Daniella Guimarães Batista

**Dieta com sobrecarga de cálcio e fósforo leva a diminuição do
volume ósseo de ratos urêmicos**

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

Programa de: Nefrologia

Orientadora: Dr^a. Vanda Jorgetti

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Batista, Daniella Guimarães

Dieta com sobrecarga de cálcio e fósforo leva a diminuição do volume ósseo de
ratos urêmicos / Daniella Guimarães Batista. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Falência renal crônica 3.Hiperfosfatemia
4.Hipercalcemia 5.Hormônio paratireóideo 6.Osteodistrofia renal 7.Apoptose
8.Calcificação vascular

USP/FM/DBD-478/10

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2º ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Resumo

Batista DG. Dieta com sobrecarga de cálcio e fósforo leva a diminuição do volume ósseo de ratos urêmicos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 44p.

As alterações do metabolismo mineral ocorrem precocemente nos pacientes com doença renal e podem interferir na formação, reabsorção e mineralização óssea comprometendo a integridade do esqueleto. Recentemente demonstramos que animais com sobrecarga de fósforo desenvolvem lesões ósseas semelhantes à osteoporose. O controle da hiperfosfatemia se faz com restrição de fósforo na dieta, e com o uso de quelantes. Um dos quelantes mais utilizados são os sais de cálcio. Estudos demonstraram que o uso desses quelantes favorece a progressão de calcificações arteriais nos pacientes com doença renal crônica. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito isolado do cálcio e do cálcio/fósforo no tecido ósseo e cardiovascular de ratos urêmicos submetidos a nefrectomia 5/6 (Nx) e paratireoidectomia (PTX), variando o conteúdo de cálcio e de cálcio/fósforo na dieta desses animais. Os níveis de paratormônio (PTH) foram restaurados com implante de mini-bombas osmóticas para infusão do 1-34 PTH de rato na dose de 0.022 µg/100 g/h (fisiológica), ou de veículo (2% cisteína). Imediatamente após a Nefrectomia ou Sham Nx, os animais foram divididos em grupos de acordo com a dieta que continha Ca/P: 0,7%(Grupo Sham), Ca 1,2% (Grupo Nx RCa) e Ca/P: 1,2%/1,2% (Grupo Nx RCa/P). Após 2 meses, os animais foram sacrificados e foram realizadas as análises bioquímicas e histomorfométricas. Os animais nefrectomizados desenvolveram doença renal moderada, elevação da pressão arterial, assim como hiperfosfatemia, enquanto que apenas os animais Nx RCa/P cursaram com hipocalcemia. A infusão de 1-34 PTH foi efetiva, e os animais Nx RCa/P cursaram com elevação do FGF 23 e diminuição do calcitriol. Os animais que ingeriram dieta RCa e RCa/P apresentaram diminuição do volume trabecular (BV/TV), com diminuição dos parâmetros de formação (OS/BS e Ob.S/BS). Os animais que ingeriram dieta rica em cálcio e em cálcio/fósforo apresentaram maior apoptose de osteoblastos. A expressão gênica da TRAP foi maior nos animais Nx. Não detectamos calcificação vascular no tecido cardíaco e aorta dos animais. Em conclusão a sobrecarga de cálcio e de cálcio/fósforo associada à infusão fisiológica de PTH levam a diminuição do volume ósseo de animais urêmicos, conseqüente ao aumento da apoptose dos osteoblastos levando menor formação óssea; assim como maior atividade dos osteoclastos avaliada pela TRAP e não promoveu calcificação vascular nestes animais. O modelo animal que utilizamos reflete condições clínicas encontradas em pacientes com DRC.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Falência renal crônica 3.Hiperfosfatemia 4.Hipercalcemia 5.Hormônio paratireóideo 6.Osteodistrofia renal 7.Apoptose 8.Calcificação vascular

Summary

Batista DG. Dietary overload of calcium and phosphorus is associated with low trabecular volume in uremic rats. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 44p

Bone and mineral metabolism disturbances occur early in patients with chronic kidney disease (CKD) and may interfere in bone formation, resorption or mineralization, compromising skeletal integrity. We previously have shown that phosphate (P) overload in uremic rats leads to decreased bone volume. In the clinical setting, the therapy for hyperphosphatemia includes dietary P restriction, as well as P binders, including calcium (Ca) salts. Previous studies have shown that Ca-based P binders favor the progression of vascular calcification in CKD patients. The current study evaluated the isolated effect of Ca or Ca and P overload on bone and cardiovascular tissues from uremic rats that were submitted to 5/6 nephrectomy (Nx) and parathyroidectomy (PTx), manipulating the Ca and P content in their diets. Parathormone (PTH) serum levels were kept in a normal range using miniosmotic pumps delivering rat 1-34 PTH or using vehicle. After Nx, animals were divided into three groups according to the diet: 0.7% Ca, 0.7% P (Sham Group); 1.2% Ca, 0.7% P (Nx HCa Group) and 1.2% Ca, 1.2% P (Nx HCa/P Group). After two months, animals were killed and biochemical and histomorphometric analyses were performed. Nx animals developed moderate CKD, arterial hypertension, as well as hyperphosphatemia, whereas only Nx HCa/P animals showed hypocalcemia. Osmotic infusion of PTH was effective, as confirmed by serum PTH levels. Nx HCa/P animals showed elevated serum FGF 23, as well as decreased serum calcitriol. Animals that were submitted to Ca or Ca/P overload showed decrease trabecular volume and a reduction in bone formation parameters, such as osteoid and osteoblastic surfaces. A significant increase in osteoblast apoptosis was seen in Nx HCa and Nx HCa/P Groups. The TRAP expression was higher in Nx animals. We could not observe vascular calcification in these animals. In conclusion, Ca or Ca/P overload associated with physiologic PTH infusion was associated with lower bone volume in uremic animals, explained by a increased osteoblastic apoptosis leads to decreased bone formation, and increased osteoclastic activity assessed by TRAP. This model resembles clinical conditions that are commonly observed in CKD patients.

Descriptors: 1.Wistar Rats 2. Kidney failure chronic 3.Hyperphosphatemia 4.Hypercalcemia 5.Parathyroid hormone 6.Renal Osteodystrophy 7.Apoptosis 8.Vascular calcification

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações gerais.....	1
1.2	Metabolismo do cálcio	4
1.3	Metabolismo do fósforo	7
2	OBJETIVOS.....	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	Modelo experimental	11
3.2	Avaliação bioquímica	13
3.3	Avaliação histológica do tecido ósseo.....	14
3.4	Descalcificação de tecido ósseo com EDTA tamponado	15
3.5	Detecção de apoptose	16
3.6	Quantificação de células apoptóticas.....	17
3.7	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	18
3.8	Avaliação histológica: histologia cardiovascular.....	19
3.9	Comissão de ética.....	20
3.10	Análise estatística	20
4	RESULTADOS	21
4.1	Dados gerais e análise bioquímica	21
4.2	Avaliação histomorfométrica do tecido ósseo	22
4.3	Quantificação da apoptose.....	26
4.4	Análise da expressão gênica relativa do Colágeno tipo I e da TRAP no tecido ósseo.....	28
4.5	Análise histológica qualitativa cardiovascular	29
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÕES.....	35
7	ANEXOS	36
8	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A doença renal crônica (DRC) afeta aproximadamente de 5 a 10% da população geral, constituindo um grave problema de saúde pública mundial devido a sua elevada morbidade e mortalidade além de grande impacto econômico pelos altos custos com seu tratamento¹. Em 2000 cerca de 400 mil pessoas eram tratadas por terapias de substituição renal (transplantes e diálise) nos Estados Unidos². Em 2030, estima-se que este número aumente para dois milhões de pessoas³.

Com o declínio da função renal ocorrem várias alterações no organismo como anemia, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, alterações neurológicas e do metabolismo mineral. Quanto ao metabolismo mineral a perda de função renal leva a alterações séricas e teciduais do cálcio (Ca), do fósforo (P), elevação dos níveis de paratormônio (PTH), do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF-23) e diminuição dos níveis de 1,25-(OH) vitamina D (calcitriol).

Até recentemente osteodistrofia renal (OR) era o termo empregado para descrever as manifestações clínicas, alterações laboratoriais e ósseas decorrente dos distúrbios do metabolismo mineral na DRC. Atualmente, é usado somente para definir as lesões ósseas⁴. Uma vez que esses distúrbios comprometem o tecido ósseo, contribuem para o desenvolvimento de calcificações vasculares, de doenças cardiovasculares e

conseqüentemente aumento da mortalidade dos pacientes acometidos⁵. Recentemente foi proposto o termo distúrbio mineral da doença renal crônica (DMO-DRC) para descrever essa síndrome¹.

A DRC leva a retenção de fósforo (P), que por sua vez diminui a concentração de cálcio (Ca) sérico com conseqüente elevação dos níveis de PTH. O PTH atua, através do seu receptor, no tecido ósseo aumentando a atividade dos osteoblastos e indiretamente dos osteoclastos, nos rins inibindo a reabsorção renal de fósforo e estimulando a síntese de calcitriol. Essas ações tem por finalidade aumentar os níveis séricos de Ca e reduzir os de P. A retenção de P também eleva o FGF-23 produzido principalmente pelos osteoblastos e osteócitos, fator esse que se liga ao seu receptor e com auxílio de um co-fator a proteína Klotho, inibe a reabsorção renal de fósforo, reduz a atividade da 1 α -hidroxilase diminuindo os níveis de calcitriol, e nas paratireóides diminui a secreção de PTH. Esse aumento do FGF-23 contribui para reduzir os níveis séricos de P e também do calcitriol o que pode resultar em hipocalcemia.⁶ A perda de função renal por se diminui a produção de calcitriol, o que favorece menor absorção intestinal de cálcio e fósforo gerando hipocalcemia e novo estímulo para secreção de PTH. Todos esses mecanismos adaptativos visam manter a homeostase do Ca e P o mais próximo do normal pelo maior tempo possível durante a evolução da DRC.

No entanto, essas adaptações podem nas paratireóides promover hiperplasia; e no tecido ósseo (principal reservatório de Ca e P) podem levar a quadros assintomáticos até lesões graves e incapacitantes, como deformidades ósseas e fraturas^{7,8}.

O melhor método para diagnóstico das lesões ósseas é a biópsia óssea. A quantificação das estruturas ósseas (histomorfometria) permite analisar a remodelação, a mineralização (nos pacientes que recebem agentes fluorescentes como a tetraciclina), o volume e a micro arquitetura do tecido ósseo. Um dos parâmetros dessa análise, a taxa de formação óssea, é usada para classificar as lesões em doença de alta ou baixa remodelação^{9,10}.

A doença de baixa remodelação caracteriza-se por taxa de formação óssea reduzida, diminuição do número de osteoblastos e osteoclastos e ausência de fibrose na medula óssea. Quando esse quadro associa-se com aumento da matriz osteóide, recebe o nome de osteomalácia (OM) e quando essa matriz está dentro da normalidade é conhecida como doença adinâmica (DOA)³.

A doença de alta remodelação compreende o hiperparatireoidismo secundário (HPT) e a doença mista (DM). O HPT caracteriza-se por aumento do número de osteoblastos e osteoclastos, da formação e reabsorção óssea assim como fibrose na medula, essas lesões são conhecidas como osteíte fibrosa (OF). Já a DM possui características de HPT e da OM³.

Estima-se que 60% dos pacientes com DRC em hemodiálise desenvolvem doença de alta remodelação e 30% de baixa remodelação o restante dos pacientes apresentam remodelação óssea normal ou discretamente comprometida¹.

1.2 Metabolismo do cálcio

O cálcio é o cátion divalente com maior concentração no organismo representando 1 a 2% do peso corporal total. Aproximadamente 99% do cálcio encontram-se nos ossos, principalmente na forma de cristais de hidroxiapatita, e 1% nos compartimentos intra e extracelular. No compartimento intracelular a concentração de cálcio é cerca de 1000 vezes menor do que no extracelular, criando um gradiente transmembrana que favorece a entrada de cálcio na célula. Mecanismos de extrusão de cálcio usam canais e bombas dependentes da energia do ATP, e que são fundamentais para manter a integridade celular e evitar sua morte¹¹.

No tecido ósseo, o cálcio é responsável pela integridade estrutural além de funcionar como reserva, podendo ser rapidamente mobilizado para o meio extracelular suprimindo assim, as necessidades dos diversos sistemas biológicos. Esta fração cambiável representa aproximadamente 1% do cálcio presente no esqueleto. No fluído extracelular e no citosol, os íons cálcio são vitais na manutenção e no controle de inúmeros processos fisiológicos. Uma de suas funções é a manutenção da estrutura e integridade das membranas celulares. Além disto, atua na cascata da coagulação é importante para a excitabilidade nervosa e contração muscular. O cálcio também é importante para múltiplas reações enzimáticas e, como segundo mensageiro participa da regulação e liberação de proteínas e de hormônios¹².

A homeostase do Ca depende da integração entre intestino, esqueleto e rins bem como da ação de hormônios como o paratormônio (PTH), seu receptor (PTHr), a 1,25(OH)₂D e seu receptor (VDR). Participam

também o receptor de Ca (CaR). Dependendo da concentração de cálcio sérico os receptores de Ca são estimulados ou suprimidos^{13, 14}. Esta regulação tem por objetivo manter a concentração do cálcio extracelular constante quanto e dessa forma proteger o organismo contra deficiência ou sobrecarga desse elemento. A diminuição do Ca sérico inativa o CaR nas células paratireóideanas aumentando a secreção de PTH que atua via seu receptor, nos rins aumenta a reabsorção tubular de Ca e no esqueleto aumenta a reabsorção óssea. O aumento do PTH também estimula a produção 1,25(OH)₂D nos rins e esse hormônio interagindo com seus receptores nos enterócitos, aumenta a absorção de Ca¹⁵.

Normalmente a dieta é a principal fonte de cálcio particularmente durante a adolescência, período em que se atinge o pico de massa óssea. A suplementação de Ca nos idosos previne a perda de massa óssea¹⁶, sendo usada na prevenção da osteoporose relacionada com a idade.

Ao longo da vida ocorrem mudanças na remodelação óssea com ganho ou perda de massa óssea. Assim as crianças estão em balanço positivo (formação > reabsorção) o que assegura o crescimento saudável do esqueleto. Já os adultos jovens têm balanço neutro (formação = reabsorção) atingindo o pico de massa óssea. Enquanto nos indivíduos idosos o balanço é negativo (formação < reabsorção), o que acarreta a perda de massa óssea. Nos adultos fatores como: exercícios, o uso de drogas anabólicas e anti-reabsortivas assim como condições especiais que promovam maior formação do que reabsorção óssea (exemplo síndrome da fome óssea) favorece o aumento da densidade mineral óssea. Por outro lado

imobilização, perda de peso, distúrbios gonadais (levando a deficiências de esteróides sexuais) produzem diminuição da mesma¹³.

Tanto a hipocalcemia como a hipercalcemia não refletem o balanço de Ca dos indivíduos. Causas de hipocalcemia incluem: baixa ingestão de Ca, deficiência crônica de vitamina D, osteomalácia, raquitismo, produção inapropriada de 1,25(OH)2D e síndrome da fome óssea pós paratireoidectomia¹⁷. Enquanto que causas de hipercalcemia incluem: uso exagerado de calcitriol, sarcoidose, hiperparatireoidismo, metástases, doença adinâmica e uso de diuréticos tiazídicos¹⁸.

Apesar de muitos pacientes em hemodiálise cursarem com hipocalcemia a grande maioria apresenta balanço positivo de cálcio^{19, 20}. Nestes indivíduos, além da dieta, os quelantes de fósforo a base de cálcio, o cálcio do dialisato e a remodelação óssea contribuem para esse balanço positivo uma vez que a maioria dos pacientes tem pouca ou nenhuma função renal residual.

A sobrecarga de cálcio é um dos fatores de risco para calcificação vascular²¹. Estudos clínicos demonstraram que o uso de quelantes de fósforo contendo cálcio aumentou a progressão de calcificação da aorta e das artérias coronarianas em pacientes prevalentes e incidentes em diálise^{22, 23}.

Na DRC a suplementação de cálcio deve ser analisada individualmente. Sabe-se que nas crianças em crescimento essa suplementação pode corrigir o balanço negativo desse elemento, assim

como em algumas mulheres na menopausa e em idosos. Contudo em pacientes onde o balanço é neutro ou até positivo a suplementação com Ca pode afetar negativamente a remodelação óssea e promover calcificação vascular²⁴.

1.3 Metabolismo do fósforo

O fósforo representa 1% do peso corporal total sendo o sexto elemento do organismo, onde se encontra principalmente na forma de fosfato. Quanto a sua distribuição corporal, cerca de 85% do P está no esqueleto, 15% no compartimento intracelular e 0,1% no extracelular¹⁰.

No compartimento intracelular o P está presente na forma inorgânica, ou como componente dos carboidratos, ácidos nucleicos, lípidos, enzimas, fatores de transcrição, entre outros. O P participa de inúmeras reações bioquímicas incluindo transmissão de impulsos nervosos, conservação e transferência de energia derivadas do ATP e atividades enzimáticas. Também é um componente dos fosfolípidos das membranas celulares, importante na regulação da função, e integridade das membranas^{10,25}.

A homeostase do P também depende da integração intestino, esqueleto e rins e da ação dos hormônios PTH e 1,25(OH)D. A absorção do P é pouco controlada sendo a dieta a principal fonte desse elemento. Vale lembrar que dietas ricas em P são absorvidas cerca de duas vezes mais eficientemente que uma dieta rica em Ca¹³.

Um adulto normal ingere cerca de 1400mg de P por dia quantidade que, nos pacientes com DRC em hemodiálise leva a um balanço positivo uma vez que a remoção de P pela diálise varia de 240 a 600 mg por sessão²⁶. Para diminuir a positividade desse balanço os pacientes precisam diminuir a ingestão de P e usar quelantes. Dessa forma cerca de 70% dos pacientes em hemodiálise apresentam retenção de fósforo e hiperfosfatemia²⁷.

Níveis elevados de fósforo estão associados com maior mortalidade tanto nos pacientes em diálise²⁸ como na população geral²⁹. A hiperfosfatemia também está associada com calcificação vascular¹⁹.

O excesso de fósforo é deletério para o tecido ósseo tanto de pacientes com DRC como para indivíduos com função renal normal³⁰.

McGartland et al. avaliando adolescentes normais demonstraram que aqueles que ingeriram dieta com alto teor de P tinham diminuição da DMO e maior risco de fraturas³¹. Recentemente Kemi et al. estudando mulheres jovens e saudáveis, tratadas com diferentes suplementações de P, demonstram elevação do PTH, e diminuição do cálcio iônico proporcional a carga de P ingerida, além de diminuição dos marcadores de formação e aumento dos marcadores de reabsorção óssea³².

Estudos em animais também mostram as alterações deletérias do P no tecido ósseo.

Recentemente, demonstramos que animais nefrectomizados e paratireoidectomizados recebendo infusão de PTH em dose fisiológica e

suprafisiológica, submetidos a dieta com elevada concentração de P (1,2%) cursaram com diminuição do volume ósseo. Este efeito foi mais pronunciado nos animais que receberam PTH em concentrações fisiológicas. Nesse estudo a sobrecarga de P também induziu hiperfosfatemia, hipocalcemia e mudanças na microarquitetura óssea. A infusão de PTH em doses suprafisiológicas minimizou o efeito osteopênico do P. Esses resultados demonstram a necessidade do controle adequado do P assim como do ajuste nos níveis de PTH, para que a remodelação óssea seja adequada³³.

Nos últimos anos, a compreensão dos mecanismos envolvidos nos distúrbios do metabolismo mineral e na doença óssea dos pacientes com DRC evoluiu significativamente. Entretanto, avaliar isoladamente os efeitos sistêmicos de um determinado distúrbio é difícil, uma vez que mudanças mínimas nas concentrações séricas do Ca e/ou do P desencadeiam rapidamente mecanismos compensatórios que restabelecem suas concentrações normais à custa, por exemplo, da elevação de PTH e do FGF-23.

No nosso laboratório desenvolvemos um modelo no qual, ratos foram submetidos à insuficiência renal pela técnica de nefrectomia 5/6, as paratireóides foram cauterizadas e a função paratireoideana restabelecida com mini-bomba osmótica que liberava dose constante e fixa de PTH. Esse modelo permitiu avaliar o efeito isolado de diferentes concentrações de fósforo na dieta e também de PTH no tecido ósseo e cardiovascular³³.

2 OBJETIVOS

Gerais:

Avaliar os efeitos da dieta rica em Ca e em Ca/P no tecido ósseo, e cardiovascular de animais urêmicos, mantidos com infusão fixa de PTH.

Específicos:

Avaliar os efeitos da dieta rica em Ca e em Ca/P no tecido ósseo de animais urêmicos, mantidos com infusão fixa de PTH através de histomorfometria, detecção de apoptose e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) .

Avaliar os efeitos da dieta rica em Ca e em Ca/P no tecido cardiovascular de animais urêmicos, mantidos com infusão fixa de PTH através da histologia do tecido cardíaco e aorta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

Utilizamos 24 ratos machos da raça Wistar, obtidos do Biotério Central da FMUSP com peso inicial entre 243 a 380g. Esses animais foram colocados em gaiolas individuais no biotério do LIM-16, com controle de iluminação (12 horas de luz e 12 horas de escuro), temperatura (25°C) e umidade (25%). Inicialmente oferecemos dieta controle (Harlan-Teklad, Madison, EUA), que continha 0,7% de fósforo, 0,7% de cálcio e 24% de proteína na quantidade de 15 a 20 g/dia. O acesso à água foi *ad libitum*.

Após um período de adaptação os animais foram divididos em três grupos, descritos a seguir:

- **G1:** Sham DC- Dieta Controle (**N=8**)
- **G2:** Nx RCa - Dieta rica em cálcio (**N=8**)
- **G3:** Nx RCa/P - Dieta rica em cálcio e fósforo (**N=8**)

Os animais dos grupos 2 e 3 foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg) por via intraperitoneal (ip) e submetidos à paratireoidectomia (PTX) utilizando-se técnica de micro-cirurgia (lupa cirúrgica para eletrocauterização). Após a PTX, os animais foram deixados em recuperação por uma semana e receberam dieta controle adotando-se o protocolo de *pair-*

feeding (15 a 20 g/dia), onde a quantidade de ração oferecida a cada par de animais era determinada pelo animal do par que ingeriu menos ração.

Após esse período, os animais foram novamente anestesiados, e imediatamente antes da realização da nefrectomia 5/6 (Nx), colhemos amostra de sangue total através de punção caudal, para a determinação imediata do cálcio iônico (Analisador de eletrólitos AVL-9140). Quando o cálcio sérico estava abaixo de 7,2 mg/dL, os animais eram considerados adequadamente paratireoidectomizados, sendo então submetidos à Nx 5/6. Essa etapa consistia na nefrectomia do rim direito seguida da ligadura de 2 a 3 ramos da artéria renal esquerda. Simultaneamente à Nx, a atividade do PTH era restaurada através do implante de uma minibomba osmótica (Alzet modelo: 2mL₄, Alza Corp. Palo Alto, EUA) colocada na região subcutânea inter-escapular, que liberava PTH sintético de rato, fragmento 1-34, na dose de 0,022/100g/h (Grupos 2 e 3). Essa concentração de PTH é considerada fisiológica³⁴.

No 28º dia a mini-bomba foi substituída por uma nova mantendo-se as mesmas taxas de infusão da bomba anterior. Esse implante foi realizado com o animal levemente anestesiado com éter. A troca foi necessária, pois a vida útil de cada mini bomba era de 28 dias.

Os animais do Grupo 1 foram submetidos à Sham PTX e à Sham Nx (controles Sham) incluindo o implante de mini bomba osmótica contendo veículo (cisteína à 2% em solução salina, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Imediatamente após a Nx os animais foram alimentados com dietas (Harlan-Teklad, Madison, EUA) idênticas em composição, com exceção do conteúdo de cálcio e fósforo. Dieta com elevado teor de cálcio (RCa), ou seja, 1,2% de Ca e com elevado teor de Ca/P (RCa/P) (1,2%/1,2%). O conteúdo calórico, assim como de vitamina D e proteína (24%) foram semelhantes. Avaliamos o peso dos animais três vezes por semana. Utilizamos a tetraciclina como marcador ósseo, a qual foi injetada via ip (na dose de 25mg/Kg) nos dias 12 e 11 assim como nos dias 5 e 4 antes do sacrifício. Findo o período do experimento (8 semanas), os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg) ip e sacrificados por punção aórtica. O soro foi armazenado a -80° C para dosagens bioquímicas.

3.2 Avaliação bioquímica

Analizamos a concentração de: Ca iônico (Auto Analyzer AVL), fósforo (método colorimétrico Labtest-Lagoa Santa, MG/BR), Creatinina (Cr, método colorimétrico Heinegard-Tiderstrom modificado), PTH (*rat* PTH IRMA *kit* - Immutopics San Clemente, CA/EUA), FGF-23 (ensaio ELISA do fornecedor Kainos Tokyo, Japão) e calcitriol (radioimunoensaio *kit*-Diasorin, Minnesota.USA).

Como a eletrocauterização das paratireóides poderia afetar a função tireoideana dos animais, analisamos em um grupo piloto, os níveis séricos de T₄ (tiroxina) empregando um kit imunoradiométrico – DPC (Los Angeles, Califórnia). Os resultados revelaram que esse hormônio encontrava-se

dentro de concentrações normais. Os resultados não são apresentados neste estudo.

3.3 Avaliação histológica do tecido ósseo

Retiramos os fêmures esquerdos e direitos, que foram fixados em álcool a 70% e processados conforme protocolo descrito anteriormente³⁵. Utilizando-se um micrótomo Polycut S (Leika, Alemanha), obtivemos cortes de 5 µm e 10 µm de espessura da porção distal dos fêmures. As secções de 5 µm foram coradas com azul de toluidina a 0,1% (pH=6,4), sendo que no mínimo 2 cortes não consecutivos foram examinados para cada amostra.

Os parâmetros estáticos, estruturais e dinâmicos de formação e reabsorção óssea foram analisados na metáfise distal (aumento 250x), a 195µm da cartilagem de crescimento. Um total de 30 campos foi quantificado, utilizando-se do *software* semi-automático de análise de imagens Osteomeasure (Osteometrics, Inc., Atlanta, EUA).

Os índices histomorfométricos estáticos incluíram o volume ósseo trabecular (BV/TV) expressos em percentagem, assim como a espessura osteóide (O.Th), em µm. A percentagem de superfície trabecular total foi usada para expressar as áreas de superfície de reabsorção (ES/BS) e da superfície osteóide (OS/BS). A superfície osteoblástica (Ob.S/BS) e a superfície osteoclástica (Oc.S/BS) foram expressas em % em relação a superfície trabecular total. A espessura trabecular (Tb.Th) e a separação trabecular (Tb.Sp) foram expressas em µm. O número de trabéculas (Tb.N)

foi expresso em número por milímetros. A taxa de aposição mineral (MAR) foi determinada a partir da distância entre duas marcações de tetraciclina, dividida pelo intervalo de tempo entre as duas administrações, sendo expressa em $\mu\text{m/d}$. O intervalo de mineralização (Mlt) foi expresso em dias. A percentagem de superfície com duplas marcações de tetraciclina do total da superfície trabecular (MS/BS) e a taxa de formação óssea (BFR/BS) completaram a análise dinâmica. Os índices histomorfométricos foram apresentados segundo a nomenclatura recomendada pela *American Society of Bone and Mineral Research* - ASBMR³⁶.

3.4 Descalcificação de tecido ósseo com EDTA tamponado

A tíbia esquerda de cada animal foi retirada, liberada dos músculos, colocada em solução fisiológica gelada e fixada em formaldeído neutro tamponado-NBF (30 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 45 mM de NaHPO_4 e 3,7 % de formaldeído) a 4°C *overnight*. Após esse período os segmentos foram lavados com tampão fosfato salina gelado – PBS (136,9 mM de NaCl , 2,68 mM de KCl , 8 mM de Na_2HPO_4 , 1,46 mM de KH_2PO_4 , pH 7,2 – 7,4) e colocados em EDTA (Etilenodiaminotetra acetato dissódico) tamponado (390mM de EDTA em tampão fosfato salina) por aproximadamente 4 semanas a 4°C . Os segmentos permaneceram sob agitação contínua e o tampão foi trocado semanalmente. Após esse período, os segmentos ósseos foram incluídos em parafina. Dos blocos obtivemos cortes histológicos de $3\mu\text{m}$ colocados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxy Silano (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

3.5 Detecção de apoptose

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

Esta técnica consiste na marcação da extremidade 3'OH de oligonucleotídeos originados da fragmentação do DNA durante o processo de morte celular. Os fragmentos de DNA são submetidos à polimerização pela enzima terminal transferase, que acrescenta nucleotídeos marcados com uma molécula de digoxigenina. Esta é reconhecida por um anticorpo marcado com a enzima peroxidase, que é revelada com diaminobenzidina (DAB) detectada pela sua cor marrom. A técnica é descrita a seguir.

Inicialmente retiramos a parafina dos cortes histológicos, que foram então tratados com proteinase K (20 µg/ml, *Sigma-Aldrich, EUA*) durante 15 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente. A seguir, realizamos o bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio (3%, *MERCK, Darmstadt, Alemanha*) em PBS, durante 30 minutos. Em seguida, o excesso do bloqueio foi retirado e acrescentado solução de equilíbrio, por aproximadamente 1 minuto.

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

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

As laminas foram lavadas (4 vezes) em PBS e em seguida, revelamos a enzima com DAB. Essa revelação foi acompanhada no microscópio e interrompida por volta de 10 minutos com tampão. Finalmente, as lâminas foram contra - coradas com verde de metila a 0,5% (*MERCK, Darmstadt, Alemanha*) e montadas com gelatina glicerizada. As células positivas apresentam cor marrom/acastanhado e correspondem às células em apoptose.

3.6 Quantificação de células apoptóticas

Empregamos o método de contagem de pontos para calcular o número de células apoptóticas (osteoblastos e osteócitos) nas corticais e trabéculas. Analisamos 30 campos consecutivos, com aumento de 1.000x e ocular graticulada de 144 pontos. O resultado foi expresso como porcentagem de células apoptóticas³⁷. A análise foi realizada por observador que desconhecia a qual grupo pertencia cada animal.

As fotografias foram realizadas com o programa *NIS – Elements F: Advanced solutions for your imaging World* (Nikon, Japão) acoplado ao microscópio Nikon – Eclipse 50i.

3.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Para a análise da expressão gênica, as tíbias de ratos foram cuidadosamente dissecadas sobre uma placa fria, para que o RNA do tecido ósseo fosse preservado, a medula foi retirada por rápida centrifugação e a tíbia imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. Posteriormente, essas tíbias foram brevemente ultracongeladas em nitrogênio líquido e trituradas com pilão e cadinho de aço, livres de RNase. O pó resultante foi então rapidamente homogeneizado em 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e o RNA total foi extraído segundo as instruções do fabricante. O RNA total foi analisado e quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000* (Thermo-Fisher, Waltham, EUA). A transcrição reversa de 1 µg de RNA total em DNA complementar (cDNA) foi feita em termociclador *DNA Engine* (Biorad, EUA) por protocolo do kit da enzima *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega, Madison, EUA).

O cDNA transcrito foi utilizado para a avaliação da expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos genes: GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), usado como controle interno, col-I (colágeno tipo I) e TRAP (*tartrate resistant acid phosphatase*). Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, USA) e pela IDT (IDT, Coralville, EUA), dissolvidos em água grau de PCR, a uma concentração de 100 µM e mantidos congelados a -20°C. Para cada reação de PCR, os *primers* são diluídos a 10 µM, a partir da solução estoque, com água grau de PCR. A sequência dos *primers* a serem utilizados é mostrada na Tabela 1.

O valor relativo à amplificação do mRNA referente a cada gene estudado foi avaliado através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador e detector *Rotor Gene 6000* (Qiagen, Hilden, Alemanha). As reações foram preparadas com diferentes volumes de *primers* e cDNA, dependendo do gene avaliado, sempre totalizando 25 µL. As condições das reações foram as seguintes: 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, (Temp. anelamento de cada gene, em °C) por 60 segundos, 72°C por 30 segundos, e uma etapa final de 72°C por 60 segundos. Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados com o controle interno e os resultados da quantificação relativa da expressão gênica foram determinados pelo método de $\Delta\Delta Ct$, como previamente descrito por Livak *et al.*³⁸, e expressos em “vezes de indução” (*fold-induction*).

3.8 Avaliação histológica: histologia cardiovascular

O coração foi retirado em solução salina, pesado e seccionado para fixação e inclusão em parafina. Secções transversais do coração com espessura de 4µm foram coradas pela coloração de von Kossa para análise de calcificação. A análise histológica qualitativa foi realizada por patologista sem conhecimento dos grupos.

3.9 Comissão de ética

O projeto foi desenvolvido em acordo com as normas éticas da FMUSP e previamente autorizado pela comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPESQ) sob N° de protocolo: 748/04 (Anexo A).

3.10 Análise estatística

Os dados são apresentados em média $\pm$ erro padrão. A comparação entre os grupos foi feita usando método de *ANOVA one way*, com pós- teste de Neuman-Keuls. Quando necessário, utilizou-se o teste t de Student, com correção de Welch. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Utilizamos o software Prism versão 4 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Dados gerais e análise bioquímica

Não houve diferença entre os pesos iniciais e finais dos animais. Os animais Nx (RCa e RCa/P) evoluíram com elevação da pressão arterial (PA) em relação ao grupo Sham ($p < 0,0001$).

Como esperado, todos os animais submetidos à Nx apresentaram elevação da creatinina sérica ($p < 0,0001$).

Os animais que ingeriram dieta rica em Ca/P apresentaram hipocalcemia ($p < 0,05$) e hiperfosfatemia ($p < 0,05$). Os animais que ingeriram dieta rica em Ca também cursaram com hiperfosfatemia ($p < 0,05$).

A reposição de PTH 1-34 foi efetiva, e o nível sérico do hormônio proporcional às concentrações infundidas.

Embora os animais que receberam dieta RCa/P cursarem com níveis elevados de FGF-23 e níveis diminuídos de calcitriol, não houve diferença significativa nestes parâmetros entre os animais dos diferentes grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados gerais e parâmetros bioquímicos

	Sham DC	Nx RCa	Nx RCa/P
Peso inicial (g)	323,1 ± 13,9	336,8 ± 15,7	335,5 ± 9,9
Peso final (g)	373,0 ± 16,9	379,3 ± 13,9	340,0 ± 12,51
PA (mmHg)	121,9 ± 5,9*	169,3 ± 3,2	169,9 ± 6,4
Cr (mg/dL)	0,40 ± 0,02*	0,8 ± 0,05	0,8 ± 0,04
Cai (mmol/L)	1,13 ± 0,06	1,0 ± 0,07	0,78 ± 0,04 ^β
P (mg/L)	6,48 ± 0,34*	8,7 ± 0,3	9,3 ± 1,1
PTH (pg/mL)	67,01 ± 15,2	62,38 ± 16,2	71,18 ± 20,6
FGF-23 (pg/mL)	170,7 ± 24,2	204,5 ± 87,67	321,6 ± 69,58
1,25 Vit.D (pg/mL)	95,10±4,0	71,05±15,5	63,80±0,7

PA: pressão arterial; Cr: creatinina; Cai: cálcio iônico; P: fósforo; PTH: paratormônio;
 FGF-23: fator de crescimento de fibroblastos; 1,25 Vit.D: 1,25 vitamina D.
 p<0,05: * vs Nx RCa e Nx RCa/P; ^β vs todos os grupos.

4.2 Avaliação histomorfométrica do tecido ósseo

A Tabela 3 e a figura 1 demonstram os resultados dos parâmetros estruturais da análise histomorfométrica do tecido ósseo.

A ingestão elevada de Ca e de Ca/P diminuiu o volume ósseo (BV/TV) dos animais Nx quando comparados ao grupo Sham (p<0,05). Os animais que ingeriram dieta rica em Ca apresentaram menor espessura das traves (Tb.Th) em relação aos animais Sham (p=0,0098), enquanto os animais que ingeriram dieta rica em Ca/P cursaram com maior separação

entre as traves ósseas (Tb.Sp) ($p=0,03$). Quanto aos parâmetros de formação óssea, os animais Nx cursaram com diminuição da superfície osteóide (OS/BS) assim como da superfície osteoblástica (Ob.S/BS), porém sem diferença estatisticamente significante ($P>0,05$) (Tabela 4). Não houve diferença entre os parâmetros de reabsorção óssea (Tabela 5).

Os índices dinâmicos de mineralização óssea dos animais Nx mantiveram-se semelhante ao dos animais Sham (Tabela 6).

Tabela 3 - Parâmetros estruturais do fêmur distal dos animais controles e nefrectomizados

	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Tb.Sp (μm)	Tb.N (/mm)
Sham DC	19,39 $\pm$ 2,0*	70,66 $\pm$ 4,3	306,7 $\pm$ 23,4	2,72 $\pm$ 0,18
Nx RCa	13,16 $\pm$ 1,5	58,30 $\pm$ 2,8°	488,9 $\pm$ 82,6	2,23 $\pm$ 0,21
Nx RCa/P	11,84 $\pm$ 1,5	61,50 $\pm$ 4,5	491,9 $\pm$ 51,7°	2,18 $\pm$ 0,28

BV/TV: Volume trabecular; Tb.Th: Espessura trabecular; Tb.Sp: Separação das traves; Tb.N: Número de traves. $p<0,05$: * vs Nx RCa e Nx RCa/P; ° vs Sham DC.

Tabela 4 - Parâmetros estáticos de formação óssea do fêmur distal dos animais controles e nefrectomizados

	O.Th (μm)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)
Sham DC	1,51 $\pm$ 0,14	13,74 $\pm$ 2,64	11,29 $\pm$ 2,43
Nx RCa	1,57 $\pm$ 0,26	9,17 $\pm$ 1,46	6,51 $\pm$ 1,19
Nx RCa/P	1,66 $\pm$ 0,15	11,53 $\pm$ 3,65	9,49 $\pm$ 2,3

O.th: espessura osteóide; OS/BS: superfície osteóide; Ob.S/BS: superfície osteoblástica.

Tabela 5 - Parâmetros estáticos de reabsorção óssea do fêmur distal dos animais controles e nefrectomizados

	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)
Sham DC	11,97 ± 1,94	3,32 ± 0,63
Nx RCa	8,39 ± 1,80	2,32 ± 0,78
Nx RCa/P	9,29 ± 1,58	2,31 ± 0,63

ES/BS: superfície de reabsorção; Oc.S/BS: superfície osteoclástica.

Tabela 6 - Parâmetros dinâmicos do fêmur distal dos animais controles e nefrectomizados

	MS/BS (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$)	BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$)	Mlt (dias)
Sham DC	8,29 ± 1,73	0,89 ± 0,22	0,067 ± 0,015	3,60 ± 0,75
Nx RCa	5,41 ± 1,58	0,87 ± 0,12	0,053 ± 0,017	6,06 ± 2,52
Nx RCa/P	5,61 ± 1,35	0,61 ± 0,18	0,047 ± 0,029	5,85 ± 1,10

MS/BS: superfície mineralizante; MAR: taxa de aposição mineral; BFR/BS: taxa de formação óssea; Mlt: intervalo de tempo para mineralização.

Figura 1. Cortes Histológicos de tecido ósseo. (A) Grupo Sham, com volume trabecular normal; (B) Grupo Nx RCa, mostrando diminuição do volume trabecular e menor espessura das traves; (C) Grupo Nx RCa/P, mostrando diminuição do volume trabecular e maior espaçamento entre as traves (x250)

4.3 Quantificação da apoptose

A Tabela 7 descreve a porcentagem de osteoblastos e osteócitos apoptóticos nos três grupos estudados. A figura 2 ilustra osteoblastos e osteócitos em apoptose. Os animais que ingeriram dieta rica em Ca e em Ca/P apresentaram maior apoptose de osteoblastos do que os animais Sham. Em relação aos osteócitos, os animais Nx RCa/P apresentaram menor porcentagem de osteócitos apoptóticos em relação aos animais Nx RCa.

Tabela 7 - Detecção de apoptose no tecido ósseo

	Apoptose (%)	
	osteoblastos	osteócitos
Sham DC	1,26 ± 0,19	1,04 ± 0,14
Nx RCa	2,00 ± 0,22 [°]	1,46 ± 0,22
Nx RCa/P	1,90 ± 0,13 [°]	0,80 ± 0,09 [*]

p<0,05: [°] vs Sham DC; ^{*} vs Nx RCa.

Figura 2. Cortes histológicos com marcação para apoptose. (A) controle negativo em tecido ósseo; (B) controle positivo, em tecido mamário de roedores; (C) Sham DC e (D) Nx RCa, osteoblastos em medula e trave; (E) Nx RCa/P, osteoblastos em cortical e medula (x1000).

4.4 Análise da expressão gênica relativa do Colágeno tipo I e da TRAP no tecido ósseo

Com o objetivo de caracterizar melhor o efeito das dietas RCa e RCa/P sobre o tecido ósseo foi avaliada a expressão gênica de alguns genes marcadores da maturação osteoblástica (colágeno tipo I) e da atividade osteoclástica (TRAP) por PCR em tempo real.

A expressão relativa do colágeno tipo I não mostrou alteração nos animais Nx em relação ao grupo Sham, enquanto que a expressão da TRAP foi quantitativamente superior nos animais Nx em relação ao Sham, notadamente no grupo RCa ($p < 0,07$), porém sem atingir significância estatística (Figura 3).

Figura 3. Quantificação da expressão gênica. (A) colágeno tipo I; (B) TRAP.

4.5 Análise histológica qualitativa cardiovascular

A eficácia das dietas RCa e RCa/P em induzir calcificação cardiovascular foi avaliada através da histologia qualitativa. Os cortes histológicos de coração corados pela coloração de von Kossa não demonstraram calcificação nos animais estudados.

5 DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram que a sobrecarga de Ca isoladamente ou de Ca/P associada foi deletéria para o tecido ósseo, mas não favoreceu o desenvolvimento de calcificações vasculares em animais urêmicos mantidos com infusão fixa de PTH em dose fisiológica.

Os animais Nx elevaram a pressão arterial no decorrer do estudo, e os níveis de creatinina sérica no final do experimento foram semelhantes aos encontrados em animais com insuficiência renal moderada como descrito em outros estudos.³⁹

Tanto os animais que ingeriram dieta rica em Ca, como em Ca/P apresentaram aumento do P sérico quando comparados aos controles, e os que receberam dieta rica em Ca/P desenvolveram hipocalcemia. A dieta rica em P causa hipocalcemia provavelmente pela formação no intestino, de complexos insolúveis com o cálcio diminuindo a absorção intestinal desse elemento ⁴⁰. A hiperfosfatemia diminui também a atividade da enzima 1 α -hidroxilase renal, diminuindo a concentração de calcitriol e dessa forma a absorção intestinal de Ca. Apesar da falta de significância estatística os animais Nx apresentaram níveis séricos de calcitriol menores que os controles. Não fizemos balanço de cálcio e de fósforo mais talvez essa menor produção de calcitriol tenha contribuído para a hipocalcemia observada nos animais que receberam dieta rica em Ca/P. Também não observamos diferença estatística nos níveis de FGF-23 dos grupos

estudados, no entanto os animais que receberam sobrecarga de Ca/P apresentaram níveis mais elevados desse fator assim como menores níveis de calcitriol. A sobrecarga de fósforo é um fator que contribui para maior produção de FGF-23 pelos osteócitos e osteoblastos⁴¹. Nosso modelo impede que o PTH participe das adaptações as quais o organismo recorre na uremia, o que provavelmente contribuiu para os resultados encontrados.

Quanto à PTX, o procedimento foi eficaz, assim como a reposição do PTH com mini bombas osmóticas, uma vez que os níveis séricos do hormônio foram semelhantes aos dos animais controles.

O grande achado deste estudo foi a diminuição do volume ósseo nos animais Nx que ingeriram tanto dieta rica em Ca como em Ca/P. Apesar desses grupos apresentarem uma tendência a diminuição dos parâmetros de formação e mineralização esses resultados não foram significativos em relação aos controles. O mesmo ocorreu em relação aos índices que analisam a reabsorção.

O colágeno é a principal proteína da matriz óssea. Analisando sua expressão gênica, não observamos diferença entre os grupos sugerindo baixa formação desta matrix. Contudo, detectamos um aumento da expressão da enzima fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) que ficou próximo da significância quando comparamos os animais dos grupos Nx RCa e Nx RCa/P com o grupo Sham ($p < 0,07$). Esse aumento sugere um aumento de reabsorção pelos osteoclastos. A grande variabilidade dos resultados e o pequeno número de animais estudados provavelmente contribuíram para essa falta de significância.

Outro fator que deve ser considerado é a reposição contínua do PTH. O PTH exerce efeito bifásico nas células osteoblásticas, e depende da concentração de PTH administrada, do tempo de exposição ao hormônio e do estágio de diferenciação dessas células^{42, 43}. Estudos têm mostrado que o PTH administrado de forma intermitente aumenta o número e a atividade dos osteoblastos e, portanto, a formação óssea. Já a administração contínua tem um efeito catabólico, aumentando mais a reabsorção que a formação óssea, favorecendo a perda de massa óssea⁴⁴.

A maior porcentagem de osteoblastos apoptóticos nos animais que receberam dieta rica em Ca como em Ca/P comparados aos controles provavelmente também contribuiu para a diminuição do volume ósseo. Saunders et al. mostraram que o aumento de Ca e P no citoplasma resulta em liberação de Ca do retículo endoplasmático para a mitocôndria. O excesso de cálcio faz com que a mitocôndria produza menos ATP, poros de sua membrana se abrem com liberação de citocromo C e outras substâncias que formam os apoptosomas, responsáveis pelo recrutamento das caspases, e posterior apoptose⁴⁵. Vários autores demonstraram que as células osteoblásticas são sensíveis a pequenas mudanças na concentração extracelular de Ca e P e que exposições a esses elementos mesmo, por curtos períodos de tempo, podem provocar morte celular^{46, 47, 48}.

Recentemente Rianthavorn et al. realizaram um estudo com animais nefrectomizados que receberam dieta rica em Ca (2,5%) e nos quais as paratireóides foram mantidas. Contrastando com nossos resultados os animais apresentaram aumento do volume trabecular. A sobrecarga de

cálcio reduziu em 50% os níveis de PTH, diminui um pouco a formação e acentuadamente a reabsorção óssea evidenciada pelo aumento da expressão de osteoprotegerina e diminuição da fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) no tecido ósseo⁴⁹. Já no nosso modelo onde os níveis de PTH permanecem constantes, a sobrecarga de Ca e de Ca/P favoreceu a apoptose dos osteoblastos o que levou a menor formação óssea. Dessa forma a associação entre diminuição da formação com reabsorção óssea mantida provavelmente contribuiu para a perda óssea nos nossos animais Nx.

Empregando modelo experimental semelhante, demonstramos que animais com sobrecarga de P também apresentavam diminuição do volume ósseo³¹, o que nos faz supor que a perda óssea dos animais que recebeu dieta rica em Ca/P foi influenciada tanto pela sobrecarga do Ca como de P.

Não observamos calcificações vasculares nos grupos estudados. Nas últimas décadas, têm-se acumulado evidências de que a sobrecarga de Ca e de P promovem calcificações vasculares nos pacientes com DRC. Os mecanismos envolvidos são complexos e começam a ser melhor compreendidos^{50, 51}. Recentemente, demonstramos que altos níveis de PTH foram determinantes para o desenvolvimento de calcificação maciça na camada média da aorta, assim como nas coronárias, e estes achados não foram relacionados com sobrecarga de fósforo, nem com uremia, pois os animais com função renal normal também cursaram com calcificação⁵². Nossos resultados confirmam que a sobrecarga de Ca e de P isoladamente não promove calcificação vascular.

Pacientes com DRC frequentemente desenvolvem osteoporose isolada, ou associada a doenças de alta ou baixa remodelação, o que contribui para elevar a frequência de fraturas nesses pacientes⁵³. Esses pacientes recebem grandes quantidades de sais de Ca como quelantes de P. O uso dos sais de Ca, o uso do calcitriol e seus análogos para o tratamento do HPT juntamente com o Ca do dialisato contribuem para que os pacientes desenvolvam balanço positivo de Ca, o que a longo prazo pode acelerar a calcificação vascular, diminuir a remodelação óssea com graves consequências para estes indivíduos⁵⁴. Até o presente momento, não dispomos de marcadores da remodelação óssea sensíveis, a ponto de melhor orientar o tratamento do HPT evitando diminuir exageradamente a remodelação óssea. Só recentemente os níveis de Ca do dialisato começam a ser revistos⁵⁵ e provavelmente não devem ser o mesmo ao longo de toda a vida dialítica de um paciente uma vez que a remodelação óssea varia e o tecido ósseo é o maior reservatório de Ca e P no organismo.

Neste modelo experimental a taxa de mortalidade foi por volta de 37%, desta maneira limitando o número de animais em cada grupo para obtenção de maior poder estatístico nos testes. Apesar disto, o modelo animal que utilizamos reflete condições clínicas encontradas em pacientes com DRC.

6 CONCLUSÕES

- A sobrecarga de Cálcio e de Cálcio/Fósforo associada à infusão fisiológica de PTH levaram a diminuição do volume ósseo dos animais nefrectomizados.
- A diminuição do volume ósseo nos animais nefrectomizados foi conseqüente a maior porcentagem de osteoblastos apoptóticos, determinando diminuição dos parâmetros de formação óssea; assim como pela maior atividade dos osteoclastos determinada pelo aumento da expressão gênica da TRAP.
- A sobrecarga de Cálcio e de Cálcio/Fósforo associada à infusão fisiológica PTH não induziu calcificação vascular. Apesar de não termos demonstrado a presença de calcificação vascular, não podemos descartar os efeitos adversos da sobrecarga de cálcio e cálcio/ fósforo sobre o leito vascular (arterial).

7 ANEXOS

Anexo A – Aprovação pela Comissão de Ética

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

A Nefrologia
13 / 09 / 2004
Eliana Costa Ponte
Secretária de Planejamento Clínica
Medicina Intensiva

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.09.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 748/04, intitulado: "Avaliação dos tecidos cardiovascular e ósseo em ratos urêmicos paratireodectomizados mantidos com infusão contínua de paratormônio e alimentados com diferentes concentrações de cálcio e fósforo" apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Vanda Jorgetti

Pesquisador(a) Executante: Dra. Daniella Guimarães Batista

CAPPesq, 08 de Setembro de 2004.

Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

8 REFERÊNCIAS

-
1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int.* 2009; (Suppl 113), S1-S130.
 2. US Renal Data System: USRDS 2006 Annual Data Report. The National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD 2006.
 3. Gilbertson DT, Liu J, Xue JL, et al: Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:3736-41.
 4. Moe S, Drueke T, Cunningham J, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006; 69:1945-53.
 5. Moe SM. Vascular calcification and renal osteodystrophy relationship in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest.* 2006; 36 (Suppl 2): 51-62.
 6. Berndt T, Schiavi S, Kumar R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289:1170-82.
 7. Coco M, Rush H. Increased incidence of hip fracture in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis.* 2000; 36:1115-21.

-
8. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, Weiss NS, Beresford SA, Heckbert SR, Wong C, Stehmen-Breen C. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2000; 58:396-99.
 9. Martin KJ, González EA. Strategies to minimize bone disease in renal failure. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38(6): 1430-36.
 10. Sherrard D, Ott S, Maloney N, Andress D, Coburn J. Uremic osteodystrophy: Classification, cause and treatment. In: Frame, B. & Potts, J.T.JR., ed. *Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Amsterdam, Expecta Medica, 1983, p. 254-59.
 11. Murray J. Favus and David Goltzman. Regulation of Calcium and Magnesium. In: Clifford J. Rosen. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 7th edition. Published by the American Society for Bone and Mineral Research. Washington, D.C. 2008. p. 104-108.
 12. Rizzoli R, Bonjour JP. Physiology of calcium and phosphate homeostases. In: Markus J. Seibel, Simon P. Robins, and John P. Bilezikian. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. 2nd edition. Burlington-USA; Elsevier inc. 2006. p. 345-357.
 13. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC: Cloning and characterization of an extracellular Ca-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 1993; 366:575–80.

-
14. Brown EM, Hebert SC. Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function. *Bone*. 1997; 20:303-09.
 15. Peacock M. Calcium Metabolism in health and disease. *CJASN*. 2010, 5:S23-S30.
 16. Peacock M, Liu G, Carey M, et al. Effect of calcium or 25OH vitamin D3 dietary supplementation on bone loss at the hip in men and women over the age of 60. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:3011-19.
 17. Talmage RV, Mobley HT. Calcium homeostasis: reassessment of the actions of parathyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 2008; 156:1-8.
 18. Pieper AK, Haffner D, Hoppe B, et al. A randomized crossover trial comparing sevelamer with calcium acetate in children with CKD. *Am J Kidney Dis*. 2006; 47: 625-35.
 19. Hsu CH. Are we mismanaging calcium and phosphate metabolism in renal failure? *Am J Kidney Dis*. 1997; 29:641-49.
 20. Sigrist M, McIntyre CW. Calcium exposure and removal in chronic hemodialysis patients. *J Renal Nutr*. 2006;16: 41-6.
 21. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider 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; 342:1478-83.

-
22. Chertow GM, Burke SK, Raggi P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002; 62:245-52.
23. Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, Mehta R, Lindbergh J, Dreisbach A, Raggi P. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int.* 2005; 68:1815-24.
24. Langman CB, Cannata JB. Calcium in chronic kidney disease: Myths and realities. *CJASN.* 2010, 5: S1-S2.
25. Ruppe MD, Jan de Beur SM. Disorders of phosphate homeostasis. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 7th edition. Published by the American Society for Bone and Mineral Research. Washington, D.C. 2008. p. 123-127.
26. Brenner BM. The Kidney. 5th edition. Philadelphia, Saunders, 1996, pp 2187-273.
27. Pei Y, Hercz G, Greenwood C, Segre G, Manuel A, Saiphoo C, Fenton S, Sherrard D. Risk factors for renal osteodystrophy: a multivariant analysis. *J Bone Miner Res.* 1995; 10:149-56.
28. Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *JASN.* 2009; 20(2):381-7.

-
29. Larsson TE, Olauson H, Hagstrom E, et al. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(2):333-9.
30. Karaplis AC, Goltzman D. *PTH and PTH rP effects on the skeleton.* Rev Endocr. Metab. Disord. 2000; 1 :331-341.
31. McGartland C, Robson P, Murray L, Cran G, Savage MJ, Watkins D, Rooney M and Boreham C. Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: The Northern Ireland Young Hearts Project. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 1563-69.
32. Kemi VE, Karkkainen MU, Lamberg-Allardt CJ. High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy Young females. *Br J Nutr.* 2006; 545-52.
33. Batista DG, Neves KR, Graciolli FG et al. The Bone Histology Spectrum in Experimental Renal Failure: Adverse Effects of Phosphate and Parathyroid Hormone Disturbances. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87 (1):60-67.
34. Berdud I, Martin-Malo A, Almaden Y, Aljama P, Rodriguez M, Felsenfeld AJ. The PTH-calcium relationship during a range of infused PTH doses in the parathyroidectomized rat. *Calcif Tissue Int.* 1998; 62(5):457-61.
35. Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res.* 1997; 12:2098-107.

-
36. Parffit AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2 :595-610.
37. Jepsen FL, Mortensen PB. Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function: a quantitative study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1979; 383:265-70.
38. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25:402-8.
39. Neves K, Graccioli F, dos Reis LM, Pasqualucci C, Moysés R et al. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. *Kidney Int.* 2004; 66:2237-244.
40. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A. Role of phosphorus in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Am J kidney Dis.* 2001; 37 (1 suppl 2): S54-S57.
41. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M and et al. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: 1088-95.
42. Schmitt CP, Hessing S, OH Jun, Webwr L, Ochlich P, Mehls O. Intermittent administration of parathyroid hormone (1-37) improves growth and bone mineral density in uremic rats. *Kidney Int.* 2000; 57:1484-92.

-
43. Locklin RM, Khosla S, Turner S, et al. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem.* 2003; 89:180-90.
44. Padagas J, Colloton M, Shallhoub V, Kostenuik P, Morony S, Munyakazi L, Guo M, Gianneschi D, Shatzen E, Geng Z, Tan HL, Dunstan C, Lacey D, Martin D. The Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand Inhiibitor Osteoprotegerin Is a Bone-protective agent in a rat model of chronic renal insufficiency and hyperparathyroidism. *Calcif Tissue Int.* 2006; 78: 35-44.
45. Saunders R, Szymczyk K, Shapiro I. Matrix Regulation of Skeletal Cell Apoptosis III: Mechanism of Ion Pair-Induced Apoptosis. *J Cell Biochem.* 2007; 100:703-15.
46. Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone.* 2000; 27:359-66.
47. Mansfield K, Teixeira CC, Adams CS, Shapiro IM. Phosphate ions mediate chondrocyte apoptosis through a plasma membrane transporter mechanism. *Bone.* 2001; 28:1-8.
48. Mansfield K, Pucci B, Adams CS, Shapiro IM. Induction of apoptosis in skeletal tissues: Phosphate mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent. *Calcif Tissue Int.* 2003; 73(2):161-72.
49. Rianthavorn P, Ettenger RB, Salusky IB, et al. Trabecular bone volume and osteoprotegerin expression in uremic rats given high calcium. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25: 2311-19.

-
50. Davies MR, Hruska KA. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2001; 60:472-79.
51. Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M, Slatopolsky E. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005; 68:429-36.
52. Neves KR, Gracioli FG, Dos Reis LM, et al. Vascular calcification: Contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int.* 2007; 71:1262-70.
- 53 Barreto F de C, Barreto DV, Moysés RM, Neves CL, Jorgetti V, Draibe AS, Canziani ME, Carvalho AB. Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry: new insight into an old problem. *Kidney Int.* 2006; 69:1852-57.
54. Barreto DV, Barreto F de C, Carvalho AB, et al. Phosphate binder impacto on bone remodeling and coronary calcification – Results from the Bric study. *Nephron Clin Pract.* 2008; 110:c273-c283.
55. Karohl C, de Paiva Paschoal J, de Castro MC, et al. Effects of bone remodelling on calcium mass transfer during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25(4):1244-51.