyperparathyroidism of patients with early renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29: 496-02.
- Massion PB, Balligand JL. Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling. *Curr Heart Fail Rep.* 2007; 4: 18-25.
- Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc.* 1990; 159: 301-17.
- McGonigle RJ, Fowler MB, Timmis AB, Weston MJ, Parsons V. Uremic cardiomyopathy: potential role of vitamin D and parathyroid hormone. *Nephron.* 1984; 36: 94-100.
- Merke J, Hoffmann W, Goldschmidt D, Ritz E. Demonstration of 1,25(OH)₂ vit D₃ receptors and actions in vascular smooth muscle cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1987; 41: 112-4.
- Merke J, Milde P, Lewicka S, Hugel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E. Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest.* 1989; 83: 1903-15.

- Milliner DS, Zinsmeister AR, Liebermann E, Landing B. Soft tissue calcification in pediatric patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 1990; 38: 931-6.
- Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* 2007; 72: 709-15.
- Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, Akizawa T, Slatopolsky E. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 1796-806.
- Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int.* 2003; 63: 1003-11.
- Moe SM, O'Neil KD, Reslerova M, Fineberg N, Persohn S, Meyer CA. Natural history of vascular calcification in dialysis and transplant patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19: 2387-93.
- Mönckeberg JG. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Archiv Jg.* 1903: 141-67.
- Nabokov AV, Amann K, Wessels S, Munter K, Wagner J, Ritz E. Endothelin receptor antagonists influence cardiovascular morphology in uremic rats. *Kidney Int.* 1999; 55: 512-9.
- Nambi P, Wu HL, Lipshutz D, Prabhakar U. Identification and characterization of endothelin receptors on rat osteoblastic osteosarcoma cells: down-regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Pharmacol.* 1995; 47: 266-71.
- Naveh-Many T and Silver J. Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1313-9.
- Nemeth EF and Scapa A. Cytosolic Ca^{2+} and the regulation of secretion in parathyroid cells. *FEBS Lett.* 1986; 203: 15-9.
- Nemeth EF and Scapa A. Rapid mobilization of cellular Ca^{2+} in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations: evidence for a cell surface calcium receptor. *J Biol Chem.* 1987; 262: 5188-96.
- Nemeth EF. Calcium receptors as novel drug targets. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 1996: 1019-35.
- Neves KR, Graciolli FG, dos Reis LM, Graciolli RG, Neves CL, 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.

- O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997; 272: H1751-8.
- Oh J, Wunsch R, Turzer M, Bahner M, Raggi P, Querfeld U, Mehs O, Schaefer F. Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure. *Circulation* 2002; 106: 100-5.
- Parfitt AM, Massry SG, Winfield AC, DePalma JR, Gordon A. Disordered calcium and phosphorus metabolism during maintenance hemodialysis. Correlation of clinical, roentgenographic and biochemical changes. *Am J Med.* 1971; 51: 319-30.
- Park CW, Oh YS, Shin YS, Kim CM, Kim YS, Kim SY, Choi EJ, Chang YS, Bang BK. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis.* 1999; 33: 73-81.
- Peleg S, Posner GH. Vitamin D Analogs as Modulators of Vitamin D Receptor Action. *Curr Top Med Chem.* 2003; 3: 1555-72.
- Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Nat Acad Sci.* 199; 289: 4471-75.
- Quarles LD, Yohay DA, Carroll BA, Spritzer CE, Minda SA, Bartholomay D, Lobaugh BA. Prospective trial of pulse oral versus intravenous calcitriol treatment of hyperparathyroidism in ESRD. *Kidney Int.* 1994; 45: 1710-21.
- Rasanen-Sokolowski AK, Pakkala IS, Samila SP, Binderup L, Hayry PJ, Pakkala ST. A vitamin D analog, MC1288, inhibits adventitial inflammation and suppresses intimal lesions in rat aortic allografts. *Transplantation* 1997; 63: 936-41.
- Rajasree S, Umashankar PR, Lal AV, Sarma PS, Kartha CC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sci.* 2002; 70: 1777-88.
- Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med.* 1989; 320: 980-91.
- Richard T, Li Y, Staessen JA. Renal versus extrarenal activation of vitamin D in relation to atherosclerosis, arterial stiffening and hypertension. *Am J Hypertens.* 2007; 20: 1007-15.
- Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA, Brown AJ. Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int.* 2001; 60: 1737-44.
- Ritz E, Kuster S, Schmidt-Gayk H, Stein G, Scholz C, Kraatz G, Heidland A. Low-dose calcitriol prevents the rise in 1,84-iPTH without affecting serum calcium and phosphatase in patients with moderate renal failure (prospective placebo-controlled multicentre trial). *Nephrol Dial Transplant.* 1995; 10: 2228-34.

- Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*. 1993; 8: 1-9.
- Saran R, Marshall SM, Madsen R, Keavey P, Tapson JS. Long-term follow-up of kidney donors: a longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12: 1615-21.
- Sarnak MJ, Coronado B E, Greene T, Wang SR, Kusek JW, Beck GJ, Levey AS. Cardiovascular disease risk factor in chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol*. 2002; 57: 327-35.
- Schwaiger JP, Neyer U, Sprenger-Mähr H, Kollerits B, Mündle M, Längle M, Kronenberg F. A simple score predicts future cardiovascular events in an inception cohort of dialysis patients. *Kidney Int*. 2006; 70: 543-48.
- Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Möncklenberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 1999; 100: 2168-76.
- Simionescu A, Simionescu DT, Vyavahare NR. Osteogenic responses in fibroblasts activated by elastin degradation products and transforming growth factor-beta1: role of myofibroblasts in vascular calcification. *Am J Pathol*. 2007; 171: 116-23.
- Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007; 103: 521-24.
- Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ. Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *J Clin Invest*. 1984; 74: 2136-43.
- Somjen D, Kohen F, Amir-Zaltsman Y, Knoll E, Stern N. Vitamin F analogs modulate the action of gonadal steroids in human vascular cells in vitro. *Am J Hypertens*. 2000; 13: 396-403.
- Somjen D, Kohen F, Gayer B, Knoll E, Limor R, Baz M, Sharon O, Posner GH, Stern N. A non-calcemic Vitamin D analog modulates both nuclear and putative membranal estrogen receptors in cultured human vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89-90: 397-9.
- Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Batlle D. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2003; 63: 1483-90.
- Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, Quarles LD. Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 2116-24.
- Szabo A, Merke J, Beier E, Mall G, Ritz E. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ inhibits parathyroid cell proliferation in experimental uremia. *Kidney Int*. 1989; 35: 1049-56.

- Takahashi H, Shimazawa E, Horiuchi N, Suda T, Yamashita K, Ogata E. An estimation of the parathyroid hormone secretion rate in vitamin D deficient rats. *Horm Metab Res.* 1978; 10: 161-7.
- Tatematsu S, Wakino S, Kanda T, Homura K, Yoshioka K, Hasegawa K, Sugano N, Kimoto M, Takao S, Hayashi K. Role of nitric oxide-producing and -degrading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 741-9.
- Tan X, Lin Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 3382-93.
- Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med.* 2003; 349: 446-56.
- United States Renal Data System (USRDS) - 2006 annual data report: morbidity and mortality in ESRD.
- Wakasugi M, Noguchi T, Inoue M, Kazama Y, Tawata M, Kanemaru Y, Onaya T. Vitamin D₃ stimulates the production of prostacyclin by vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins.* 1991; 42: 127-36.
- Wang R, Xu C, Zhao W, Zhang J, Cao K, Yang B, Wu L. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 2680-88.
- Weibel ER. Practical Methods for Biological Morphometry. *em* Stereological Methods, vol 1. Academic Press 1979; Londres. pp. 283-84.
- Weishaar RE, Kim SN, Saunders DE, Simpson RU. Involvement of vitamin D₃ with cardiovascular function. III. Effects on physical and morphological properties. *Am J Physiol.* 1990; 258: E134-42.
- Weishaar RE, Simpson RU. Vitamin D₃ and cardiovascular function in rats. *J Clin Invest.* 1987; 79: 1706-12.
- Wiese RJ, Uhland-Smith A, Ross TK, Pahl JM, DeLuca HF. Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *J Biol Chem.* 1992; 267: 20082-6.
- Wolisi GO, Moe SM. The role of Vitamin D in vascular calcification in CKD. *Semin Dial.* 2005; 18: 307-14. Revisão.
- Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 97: 1996; 1577-88.

- Wu-Wong JR, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE: Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2006; 186: 20-8.
- Wu-Wong JR, Tian J, Nakane M, Ma J, Fey TA, Kroeger P, Fryer RM, Reinhart GA. Cardiovascular disease in chronic kidney failure: the role of VDR activators. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006; 7: 206-13. Revisão.
- Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, Suzawa M, Watanabe M, Kashiwagi K, Toriyabe T, Kawabata M, Miyazono K, Kato S. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*. 1999; 283(5406): 1317-21.
- Yamamoto T, Kozawa O, Tanabe K, Akamatsu S, Matsuno H, Dohi S, Hirose H, Uematsu T. 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Arch Biochem Biophys*. 2002; 398:1-6.
- Yano S, Sugimoto T, Tsukamoto T, Tsukamoto T, Hattori T, Hattori S, Chihara K. Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2000; 58: 1980-6.
- Young E, Satayathum S, Pisoni R, Locatelli F, Canaud B, Kurokawa K, Akiba T, Saito A, Mapes D, and Port F. Prevalence of values on mineral metabolism being made outside the targets from the proposed new draft NKF-K/DOQI and European Best Practice Guidelines in countries of the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS) (Abstract). *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18, Suppl 4: 677.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992; 258: 468-71.
- Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18: 41-6.
- Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Koerfer R, Stehle P. Low vitamin D status: A contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 105-12.
- Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: An epidemiologic perspective. *Kidney Int*. 2006; 70(1): 26-33.