GUARACIABA OLIVEIRA FERRARI

**Efeito da associação do carbonato de
magnésio com acetato de cálcio (OSVAREN[®])
no controle do fósforo, no hiperparatireoidismo
secundário e no remodelamento ósseo em
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: Dra. Rosa Maria Affonso Moysés**

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferrari, Guaraciaba Oliveira

Efeito da associação do carbonato de magnésio com acetato de cálcio (OSVAREN[®]) no controle do fósforo, no hiperparatireoidismo secundário e no remodelamento ósseo em ratos urêmicos / Guaraciaba Oliveria Ferrari. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Rosa Maria Affonso Moysés.

Descritores: 1.Fósforo 2.Nefropatias 3.Hiperparatireoidismo 4.Doenças ósseas

USP/FM/DBD-202/12

DEDICATÓRIA

Para minha Mãe querida... sem a educação que você me deu eu não teria
chegado até aqui. Te amo e Te adoro.

Para o grande amor da minha vida, meu Marido.... meu melhor amigo, meu
companheiro, meu suporte, meu tudo... você é imprescindível na minha
vida...

Para meu Pai.... que não está mais aqui dedico a você mais essa vitória,
onde quer que você esteja...

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vanda, à Rosa e à Katia, a oportunidade e a orientação que vocês me deram. Obrigada por tudo! Vocês são brilhantes!

À Raquel e à Cássia, sem vocês, nada seria possível...

A toda equipe do Laboratório, Luciene, Fabiana, Melanie, Verônica, Rita, Meire, Flávia, Wagnão, Valter... sempre prontos a ajudar.

A minha companheira de jornada e grande amiga, Ju, obrigada por tudo!

Aos colegas de trabalho, Ludimila, Luciene, Rodrigo Bueno, Rodrigo Azevedo, Patrícia, Roxana, Melissa, Giovana.

Aos animais, sem os quais a evolução da ciência não seria possível.

À Nefrologia da Faculdade de Medicina da USP, em especial ao Dr. Roberto Zatz e Dr. Rui Toledo.

Normatização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Definição e fisiopatologia do distúrbio do metabolismo mineral e ósseo secundário à doença renal crônica (DMO-DRC)	1
1.2. Tratamento do DMO-DRC	3
1.3. Quelantes de fósforo	4
1.3.1. Quelantes de fósforo contendo magnésio	6
1.3.2. Osvaren®	8
1.4. Outras ações do magnésio	9
1.4.1. Magnésio e PTH	9
1.4.2. Magnésio e calcificação	10
1.5. Modelos experimentais de uremia	11
2. OBJETIVO	14
3. MÉTODOS	15
3.1. Modelo experimental	15
3.1.2. Experimento 1: avaliação dos quelantes de fósforo na DRC induzida por adenina	15
3.1.2. Experimento 2: avaliação dos quelantes de fósforo na DRC induzida por nefrectomia 5/6	17
3.2. Análise bioquímica	18
3.3. Análise histológica	19
3.3.1. Histomorfometria óssea	19
3.3.2. Calcificação vascular	20
3.3.2.1. Histologia	20
3.3.2.2. Conteúdo de cálcio	21
3.3.3. Imunohistoquímica de paratireóide	21
3.3.3.1. PCNA	21
3.3.3.2. Receptor de cálcio	23

3.4. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Experimento 1.....	26
4.1.1. Gerais.....	26
4.1.2. Bioquímica.....	29
4.1.3. Histomorfometria óssea.....	31
4.1.3.1. Turnover.....	31
4.1.3.2. Mineralização.....	35
4.1.3.3. Volume.....	38
4.1.4. Calcificação vascular.....	41
4.1.4.1. <i>Von Kossa</i> e conteúdo de cálcio.....	41
4.1.5. Imunohistoquímica de paratireóides.....	44
4.1.5.1. PCNA.....	44
4.1.5.2. Receptor de cálcio.....	46
4.2. Experimento 2.....	48
4.2.1. Gerais.....	48
4.2.2. Bioquímica.....	50
4.2.3. Histomorfometria óssea.....	52
4.2.3.1. Turnover.....	52
4.2.3.2. Mineralização	55
4.2.3.3. Volume.....	58
4.2.4. Calcificação vascular.....	61
4.2.4.1. <i>Von Kossa</i> e conteúdo de cálcio.....	61
4.2.5. Imunohistoquímica de paratireóides.....	63
4.2.5.1. PCNA.....	63
4.2.5.2. Receptor de cálcio.....	65
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	76
7. REFERÊNCIAS.....	77
8. ANEXO.....	84

Artigo submetido para publicação na revista PlosOne

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto de rim de rato com nefropatia induzida por adenina.....	28
Figura 2 - Foto de rim de rato com nefropatia induzida por adenina e de rim de rato com função renal normal.....	28
Figura 3 - Representação histológica de tecido renal de rato com função renal normal.....	28
Figura 4 - Representação histológica de tecido renal de rato com nefropatia por adenina.....	28
Figura 5 - Histomorfometria óssea. <i>Turnover</i> (BFR). Experimento 1.....	32
Figura 6 - Representação histológica de tecido ósseo de rato do grupo Controle. Experimento 1.....	34
Figura 7 - Representação histológica de tecido ósseo de rato do grupo DRC. Experimento 1.....	34
Figura 8 - Representação histológica de tecido ósseo de rato do grupo CaMg. Experimento 1.....	34
Figura 9 - Representação histológica de tecido ósseo de rato do grupo Ca. Experimento 1.....	34
Figura 10 - Histomorfometria óssea. Mineralização (MLT). Experimento 1.....	37
Figura 11 - Histomorfometria óssea. Volume (BV/TV). Experimento 1.....	40
Figura 12 - Representação histológica de tecido de aorta torácica de rato com função renal normal.....	43
Figura 13 - Representação histológica de tecido de aorta torácica de rato do grupo DRC. Experimento 1.....	43
Figura 14 - Representação histológica de tecido de aorta torácica de rato do grupo CaMg. Experimento 1.....	43
Figura 15 - Representação histológica de tecido de aorta torácica de rato do grupo Ca. Experimento 1.....	43
Figura 16 - Imunohistoquímica de paratireóide para PCNA. Experimento 1.....	45

Figura 17 - Imunohistoquímica de paratireóide para receptor de cálcio. Experimento 1.....	47
Figura 18 - Histomorfometria óssea. <i>Turnover</i> (BFR). Experimento 2.....	54
Figura 19 - Histomorfometria óssea. Mineralização (MLT). Experimento 2.....	57
Figura 20 - Histomorfometria óssea. Volume (BV/TV). Experimento 2.....	60
Figura 21 - Imunohistoquímica de paratireóide para PCNA. Experimento 2.....	64
Figura 22 - Imunohistoquímica de paratireóide para receptor de cálcio. Experimento 2.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados gerais. Experimento 1.....	27
Tabela 2 – Bioquímica. Experimento 1.....	30
Tabela 3 – Histomorfometria óssea. Turnover. Experimento 1.....	33
Tabela 4 – Histomorfometria óssea. Mineralização. Experimento 1.....	36
Tabela 5 – Histomorfometria óssea. Volume. Experimento 1.....	39
Tabela 6 – Conteúdo de cálcio aorta abdominal. Experimento 1.....	42
Tabela 7 – Resultados gerais. Experimento 2.....	49
Tabela 8 – Bioquímica. Experimento 2.....	51
Tabela 9 - Histomorfometria óssea. Turnover. Experimento 2.....	53
Tabela 10 - Histomorfometria óssea. Mineralização. Experimento 2.....	56
Tabela 11 - Histomorfometria óssea. Volume. Experimento 1.....	59
Tabela 12 - Conteúdo de cálcio aorta abdominal. Experimento 2.....	62

Resumo

Ferrari GO. Efeito da associação do carbonato de magnésio com acetato de cálcio (Osvaren®) no controle do fósforo, no hiperparatireoidismo secundário e no remodelamento ósseo em ratos urêmicos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

Introdução: O quelante de fósforo (P) Osvaren® foi lançado recentemente no mercado internacional para tratamento da hiperfosfatemia nos pacientes com Doença Renal Crônica (DRC). Não existem estudos experimentais com esta medicação. **Objetivo:** Avaliar a ação deste quelante no tratamento do Distúrbio Mineral e Ósseo (DMO) de ratos com DRC induzida por adenina e por nefrectomia 5/6 (NX5/6). **Métodos:** Experimento 1: Durante 4 semanas, ratos *Wistar* receberam dieta com adenina [2 semanas (0,75%); 2 semanas (0,50%)] e então foram divididos em 3 grupos para receber dieta padrão (grupo DRC); dieta padrão com 3% de Acetato de Cálcio (grupo Ca); e dieta padrão com 3% de Osvaren® (grupo CaMg). Um grupo Controle (função renal normal) recebeu a dieta padrão durante todo o estudo. Ao final de cinco semanas de tratamento os animais foram sacrificados. Experimento 2: ratos da mesma espécie foram submetidos à NX5/6, divididos em grupos como no experimento 1 para receberem os quelantes de P imediatamente após a nefrectomia, e sacrificados após 9 semanas. Nos dois experimentos foram coletados soro, fêmures, aortas e paratireóides para análise bioquímica, histomorfometria óssea, pesquisa de calcificação vascular (CV) e imunohistoquímica de paratireóides, respectivamente. **Resultados:** Experimento 1: Os animais que receberam adenina apresentaram níveis maiores de creatinina, PTH, P e magnésio (Mg) que os do grupo Controle. Os quelantes de P reduziram a fração de excreção de P (FeP), mas não o P sérico, enquanto os níveis de PTH, FGF23 e calcitriol diminuíram de forma não significativa nos grupos tratados. O Mg sérico foi significativamente maior no grupo CaMg, enquanto maior calciúria, mais CV e menor marcação pelo PCNA nas paratireóides foram observadas no grupo Ca. Os animais que receberam adenina apresentaram doença óssea mista e ambos os quelantes de P melhoraram a remodelação, mas favoreceram a um acúmulo ainda maior de osteóide. Experimento 2: Da mesma forma que no experimento 1, os animais submetidos à NX5/6 evoluíram com uremia, e os efeitos dos quelantes no PTH, na CV e nas paratireóides foram similares. No entanto, o grupo CaMg apresentou mortalidade de 54% (vs 20% no grupo Ca), além de retardo na mineralização óssea. **Conclusão:** O tipo de nefropatia pode ter influência no efeito do quelante de P Osvaren®, já que o acúmulo de Mg provavelmente foi o responsável pela maior mortalidade e déficit de mineralização observados no experimento 2. Em relação ao efeito como quelante de P, o Osvaren® foi equivalente ao acetato de cálcio, mas este último está associado a maior sobrecarga de cálcio e a CV. O acúmulo de osteóide observado em ambos os experimentos parece ser o preço pago

pela reduzida absorção intestinal de P favorecida pelos quelantes no hiperparatireoidismo secundário severo e esse efeito deveria ser avaliado em pacientes em diálise.

Descritores: fósforo; nefropatias; hiperparatireoidismo; doenças ósseas.

Summary

Ferrari GO. *Magnesium carbonate/calcium acetate (Osvaren®) association effects in phosphorus, secondary hyperparathyroidism and bone turnover in uremic rats* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

Introduction: Osvaren® is a phosphate (P) binder that has been recently introduced for Chronic Kidney Disease (CKD) patients' therapy. However, it has not been tested in experimental models yet. **Aims:** To study Osvaren® effects on mineral and bone metabolism in CKD experiment models. **Methods:** Experiment 1: For 4 weeks (wk), rats were fed normal chow or an adenine-enriched diet (0,75% for 2 wks; 0,50% for 2 wks). After that, adenine was discontinued and rats were divided into 3 groups: Ca (3% calcium acetate); CaMg (3% Osvaren®) and CKD (normal diet/untreated). A control group, with normal renal function was also studied. After 5 wks of therapy, animals were sacrificed. Experiment 2: Animals underwent 5/6 nephrectomy, and were submitted to different P binders treatment as in experiment 1 and then sacrificed 9 weeks after surgery. We performed biochemical and histomorphometric analyses, parathyroid PCNA imunohistochemistry, as well as Von Kossa staining and calcium content of aortic sections. **Results:** Experiment 1: Higher creatinine, PTH, FGF-23, P and Mg were found in all adenine-fed rats. P binders did not reduce serum P but decreased fractional excretion of P (FeP) and tended to reduce PTH, FGF23 and calcitriol levels. In the CaMg group, Mg was slightly elevated, whereas Ca group had greater urinary calcium as well as vascular calcification and smaller parathyroid PCNA staining. Adenine-fed rats presented features of mixed bone disease and P binders therapy was able to decrease bone resorption, but was associated with an osteoid accumulation. Experiment 2: As in experiment 1, nephrectomized rats were uremic and P binder effects on PTH, vascular calcification and parathyroid were very similar, except for the mortality rate, that was higher in CaMg group (54% vs 20% in Ca group). An increase in mineralization lag time was also found in CaMg group. **Conclusions:** Osvaren® may cause different effects on different types of nephropathy, as in experiment 2 the Mg was probably the responsible for higher mortality as well as for bone mineralization defect. In terms of P binding efficacy, Osvaren® was equivalent to calcium acetate, but the last one caused calcium overload and vascular calcification. The osteoid accumulation is probably related to the decrease in intestinal P absorption caused by the P binders in these models of secondary hyperparathyroidism. These effects should also be evaluated in dialysis patients.

Descriptors: phosphorus; nephropathies; hyperparathyroidism; bone disease.

1. Introdução

1.1 Definição e fisiopatologia do Distúrbio do Metabolismo Mineral e Ósseo secundário à Doença Renal Crônica (DMO-DRC)

O distúrbio do metabolismo mineral e ósseo, decorrente da doença renal crônica (DRC), constitui uma síndrome que engloba as alterações do cálcio (Ca), do fósforo (P), do paratormônio (PTH) e da vitamina D (VD); além do desenvolvimento de calcificações vasculares (CV) e do acometimento ósseo, conhecido como osteodistrofia renal (OR). A heterogeneidade das manifestações clínicas, além das elevadas morbidade e mortalidade dessa síndrome, tornam a pesquisa nesta área mandatória¹.

A retenção de P decorrente da reduzida filtração glomerular gera um desequilíbrio no funcionamento do eixo formado entre rins, paratireóides e osso, no intuito de manter seu nível sérico. O P sérico estimula a secreção de PTH pelas paratireóides que, no rim, diminui a reabsorção de P e estimula a secreção de calcitriol. No osso, o PTH aumenta a produção de FGF23 e a remodelação, aumentando assim o aporte de P para corrente sanguínea. O FGF23 aumenta a excreção renal de P, enquanto inibe a produção de calcitriol e a secreção de PTH. Tanto a hiperfosfatemia quanto a deficiência de calcitriol levam à hipocalcemia, que também estimula a secreção de PTH^{2, 3}. No outro extremo desta situação, parte dos pacientes, principalmente diabéticos, idosos e pacientes em diálise peritoneal, evoluem com doença óssea adinâmica (DOA), caracterizada por baixa remodelação e

hipocelularidade, e hiperfosfatemia ⁴. Assim, embora haja dois extremos de doença óssea na DRC, ambos compartilham a elevada prevalência de hiperfosfatemia.

A hiperfosfatemia aumenta o risco de CV, que é, por sua vez, uma das grandes responsáveis pela elevada morbidade e mortalidade destes pacientes ⁵. Goodman *et al* ⁶ mostraram que a prevalência de calcificação coronariana é significativamente maior no paciente com DRC dialítica em relação aos indivíduos com função renal normal. Além disso, os indivíduos com DRC com calcificação coronariana apresentaram P sérico significativamente maior quando comparados aos pacientes sem calcificação. Finalmente, a CV está associada à maior mortalidade, tanto nos pacientes em diálise ⁷ como nos portadores de DRC em tratamento conservador ⁸.

O mecanismo da CV não foi totalmente elucidado, mas estudos *in vitro*, demonstraram que a hiperfosfatemia leva à alteração fenotípica da célula muscular lisa do vaso sanguíneo, que adquire fenótipo de osteoblasto, tornando-se capaz de sintetizar proteínas reguladoras da mineralização ⁹. Experimentos em cultura de células mostraram que o Ca também é um indutor de calcificação de células musculares lisas arteriais ^{10, 11}. Estudo realizado em nosso laboratório mostrou que o fator de transcrição Runx2, considerado o marcador mais precoce da diferenciação osteoblástica, é expresso na camada média da aorta de ratos urêmicos submetidos à dieta rica em P, antes mesmo do aparecimento de calcificação ¹².

Diante dos riscos que a hiperfosfatemia representa para os pacientes com DRC, seu controle é o primeiro alvo no tratamento dos distúrbios do metabolismo mineral.

1.2. Tratamento do DMO-DRC

Atualmente o tratamento do DMO-DRC baseia-se na correção da hiperfosfatemia e do PTH através da administração de quelantes de P; da correção do déficit de 25-vitamina D; da administração de análogos da forma ativa da vitamina D (calcitriol, paricalcitol); e do uso de calcimiméticos. Nos casos de hiperparatireoidismo (HP) secundário refratários às medidas clínicas, a paratireoidectomia é indicada ¹.

A correção da hiperfosfatemia é o primeiro alvo e um grande desafio para os nefrologistas pela sua alta prevalência e dificuldade de manejo.

Estudo multicêntrico realizado de 2002 a 2004 detectou uma prevalência de hiperfosfatemia de 46,7% em pacientes em hemodiálise tendo como referência os níveis de P preconizados pelo KDOQI (P entre 3,5 e 5,5 mg/dl) ¹³. No Brasil, Hernandez *et al* ¹⁴ avaliaram 23 pacientes com indicação de paratireoidectomia, imediatamente antes da cirurgia e detectaram hiperfosfatemia em 83% dos pacientes.

O tratamento da hiperfosfatemia envolve diversas medidas (dieta pobre em P, quelantes de P, diálise) e depende muito da aderência do paciente.

A restrição dietética de P é importante no controle da hiperfosfatemia; no entanto, a mínima quantidade de ingestão protéica necessária para um

adequado suporte nutricional dificulta uma menor ingestão de P. Além disso, considerável parte dos alimentos é industrializada e rica em conservantes, os quais são fontes importantes de P inorgânico, altamente biodisponível ¹⁵.

A hemodiálise convencional, 240 minutos três vezes por semana, não é capaz de remover adequadamente o P proveniente da dieta. A hemodiálise diária controla o P efetivamente; no entanto, sua prática ainda é limitada ¹⁶. Os pacientes em diálise peritoneal apresentam melhor controle do P sérico, mas, ainda assim, apenas 50% deles atingem os valores preconizados pelo K/DOQI ^{17, 18}. Portanto, a maioria dos pacientes em tratamento dialítico necessita de quelantes de P para controle da hiperfosfatemia.

1.3. Quelantes de Fósforo

O uso de quelantes de P começou nos anos 70, quando o tratamento dialítico tornou-se uma realidade e percebeu-se a importância do controle da hiperfosfatemia. Os quelantes contendo alumínio foram os primeiros a ser utilizados e apesar de sua eficiência, seu uso prolongado favorecia o acúmulo do metal com toxicidade, caracterizada por encefalopatia, osteomalácia, anemia microcítica e miopatia. Atualmente seu uso está praticamente abandonado ^{19, 20}.

Os sais de cálcio surgiram como alternativa aos de alumínio, mas com eficácia inferior. A preocupação com estes quelantes é a sobrecarga de cálcio ^{21, 22}, principalmente quando associados ao tratamento com análogos da vitamina D ²³, já que estudos experimentais e observacionais

demonstraram que a calcificação coronariana está diretamente relacionada aos níveis de Ca, P e ao produto $\text{Ca} \times \text{P}$ ²⁴. A eficácia do acetato de cálcio em quelar o P é similar à do carbonato de cálcio, mas com administração de menor dose de Ca elementar; no entanto, em relação à incidência de hipercalcemia, os resultados dos estudos são conflitantes ²⁵.

Dentre os quelantes atualmente disponíveis no mercado internacional que não contêm Ca estão o sevelamer, em duas formas de apresentação (hidrocloreto e carbonato), e o carbonato de lantânio.

O sevelamer é uma resina de troca que quela o fósforo e libera cloreto na luz intestinal. Vários estudos clínicos demonstraram que o sevelamer diminui o P sérico, é bem tolerado, e não causa hipercalcemia ^{26, 27, 28}. Chertow *et al* ^{29, 30} mostraram que o sevelamer tem a mesma eficácia como quelante que os sais de cálcio. Além disso, esses autores observaram uma diminuição na progressão da calcificação coronariana nos pacientes que receberam sevelamer. Estudo multicêntrico, prospectivo, aberto, realizado em nosso serviço em associação com a UNIFESP demonstrou que a eficácia do hidrocloreto de sevelamer como quelante de P é semelhante ao do acetato de cálcio ³¹.

O carbonato de lantânio é outra opção de quelante de P lançada na última década, sendo o lantânio um metal raro encontrado naturalmente na areia e no carvão. Sua absorção intestinal é mínima, não é metabolizado e é pobremente excretado pelos rins (13%), sendo a bile sua principal via de eliminação (83%). A absorção intestinal é maior tanto em animais como nos pacientes urêmicos ³². Stewart J *et al* ³³ demonstraram que esse quelante foi

mais eficaz no controle da hiperfosfatemia que o carbonato de cálcio e o sevelamer. Em ensaio clínico de curta duração, também se mostrou eficaz e bem tolerado ³⁴. No entanto, em estudos de longa duração, os pacientes apresentaram aumento do nível sérico do lantânio ³⁵ e em estudos experimentais observou-se acúmulo do metal no fígado, pulmões e rins dos animais ³⁶.

1.3.1 Quelantes de P contendo Magnésio

Os sais de magnésio surgiram no início dos anos 80 como uma alternativa aos quelantes de P que continham alumínio. Estes sais foram formulados como hidróxido de magnésio $[Mg(OH)_3]$ ou carbonato de magnésio ($MgCO_3$), isoladamente ou em combinação com sais de cálcio. As duas formulações foram eficientes como quelante de P, mas foram pouco utilizados em decorrência dos distúrbios gastrointestinais e do risco de hipermagnesemia, o que obrigava a ajustes na concentração de magnésio na solução de diálise ^{37, 38}.

A busca contínua por um quelante eficaz, de baixo custo, com poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade, despertou novamente o interesse pelos sais de magnésio. Entretanto, são escassas as informações sobre seus efeitos na DMO-DRC, pois a maioria dos estudos foi realizada na década de 80 com número reduzido de pacientes, sem randomização e não avaliou estes parâmetros.

Em 2007 Spiegel *et al*³⁹, randomizaram 30 pacientes em hemodiálise por pelo menos 3 meses, na proporção de 2:1, para receber Magnebind® (carbonato de cálcio/carbonato de magnésio) ou acetato de cálcio (169mg de cálcio elementar). Todos os pacientes foram mantidos com dialisato contendo 0,75 mEq/L de magnésio. As doses de análogos de vitamina D e cinacalcete foram ajustadas evitando hipercalcemia e/ou PTH < 100 pg/mL. Após três meses, não houve diferença no P e PTH séricos entre os grupos. O cálcio sérico, o número de comprimidos/dia e a quantidade de cálcio elementar, foram significativamente maiores no grupo que recebeu acetato de cálcio. O magnésio sérico foi significativamente maior no grupo Magnebind®, mas nenhum paciente desenvolveu hipermagnesemia sintomática.

Tzanakis *et al*⁴⁰ em 2008, compararam o uso de MgCO_3 com CaCO_3 em 46 pacientes em hemodiálise. A concentração de magnésio na solução de diálise foi reduzida nos pacientes que receberam MgCO_3 (0,60 mEq/L). Dois pacientes do grupo que recebeu MgCO_3 foram excluídos do estudo por apresentarem diarreia e hipermagnesemia persistente. Houve seis episódios de hipercalcemia no grupo que recebeu carbonato de cálcio e um no que recebeu carbonato de magnésio. Após seis meses, o P, o PTH e o Mg séricos foram semelhantes entre os grupos. O cálcio sérico médio durante o estudo e ao final de seis meses foi significativamente menor nos pacientes que usaram carbonato de magnésio.

1.3.2. Osvaren®

O Osvaren® é uma associação de acetato de cálcio 435mg (110 mg de cálcio elementar) com carbonato de magnésio 235mg (60 mg de magnésio elementar) aprovada para uso como quelante de P desde 2006, na Alemanha. A vantagem desta associação seria combinar o efeito quelante dessas duas drogas com doses menores de Ca elementar, além de outros potenciais efeitos associados ao Mg, como a inibição da secreção do PTH pelas paratireóides ⁴¹ e a prevenção CV ^{42, 43, 44}. No Brasil, este medicamento ainda não foi aprovado para uso.

Em 2004, foi publicado o primeiro estudo clínico que avaliou este quelante em 50 pacientes, sendo que metade deles recebeu Osvaren® e a outra carbonato de cálcio (CaCO_3), isoladamente. O período de acompanhamento foi de 36 meses. A dose dos quelantes foi ajustada de acordo com os níveis séricos do P, Ca, PTH, Mg, sem “*end-point*” definido. Não houve controle de aderência ao medicamento. O estudo mostrou uma redução significativa do Ca e do P nos pacientes que receberam Osvaren®, tanto em relação ao valor basal, como durante o seguimento. No grupo tratado com CaCO_3 , não houve diferença na calcemia e na fosfatemia, quando comparada aos seus valores no início do estudo. O magnésio sérico aumentou significativamente nos pacientes tratados com a associação, comparados aos tratados com CaCO_3 , mas permaneceu dentro dos valores normais. A concentração do PTH sérico diminuiu significativamente no grupo que recebeu Osvaren® ⁴⁵.

Recentemente, foi publicado um estudo com 204 pacientes em hemodiálise, com duração de seis meses no qual os pacientes foram randomizados para receber Osvaren® ou Hidrocloreto de Sevelamer. Ambas as medicações controlaram adequadamente o P sem episódios de hipercalcemia. O magnésio aumentou e o PTH diminuiu significativamente nos pacientes tratados com Osvaren®. Os eventos adversos foram semelhantes entre os grupos ⁴⁶.

1.4. Outras ações do Magnésio

1.4.1. Magnésio e PTH

O magnésio sérico inibe a secreção do PTH e supõe-se que seja através da ativação do receptor de cálcio (CaSR) da paratireóide, cuja sensibilidade ao Mg é 2 a 3 vezes menor que ao cálcio ⁴¹. Estudos mostram associação de maiores níveis de magnésio com menores níveis de PTH em pacientes com DRC em diálise.

Recentemente Wei *et al* ⁴⁷ publicaram uma revisão na qual avaliaram a relação entre Mg e PTH em pacientes em diálise. Dez de doze estudos de pacientes em hemodiálise, e quatro de cinco estudos de pacientes em diálise peritoneal, mostraram uma relação inversa entre níveis séricos de Mg e PTH. Posteriormente, esse mesmo grupo estudou os efeitos de diferentes concentrações de Ca e Mg nas soluções de diálise peritoneal e detectaram uma correlação inversa entre Mg e PTH ⁴⁸.

Postula-se, portanto, que o Mg tenha um efeito supressor sobre a secreção do PTH pelas glândulas paratireóides. Porém, o mecanismo molecular pelo qual esta supressão ocorre ainda não foi esclarecido.

1.4.2. Magnésio e Calcificação

A deficiência de Mg já foi associada à CV desde 1964, quando necrose e calcificação miocárdicas foram detectadas em ratos alimentados com dieta com baixa concentração deste elemento. Segundo os autores, o mecanismo pelo qual ocorria depósito de cálcio é obscuro, mas observou-se que o depósito no tecido ocorreu antes da morte celular, na vigência de Ca sérico normal, sugerindo uma relação competitiva entre Ca e Mg ⁴⁹.

Panells *et al* ⁵⁰ em 1995, induziram hipomagnesemia através de dieta pobre em Mg em ratos Wistar com função renal normal e avaliaram o conteúdo de Mg e Ca em diversos tecidos. A deficiência de Mg aumentou tanto o Ca plasmático como o tecidual.

Meema *et al* ⁴² analisaram os níveis de Ca, Mg, P, produto Ca x P, razão P/Mg e produto Ca x P/Mg, fosfatase alcalina e PTH; e a relação com o desenvolvimento ou regressão de calcificação arterial periférica em pacientes em diálise peritoneal através de radiografia simples de mãos, pés e tornozelos. A detecção de calcificação de tecidos moles foi realizada através de método micro-radioscópico, que permite estudo mais fidedigno de progressão e regressão de calcificação arterial ⁴³. O Mg sérico foi significativamente menor no grupo com calcificação, sugerindo que, na DRC,

a hipermagnesemia pode retardar o desenvolvimento de calcificações. Em 1997, Tzanaki *et al* ⁴⁴ pesquisaram calcificação no anel mitral através de ecocardiograma em 56 pacientes em hemodiálise e detectaram que os pacientes que tinham calcificação eram mais velhos e tinham níveis reduzidos de Mg sérico.

No entanto, todos os estudos citados anteriormente são observacionais, onde é impossível estabelecer uma relação causal entre os fatores estudados. Esta questão poderia ser respondida através de um estudo clínico de intervenção. Porém, como estes estudos são complexos e também para evitar a exposição dos pacientes a terapias deletérias é que utilizamos os modelos experimentais.

1.5. Modelos experimentais de uremia

O modelo que utiliza a nefrectomia 5/6 (NX5/6) foi descrito em 1932 e é o mais frequentemente utilizado para avaliar os efeitos da uremia e suas complicações. A severidade da DRC depende da massa renal remanescente, tornando difícil uma uniformidade entre animais do mesmo grupo, já que existe variação anatômica na vasculatura desses animais. Em geral, a CV só se desenvolve após 12 semanas da NX5/6, a não ser que calcitriol ou uma dieta rica em P sejam complementados ao modelo ⁵¹. Por outro lado, o modelo de DRC por nefrotoxicidade pela adenina, descrito em 1982 por Yokozawa *et al* ⁵² vem ganhando espaço em estudos experimentais pela sua praticidade, já que, dependendo da dose e tempo de

administração da adenina, os animais desenvolvem uremia, hiperparatireoidismo e CV sem cirurgia e suplementação de P ou calcitriol na dieta ⁵³.

Esse modelo vem sendo usado para estudar os distúrbios do metabolismo mineral pela sua praticidade e resultados encorajadores, mas ainda são poucos os estudos que avaliaram os efeitos dos quelantes de P e sua repercussão na OR, no HP e na CV em animais com DRC induzida por adenina.

Nagano *et al* ⁵⁴ utilizaram o modelo de DRC por adenina para avaliar o efeito do hidrocloreto de sevelamer no controle do P, PTH e FGF23. Ratos Sprague-Dawley receberam dieta contendo adenina a 0,75% por duas semanas, seguidas por 0,50% por mais duas semanas. Após oito semanas recebendo sevelamer de forma contínua ou intermitente, o P, PTH e FGF 23 diminuíram. No entanto, este estudo não avaliou os efeitos do quelante na doença óssea tampouco na CV.

Neven *et al* ⁵⁵ avaliaram o efeito do lantânio em ratos Wistar submetidos à dieta com adenina a 0,75% por 4 semanas. Duas semanas após o início da dieta com adenina, carbonato de lantânio a 1% e 2% foi adicionado à dieta. Após o término das quatro semanas com adenina, o quelante continuou a ser administrado com dieta rica em P até o sacrifício, completando oito semanas de DRC. Os autores observaram menor P e maior Ca séricos nos animais que receberam lantânio, assim como menor prevalência e severidade de CV. Os animais com DRC por adenina apresentaram maior área, espessura e perímetro osteóides, e maior

superfície osteoclástica, quando comparados aos animais com função renal normal. Curiosamente, os animais que receberam lantânio apresentaram espessura osteóide ainda maior do que os animais não tratados. Também é importante frisar que, neste estudo, o quelante de P foi administrado precocemente, duas semanas após o início da dieta com adenina.

O modelo adenina é considerado um modelo com complicações osteo-metabólicas mais graves quando comparado à NX5/6; no entanto, não existe nenhum estudo de comparação entre eles. Para solucionar esta dúvida realizamos um experimento com ratos *Wistar* que foram randomizados para receber dieta com adenina ou para serem submetidos à NX5/6. Os animais foram sacrificados após 9 semanas do insulto renal (início da dieta com adenina ou NX5/6). O estudo mostrou que após o mesmo tempo de experimento com a mesma dieta, os animais submetidos à nefrotoxicidade pela adenina apresentaram creatinina e remodelação óssea significativamente maiores. CV não foi observada ⁵⁶.

Assim, nossa análise mostrou que cada um destes modelos mantém suas características, não existindo uma superioridade evidente de um sobre o outro. O modelo adenina é caracterizado por doença renal predominantemente tubular ⁵³ enquanto a NX5/6 é um modelo clássico de esclerose glomerular ⁵⁷. Como não havia qualquer estudo pré-clínico prévio sobre os efeitos do Osvaren[®] na DRC, optamos por avaliá-lo nos dois modelos acima descritos.

2. Objetivo

Avaliar o efeito do Osvaren® no controle da hiperfosfatemia, na hiperplasia de paratireóides, na remodelação óssea e na calcificação vascular nos modelos experimentais de DRC induzidos por adenina e por NX5/6.

3. Métodos

3.1. Modelo experimental

3.1.1. Experimento 1: avaliação dos quelantes de P na DRC induzida por adenina

Ratos da espécie Wistar, machos, com peso inicial entre 300 a 350 g, foram utilizados neste experimento, cuja duração foi de 9 semanas. Os 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%).

Após uma semana de aclimação com dieta padrão do estudo (TestDiet® 5C3Y, EUA), a insuficiência renal foi induzida através de dieta com adenina (LabDiet® 5K52 0,75% e 0,50% EUA).

Os animais receberam as dietas adotando-se o protocolo de *pair-feeding* (15 a 20 g/dia), pelo qual a quantidade de ração oferecida a cada animal é baseada na quantidade ingerida pelos seus pares dos outros grupos do estudo. Exemplificando, todos os animais número 1 recebem a mesma quantidade de dieta e esta quantidade foi determinada pelo menor montante ingerido nas últimas 24 hs. O *pair-feeding* foi realizado três vezes por semana durante todo o estudo.

Trinta animais receberam dieta com adenina. Nas duas primeiras semanas, a porcentagem de adenina na dieta foi de 0,75%, e na terceira e

quarta semanas, de 0,50%⁵⁴. Dez animais não receberam adenina, os quais representaram o grupo Controle do estudo, com função renal normal.

Todas as dietas utilizadas foram em pó e continham 1,17% de cálcio, 0,93% de fósforo, 19,3% de proteína, e 4,2 UI/g de vitamina D3. O acesso à água foi *ad libitum*.

Após 4 semanas, os animais que receberam adenina foram divididos em 3 grupos para receberem as dietas específicas conforme descrito a seguir:

- Grupo CaMg: dieta padrão com 3% de Osvaren[®]
- Grupo Ca: dieta padrão com 3% de Acetato de Cálcio
- Grupo DRC: dieta padrão sem quelante de P
- Grupo Controle: dieta padrão

A pressão arterial caudal foi verificada semanalmente (RTBP 2000, Kent Scientific).

Antecedendo o sacrifício, os animais foram colocados em gaiola metabólica por 48 horas (24 h de aclimação) para coleta de urina de 24h.

Terramicina[®] intraperitoneal (cloridrato de oxitetraciclina, solução injetável, 5,0g/100mL, uso veterinário, Pfiser), na dose de 25 a 30 mg/kg foi aplicada via intraperitoneal (i.p.) em todos os animais nos dias 11^o, 12^o e 4^o, 5^o antes do sacrifício para análise da mineralização óssea.

No final da 9ª semana os ratos foram anestesiados com Tiopentax[®] (tiopental sódico) i.p (50mg/kg) e sacrificados através de punção aórtica e exsanguinação.

Foi colhido sangue para determinação de microhematócrito (Ht). O soro foi separado e congelado para dosagens bioquímicas posteriores.

As glândulas paratireóides foram retiradas por microdissecção, para imunohistoquímica para PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antígeno) e receptor de cálcio (CaSR); os fêmures para histomorfometria óssea; a aorta torácica para análise qualitativa da CV pela técnica de coloração *Von Kossa*; a aorta abdominal para análise de conteúdo de cálcio; e, o ventrículo esquerdo para avaliação do peso.

3.1.2. Experimento 2: avaliação dos quelantes de P na DRC induzida por NX5/6

Rato Wistar machos foram submetidos à NX5/6 e divididos em 3 grupos de tratamento distintos da mesma forma que no experimento 1 (grupo CaMg: dieta padrão com 3% de Osvaren®; grupo Ca: dieta padrão com 3% de acetato de cálcio; grupo DRC: dieta padrão sem quelante de P; grupo controle: dieta padrão).

Esse experimento também teve duração de 9 semanas e a dieta com os quelantes de P foi iniciada imediatamente após a NX5/6. A dieta utilizada foi a dieta padrão descrita no experimento 1, acrescida dos quelantes nos grupos tratados.

O controle da ingestão, do peso, o tempo de gaiola metabólica, a administração de tetraciclina e o sacrifício foram idênticos ao experimento 1, com exceção da remoção das paratireóides, que no experimento 2 foram

retiradas em bloco juntamente com a tireóide, com o intuito de melhor delimitá-las.

A análise bioquímica, histológica e óssea, que serão descritas a seguir foram idênticas para os experimentos 1 e 2.

3.2. Análise bioquímica

No momento do sacrifício uma pequena alíquota de sangue foi utilizada para determinação de microhematócrito (Ht). O restante foi centrifugado para obtenção de soro. No soro foram dosados creatinina (Ensaio colorimétrico, Labtest, Lagoa Santa/MG, Brasil), Ca iônico (Auto Analyser AVL-9140), P (Método colorimétrico de reação de ponto final, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), Mg (Ensaio colorimétrico, Labtest, Lagoa Santa/MG, Brasil), PTH (Rat Intact PTH ELISA Kit, Immutopics, San Clement , CA , USA), FGF23 (FGF-23 ELISA Kit, Kainos Laboratories, INC, Tokyo, Japan), 1,25- dihidroxivitamina D (Radioimunoensaio, realizado pelo laboratório Criesp, São Paulo, SP; dosagem realizada em “pool” de 3 amostras).

Nas amostras de urina foram dosados creatinina (Ensaio colorimétrico, Labtest, Lagoa Santa/MG, Brasil), P (Ensaio colorimétrico de reação de ponto final, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), Ca (Ensaio colorimétrico, Cobas, ROCHE, Indianapolis, IN, EUA).

3.3. Análise Histológica

3.3.1. Histomorfometria óssea

Os fêmures foram fixados em álcool a 70% e processados conforme protocolo descrito previamente ⁵⁸. Utilizando-se micrótomo Polycut S (Leika, Alemanha), obtivemos cortes de 5 μm e 10 μm de espessura da porção distal dos fêmures. As sessões 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 e dinâmicos de formação e reabsorção ósseas foram analisados na metáfise distal (aumento 250x), a 195 μm da cartilagem de crescimento. Um total de 30 campos foi quantificado, utilizando-se um software semi-automático de análise de imagens (Osteomeasure, Osteometrics, Inc., Atlanta, GA, EUA).

Os índices histomorfométricos estáticos incluíram:

- BV/TV: volume ósseo trabecular, expresso em porcentagem.
- OTh: espessura osteóide, expressa em μm .
- ES/BS: superfície de reabsorção óssea, expressa em porcentagem.
- OS/BS: superfície osteóide, expressa em porcentagem.
- Obs/BS: número de osteoblastos, expresso em porcentagem.
- Ocs/BS: número de osteoclastos, expresso em porcentagem.
- Tb.Th: espessura trabecular, expressa em μm .

- Tb.Sp: separação trabecular, expressa em μm .
- Tb.N: número de trabéculas, expresso em número por milímetros.

Os índices histomorfométricos dinâmicos incluíram:

- MAR: taxa de aposição mineral. Determinada a partir da distância entre duas marcações de tetraciclina, dividida pelo intervalo de tempo entre as duas administrações de tetraciclina. Expressa em $\mu\text{m}/\text{dia}$.
- MLT: Intervalo de mineralização. Expresso em dias.
- MS/BS: percentagem de superfície com duplas marcações de tetraciclina do total da superfície trabecular.
- BFR/BS: taxa de formação óssea. Expressa em $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$

Os índices histomorfométricos foram apresentados segundo a nomenclatura recomendada pela *American Society of Bone and Mineral Research-ASBMR* ⁵⁹.

3.3.2. Calcificação vascular

3.3.2.1. Histologia

A aorta torácica foi fixada em formol a 10% e posteriormente embebida em parafina. Secções de 4 μm foram obtidas e coradas com a técnica de *Von Kossa* para análise qualitativa de CV, realizada por patologista sem conhecimento dos grupos.

3.3.2.2. Conteúdo de cálcio

A aorta abdominal foi armazenada em *ependorf* e mantida em freezer (-70 °C). Para a determinação do conteúdo de cálcio, a aorta foi desidratada em estufa a 60°C por 24 hs. Posteriormente o tecido foi triturado, pesado e solubilizado em HCl 0,6N (40 µL HCl/g de tecido) por 48 hs. A solução resultante foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada, obtendo-se o sobrenadante para a dosagem da concentração de cálcio (Calcium [Dry] Reagent Set – Pointe Scientific, Inc, Canton, MI, USA)⁶⁰. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em luz visível com comprimento de onda de 570 nm.

3.3.3. Imunohistoquímica de paratireóide

Secções das paratireóides previamente incluídas em parafina foram utilizadas para análise imunohistoquímica de PCNA e receptor de cálcio conforme técnica descrita a seguir.

3.3.3.1. Reação de imunohistoquímica para PCNA – antígeno nuclear de células em proliferação

A reação de imunohistoquímica, para identificação da expressão de PCNA foi realizada pelo método de imunoperoxidase com o kit Vectastain

ABC-HRP - complexo Avidina/Biotina *horseradish-peroxidase* (Vector, Burlingame, CA, EUA).

Após a desparafinização e rehidratação, as lâminas foram levadas à exposição antigênica em forno de micro-ondas com potência de 2400 watts. Este procedimento foi realizado durante 20 minutos, completando-se o tampão por conta da evaporação se houvesse necessidade. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução salina Tris-tamponada – TBS, pH=7,6 (0,05M de Tris-HCL, 0,9% de NaCl, pH 7,6). Após exposição antigênica, foi feito o bloqueio de peroxidase endógena em solução de 3% de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) em álcool metílico (CH_3OH). Em seguida realizamos o bloqueio da avidina e da biotina endógenas durante 15 minutos cada um, utilizando-se o kit de bloqueio Avidina/Biotina (Vector, Burlingame, CA, EUA), seguido do bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, CA, EUA), na diluição de 1:20, durante 30 minutos.

Os cortes foram então, incubados com anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-PCNA (Clone PC10, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) na diluição de 1:100, *over night*,. Depois disso os cortes foram incubados com anti-imunoglobulina de camundongo conjugada com biotina e adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA), na diluição de 1:100, durante 1 hora.

Para visualização da positividade das células utilizamos como substrato cromogênico AEC (3 – Amino-9 Ethyl – Carbazol). Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Methyl Green (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca).

As células que expressam PCNA apresentam cor vermelha acastanhada.

A contagem das células positivas foi realizada em microscópio no aumento de 40x em todo o tecido. Medimos a área do tecido (programa Imagege-Pro Plus, 2009, Media Cybernetics, Inc, USA) e os resultados foram expressos em número de células positivas por mm³ de tecido.

3.3.3.2. Reação de imunohistoquímica para receptor de cálcio (CaSR)

A reação de imunohistoquímica, para identificação da expressão do CaSR foi realizada pelo método de imunoperoxidase com o kit Vectastain® ABC-AP (Standard) AK-5000 (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EUA).

Após a desparafinização e rehidratação, as lâminas foram levadas à exposição antigênica em panela à vapor por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução salina Tris-tamponada – TBS, pH=7,6 (0,05M de Tris-HCL, 0,9% de NaCl, pH 7,6). Realizamos o bloqueio da avidina e da biotina endógenas durante 15 minutos cada um, utilizando-se o kit de bloqueio Biotin Blocking System (X0590, Dako), seguido do bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, CA, EUA), na diluição de 1:20, durante 30 minutos.

Os cortes foram então incubados com anticorpo monoclonal anti-CaSR (Calcium Sensing Receptor Monoclonal Antibody 5C10, Thermo Scientific, IL, USA) na diluição de 1:1000, *over night* e posteriormente , com anti-

imunoglobulina de camundongo conjugada com biotina e adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA), na diluição de 1:100, durante 1 hora.

Para visualização da positividade das células utilizamos como substrato cromogênico fosfatase alcalina.

Os resultados foram expressos em porcentagem de área marcada por campo, em aumento de 40X, através do programa Image-Pro Plus, 2009, Media Cybernetics, Inc, USA.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Pesquisa em Animais da Universidade de São Paulo (CAPPESQ:0447/08). O estudo foi patrocinado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 08/53147-0) e pela Fresenius Medical Care.

3.4. Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, exceto aqueles com distribuição não-Gaussiana, que estão apresentados como mediana (percentil 25-75%). A comparação entre os grupos foi feita através de teste de Anova com pós-teste de Tukey para as variáveis com distribuição normal e teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns para as variáveis com distribuição não-Gaussiana. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Utilizamos o software Prism versão 4 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

4. Resultados

4.1. Experimento 1

4.1.1. Gerais

Os resultados estão expressos na Tabela 1. A mortalidade geral do estudo foi de 7% (3 ratos). Os óbitos foram nos 19º, 33º e 35º dias após o início da dieta com adenina, sendo o primeiro óbito antes do início da terapia com quelante de P; o segundo, após 3 dias do início do Osvaren®; e o terceiro, após 5 dias do início do acetato de cálcio, respectivamente.

Devido ao protocolo de *pair feeding*, a ingestão diária da dieta foi semelhante entre os grupos, mas os animais com DRC apresentaram menor peso no final do estudo.

Os animais urêmicos apresentaram níveis pressóricos e peso do ventrículo esquerdo corrigido para o peso corpóreo (peso VE/100g) significativamente mais elevados que os do grupo Controle, bem como o débito urinário.

Os rins dos ratos que receberam adenina possuíam um aspecto macroscópico esbranquiçado com múltiplos cistos (figuras 1 e 2).

Histologicamente, observou-se fibrose intersticial importante com dilatação dos túbulos e precipitados intra-tubulares (figuras 3 e 4).

Tabela 1 - Dados gerais

	Controle (n=10)	DRC (n=10)	CaMg (n=9)	Ca (n=10)
Peso inicial (g)	324,4 ± 37,4	307,1 ± 30,8	317,6 ± 30,2	316,9 ± 42,1
Peso final (g)	366,1 ± 18,7	312,0 ± 17,2 ^a	319,1 ± 22,6 ^a	325,4 ± 31,4 ^a
Ingestão (g/d)	17,5 ± 1,4	16,9 ± 1,9	16,7 ± 2,1	17,1 ± 2,5
PA final(mmHg)	119,7 ± 9,3	154,4 ± 20,4 ^a	135,0 ± 21,0	137,6 ± 9,7
DU (ml/24 hs)	11,4±5,4	53,7±13,7 ^a	41,9±9,7 ^a	39,3±10,4 ^{a,b}
Peso VE/100g	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,01 ^a

PA: pressão arterial; DU: débito urinário; VE: ventrículo esquerdo.
P<0,05 = significativo, sendo ^a vs Controle; ^b vs DRC ^c vs CaMg.

Figura 1 – Rim com DRC por adenina.

Figura 2 – Rim de rato com DRC por adenina e de rato com função renal normal.

Figura 3 – Corte histológico de rim normal.
Coloração – hematoxilina-eosina. Aumento 100X.

Figura 4 – Corte histológico de rim com nefropatia por adenina.
Coloração – Tricômio de Masson. Aumento 100X.

4.1.2. Bioquímica

Os animais urêmicos apresentaram clearance de creatinina e hematócrito significativamente menores que os do grupo Controle, bem como maiores níveis séricos de P, PTH, FGF23 e Mg. A fração de excreção de P (FeP) também foi maior no grupo DRC (Tabela 2).

Com a administração dos quelantes de P, houve uma redução significativa da FeP, atingindo valores menores que a dos animais com função renal normal; no entanto, não houve mudança no nível sérico de P. Observamos também uma tendência a menores valores de PTH e calcitriol nos grupos tratados, mas esta diferença não atingiu significância estatística provavelmente devido a grande variabilidade de valores intra-grupo. O mesmo ocorreu em relação aos níveis de FGF23 no grupo que recebeu tratamento com Osvaren[®].

Não houve diferença do cálcio iônico entre os grupos, mas o cálcio urinário foi significativamente maior no grupo Ca. Os animais que receberam Osvaren[®] apresentaram Mg significativamente maior que todos os outros grupos do estudo.

Tabela 2 - Bioquímica

	Controle (N=10)	DRC (N=10)	CaMg (N=9)	Ca (N=10)
Ht(%)	50,0 ± 1,7	40,6 ± 6,8 ^a	42,7 ± 10,4 ^a	41,3 ± 7,7 ^a
Cr(mg/dL)	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,4 ^a
ClCr(ml/min/100g)	0,70 ± 0,18	0,21 ± 0,07 ^a	0,23 ± 0,12 ^a	0,21 ± 0,09 ^a
Cai (mmol/L)	1,15 ± 0,08	1,07 ± 0,07	1,07 ± 0,11	1,12 ± 0,10
iPTH (pg/ml)	105(65-199)	432(234-723) ^a	219(78-616)	181 (124-680)
FGF23 (pg/ml)	157(123-198)	784(580-10974) ^a	384(264-714)	712(417-1768) ^a
Mg (mg/dL)	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,4 ^a	3,2 ± 0,6 ^{a,b}	2,6 ± 0,4 ^{a,c}
P (mg/dL)	5,6 ± 0,9	7,4 ± 0,7 ^a	7,6 ± 1,2 ^a	7,2 ± 1,7 ^a
FeP (%)	9,1 ± 5,0	21,2 ± 10,1 ^a	2,5 ± 1,5 ^{a,b}	3,7 ± 4,0 ^{a,b}
CaU (mg/vol)	1,9 ± 1,0	3,5 ± 1,4	5,5 ± 4,2	8,5 ± 4,3 ^a
Calcitriol (pg/ml)	69,2 ± 17,3	88,0 ± 16,6	55,7 ± 8,8	57,1 ± 29,1

Ht: hematócrito; Cr: creatinina; ClCr/100g: clearance de creatinina corrigido pelo peso corporal; Cai: cálcio iônico; FGF23 : fibroblast growth factor; Mg: magnésio; P: fósforo; FeP: fração de excreção de fósforo; CaU: cálcio urinário de 24 hs.

P<0,05 = significativo, sendo ^a vs Controle; ^b vs Controle ^c vs CaMg.

4.1.3 Histomorfometria óssea

Os parâmetros histomorfométricos serão descritos conforme sugerido pelo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, divididos em *Turnover*, Mineralização, Volume (TMV) ⁶¹.

4.1.3.1 *Turnover*

Os animais que receberam adenina evoluíram com maior *turnover* ósseo (BFR) em relação aos animais com função renal normal (Figura 5). Além disso, esses animais apresentaram maiores superfícies osteoblástica (ObS/BS), osteoclástica (OcS/BS) e de reabsorção (ES/BS) , bem como maior superfície (OS/BS) e volume osteóides (OV/BS). Fibrose da medula óssea só foi encontrada em 1 animal do grupo DRC.

O tratamento com quelantes de P reduziu o *turnover*, as superfícies osteoblásticas, osteoclásticas e de reabsorção e aumentou o volume e espessura osteóides, sendo que todas essas alterações foram mais intensas no grupo que recebeu acetato de cálcio (Tabela 3, Figuras 6 a 9).

Figura 5 - Histomorfometria óssea - *Turnover* (BFR)

Tabela 3 – Histomorfometria Óssea - *Turnover*

	Controle (N=7)	DRC (N=9)	CaMg (N=6)	Ca (N=9)
BFR/BS($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$)	0,04 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,08 ^a	0,05 $\pm$ 0,03 ^b	0,05 $\pm$ 0,03 ^b
Ob.S/BS (%)	7,8 $\pm$ 4,5	25,3 $\pm$ 6,2 ^a	18,0 $\pm$ 9,2	17,9 $\pm$ 6,8 ^a
Oc.S/BS (%)	4,0 $\pm$ 2,6	7,4 $\pm$ 2,8	5,5 $\pm$ 3,6	3,6 $\pm$ 2,4 ^b
ES/BS (%)	14,3 $\pm$ 5,7	24,5 $\pm$ 6,3 ^a	16,1 $\pm$ 9,4	10,2 $\pm$ 4,2 ^b
OV/BV (%)	0,5 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 1,1 ^a	5,1 $\pm$ 5,7	8,2 $\pm$ 5,5 ^{a,b}
OS/BS (%)	9,4 $\pm$ 5,0	30,1 $\pm$ 7,4 ^a	30,1 $\pm$ 20,5 ^a	35,9 $\pm$ 14,3 ^a
O.Th (μm)	1,9 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 1,3	5,3 $\pm$ 2,8 ^{a,b}	7,3 $\pm$ 2,4 ^{a,b}
Fb.V/TV (%)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0- 0,0)	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 (0,0 - 0,0)

BFR/BS: taxa de formação óssea; Ob.S/BS: superfície osteoblástica; Oc.S/BS: superfície osteoclástica; ES/BS: superfície de reabsorção ; OV/BV: volume osteóide; OS/BS: superfície osteóide; O.Th: espessura osteoide; Fb.V/TV: fibrose.
P<0,05 = significativo, sendo ^a vs Controle; ^b vs DRC; ^c vs CaMg.

Figura 6 – Corte histológico de tecido ósseo (fêmur) de rato do grupo Controle. Coloração - Azul de Toluidina. Aumentos 100X e 400X

Figura 7 – Corte histológico de tecido ósseo (fêmur) de rato do grupo DRC. Coloração – Azul de Toluidina. Aumentos de 100X e 400X

Figura 8 – Corte histológico de tecido ósseo (fêmur) de rato do grupo CaMg. Coloração – Azul de Toluidina. Aumentos 100X e 400X. Seta – osteóide.

Figura 9 – Corte histológico de tecido ósseo (fêmur) de rato do grupo Ca. Coloração – Azul de Toluidina. Aumento 100X e 400X. Seta – osteóide.

4.1.3.2. Mineralização

A uremia aumentou a superfície de mineralização (MS/BS) e os quelantes de P reduziram esta superfície, sendo que os valores de MS/BS dos grupos CaMg e Ca foram semelhantes aos do grupo controle. Além disso, o tratamento com quelantes tendeu a aumentar o intervalo de mineralização, mas não atingiu significância estatística. Todas essas alterações foram mais pronunciadas no grupo Ca (Tabela 4, Figura 10).

Tabela 4 – Histomorfometria Óssea - Mineralização

	Controle (N=7)	DRC (N=9)	CaMg (N=6)	Ca (N=9)
MS/BS (%)	4,5 ± 2,2	9,5 ± 4,0 ^a	5,8 ± 3,0	5,3 ± 3,1 ^b
MAR (µm/d)	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,7	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,4
Mlt (d)	4 (4- 8)	8 (4-77)	29 (5-98)	49 (23-99) ^a

MS/BS: superfície de mineralização; MAR: taxa de aposição mineral; MLT: intervalo de mineralização. P<0,05 = significativo, sendo ^a vs Controle; ^b vs DRC; ^c vs CaMg.

Figura 10 - Histomorfometria óssea - Mineralização (MLT)

4.1.3.3. Volume

A administração de adenina aumentou a espessura trabecular dos animais. Por sua vez, o tratamento com quelantes de P corrigiu esta alteração e consequentemente, o volume ósseo e a separação trabecular, tenderam a diminuir e aumentar, respectivamente nos animais tratados (Tabela 5, Figura 11).

Tabela 5 – Histomorfometria óssea - Volume

	Controle (N=7)	DRC (N=9)	CaMg (N=6)	Ca (N=9)
BV/TV (%)	27,4 ± 5,0	31,1 ± 6,7	30,3 ± 9,3	26,8 ± 11,7
Tb.Th (µm)	71,7 ± 2,4	93,4 ± 8,8 ^a	85,1 ± 6,0 ^b	75,2 ± 12,5 ^b
Tb.Sp (µm)	197,6 ± 49,4	223,6 ± 95,6	234,9 ± 158,8	236,6 ± 100,6
Tb.N (N/mm)	3,8 ± 0,6	3,3 ± 0,6	3,5 ± 1,1	3,5 ± 1,1

BV/TV: volume trabecular; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação trabecular;
Tb.N: número de trabéculas.

P<0,05 = significativo, sendo ^a vs Controle; ^b vs DRC; ^c vs CaMg.

Figura 11 - Histomorfometria óssea - Volume (BV/TV)

4.1.4. Calcificação vascular

4.1.4.1. *Von Kossa* e Conteúdo de cálcio

A análise qualitativa da CV analisada com a coloração de *Von Kossa* mostrou calcificação de aorta torácica nos grupos Ca e CaMg, sendo mais prevalente no primeiro (três ratos no primeiro e um rato no segundo grupo). Esses animais apresentaram calcificações macroscópicas observadas no momento do sacrifício.

Na análise do conteúdo de cálcio da aorta abdominal não houve diferença estatística entre os grupos, mas observamos que os animais cuja coloração por *Von Kossa* foi positiva apresentaram maior conteúdo de cálcio que os outros do mesmo grupo (Tabela 6).

Os grupos Controle e DRC não apresentaram CV (figuras 12-15).

Tabela 6 – Conteúdo de cálcio da aorta abdominal

	Controle (N=9)	DRC (N=10)	CaMg (N=10)	Ca (N=10)
Conteúdo de cálcio ($\mu\text{mol/g}$)	9,4 (8,0-10,8)	7,0 (0,90-17,5)	10,9 (1,6-3224)	10,9 (3,4-1992)

Figura 12 – Secção de aorta torácica de animal do grupo controle.
Coloração *Von Kossa* (100X).

Figura 13 - Secção de aorta torácica de animal do grupo DRC.
Coloração *Von Kossa* (100X).

Figura 14 - Secção de aorta torácica de animal do grupo CaMg.
Coloração *Von Kossa* (100X).

Figura 15 - Secção de aorta torácica de animal do grupo Ca.
Coloração *Von Kossa* (100X).

4.1.5. Imunohistoquímica de paratireóide

4.1.5.1. PCNA

Os animais do grupo Ca apresentaram o menor número de células PCNA positivas dentre todos os grupos do estudo, enquanto o Osvaren[®] não causou esse efeito (Figura 16).

Figura 16 - Imunohistoquímica de paratireóide - PCNA

4.1.5.2. CaSR

A marcação para receptor de cálcio aumentou significativamente com o tratamento com acetato de cálcio, mas não mudou com o tratamento com Osvaren[®] (Figura 17).

Figura 17 - Imunohistoquímica de paratireóides - CaSR

4.2. Experimento 2

4.2.1 Gerais

Vinte seis por cento foi a mortalidade total do experimento, sendo seis de onze animais no grupo Osvaren[®] (54%); dois entre dez no grupo Ca (20%); e três de dez do grupo DRC (30%).

Os grupos tinham peso inicial semelhante, mas o peso final foi maior nos animais do grupo DRC, que também apresentou maior ingestão diária que a do grupo controle e CaMg.

A insuficiência renal aumentou o peso do ventrículo esquerdo e o tratamento com quelantes não alterou este resultado. O débito urinário também foi maior no grupo DRC e os animais que receberam acetato de cálcio tenderam a ter um maior volume urinário que os demais grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Dados gerais

	Controle (N=10)	DRC (N=10)	CaMg (N=5)	Ca (N=8)
Peso inicial (g)	324,4±37,4	310,3±19,1	314,1±19,6	334,3±20,7
Peso final (g)	366,1±18,7	407,3±34,1 ^{a,c,d}	328,4±23,4	339,0±38,6
Ingestão (g/d)	17,5±1,4	18,9±0,7 ^a	17,3±0,7 ^b	18,1±1,0
DU (ml/24 hs)	11,4±5,4	22,7±6,7 ^a	20,0±5,8	27,9±7,3 ^a
Peso VE/100g	0,19±0,01	0,21±0,05	0,23±0,03 ^a	0,23±0,04 ^a

DU: débito urinário; VE: ventrículo esquerdo.

P<0,05 = significativo, sendo ^a vs Controle; ^b vs DRC; ^c vs CaMg.

4.2.2. Bioquímica

Os animais urêmicos apresentaram níveis aumentados de creatinina, magnésio, PTH, FGF23 e menor hematócrito em relação aos animais com função renal normal. Por outro lado, não houve diferença no Ca iônico, Ca urinário e P sérico entre os animais com DRC.

O tratamento com acetato de cálcio diminuiu significativamente os níveis séricos de PTH e FGF23, mas aumentou a calciúria. Já o Osvaren® levou a um aumento significativo do magnésio sérico, cujo nível foi maior que todos os outros grupos do estudo (Tabela 8).

Tabela 8 - Bioquímica

	Controle (N=10)	DRC (N=10)	CaMg (N=5)	Ca (N=8)
Ht (%)	50,0±1,7	40,0±7,2 ^a	41,0±2,1 ^a	42,7±2,5 ^a
Cr(mg/dL)	0,6±0,1	1,3±0,6 ^a	1,9±0,4 ^a	1,8±0,5 ^a
ClCr/100g(ml/min)	0,70±0,18	0,26±0,10 ^a	0,20±0,13 ^a	0,27±0,17 ^a
Cai (mmol/L)	1,15±0,08	1,10±0,09	1,14±0,06	1,12±1,10
iPTH (pg/ml)	105(65-199)	398(166-2607) ^a	571(124-1672)	124(77-657)
FGF23 (pg/ml)	170±60	1194±682 ^a	799±254 ^a	548±69 ^{a,b}
Mg (mg/dL)	1,8±0,1	2,0±0,2 ^a	3,2±0,5 ^{a,b}	2,2±0,2 ^{a,c}
P (mg/dL)	5,7±0,9	6,7±1,4 ^a	7,1±1,7 ^a	5,8±1,6 ^a
FeP (%)	9.1±4.8	7.6±4.6	0.5±0.3 ^{a,b}	0.6±0.7 ^{a,b}
CaU (mg/vol)	1,8±0,9	3,6±2,1	6,1±5,1	13,5±4,3 ^{a,b,c}

Ht: hematócrito; Cr: creatinina; ClCr/100g: clearance de creatinina corrigido pelo peso corporal; Cai: cálcio iônico; FGF23 : fibroblast growth factor; Mg: magnésio; P: fósforo; FeP: fração de excreção de fósforo; CaU: cálcio urinário de 24 hs.
P<0.05 = significativo, sendo ^a vs Controle; ^b vs DRC; ^c vs CaMg.

4.2.3. Histomorfometria óssea

4.2.3.1. *Turnover*

A taxa de formação óssea do grupo DRC foi semelhante a do grupo controle, bem como a superfície osteoblástica, osteoclástica, de reabsorção e os parâmetros osteóides. No entanto, animais tratados com acetato de cálcio apresentaram BFR maior do que os tratados com Osvaren[®], enquanto a terapia com este último quelante aumentou a superfície osteoblástica, a espessura, volume e superfície osteóides (Tabela 9, Figura 18).

Tabela 9 - Histomorfometria óssea - *Turnover*

	Controle (N=7)	DRC (N=9)	CaMg (N=5)	Ca (N=7)
BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$)	0,04 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02 ^b
Ob.S/BS(%)	8,3(2,6 $\pm$ 9,8)	4,8(4,2 $\pm$ 6,5)	25,9(16,1 $\pm$ 76,1) ^a	10,8(3,6 $\pm$ 22,5)
Oc.S/BS(%)	4,0 $\pm$ 2,6	3,2 $\pm$ 1,5	3,0 $\pm$ 1,2	2,2 $\pm$ 1,5
ES/BS(%)	14,3 $\pm$ 5,7	12,3 $\pm$ 5,1	16,0 $\pm$ 6,2	11,1 $\pm$ 4,2
OV/BV(%)	0,45(0,26 $\pm$ 0,54)	0,28(0,23 $\pm$ 0,39)	1,6(0,9 $\pm$ 4,8) ^a	1,1(0,3 $\pm$ 1,9)
OS/BS(%)	9,4 $\pm$ 5,0	7,1 $\pm$ 2,7	22,5 $\pm$ 12,0 ^{a,d}	18,1 $\pm$ 15,0
O.Th(μm)	2,0(1,5 $\pm$ 2,0)	1,6(1,3 $\pm$ 1,7)	3,1(2,6 $\pm$ 4,5) ^a	2,1(1,5 $\pm$ 2,3)

BFR/BS: taxa de formação óssea; Ob.S/BS: superfície osteoblástica; Oc.S/BS: superfície osteoclástica; ES/BS: superfície de reabsorção ; OV/BV: volume osteóide; OS/BS: superfície osteóide; O.Th: espessura osteoide.

P<0,05 = significativo, sendo ^a vs DRC; ^b vs CaMg; ^c vs Ca, ^d vs Controle

Figura 18 - Histomorfometria óssea - *Turnover*

4.2.3.2. Mineralização

Não observamos diferença na taxa de aposição mineral (MAR), no intervalo de mineralização (MLT) e na superfície de mineralização (MS/BS) entre os animais DRC e Controle, mas os animais que receberam Osvaren[®] apresentaram MLT significativamente maior que todos os outros grupos do estudo (Tabela 10, Figura 19).

Tabela 10- Histomorfometria óssea - Mineralização

	Controle (N=7)	DRC (N=9)	CaMg (N=5)	Ca (N=7)
MS/BS (%)	4,5±2,6	2,8±1,3	4,1±2,1	4,4±2,7
MAR (µm/d)	0,8±0,5	0,8±0,3	0,8±0,3	1,0±0,3
Mlt (d)	6,8±5,6	6,5±4,4	28,0±13,0 ^{a,b,d}	6,4±4,1

MS/BS: superfície de mineralização; MAR: taxa de aposição mineral; MLT: intervalo de mineralização.

P<0,05 = significativo, sendo ^a vs DRC; ^b vs CaMg; ^c vs Ca, ^d vs Controle.

Figura 19 - Histomorfometria óssea – Mineralização

4.2.3.3 Volume

O grupo DRC apresentou volume ósseo, número de trabéculas e separação trabecular semelhantes aos do grupo controle, mas a espessura trabecular foi menor, e o tratamento com acetato de cálcio manteve este efeito (Tabela 11, Figura 20).

Tabela 11 – Histomorfometria óssea - Volume

	Controle (N=7)	DRC (N=9)	CaMg (N=5)	Ca (N=7)
BV/TV (%)	27,4±5,0	30,2±3,4	25,6±4,5	26,6±5,3
Tb.Th (µm)	71,7±2,4	63,7±3,9 ^a	67,5±11,0	64,5±8,3 ^a
Tb.Sp (µm)	197,6±49,4	149,3±25,2	203,1±53,8	187,0±58,4
Tb.N (N/mm)	3,8±0,6	4,7±0,5	3,8±0,9	4,2±0,9

BV/TV: volume trabecular; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação trabecular;
Tb.N: número de trabéculas.

P<0,05 = significativo, sendo ^a vs Controle, ^b vs DRC ^c vs CaMg.

Figura 20 - Histomorfometria óssea- Volume

4.2.4. Calcificação vascular

4.2.4.1. *Von Kossa* e Conteúdo de cálcio

Não observamos CV em nenhum grupo, mas os animais DRC apresentaram conteúdo de cálcio significativamente maior que os animais do grupo Controle e os quelantes de P não modificaram este resultado (Tabela 12).

Tabela 12 – Conteúdo de cálcio da aorta abdominal

	Controle (N=10)	DRC (N=10)	CaMg (N=5)	Ca (N=8)
Conteúdo de cálcio ($\mu\text{mol/g}$)	9,6(8,6-10,6)	16,1(13,3-28,5) ^a	15,8(13,5-66,6)	18,0(15,7-19,9) ^a

4.2.5. Imunohistoquímica de paratireóide

4.2.5.1. PCNA

A proliferação das paratireóides foi significativamente maior no animais do grupo DRC e os quelantes reduziram o número de células PCNA positivas, embora significância estatística só tenha sido alcançada no grupo Ca, já que o no grupo CaMg, só 3 animais foram analisados, contra 7 do grupo Ca.

Figura 21 - Imunohistoquímica das paratireóides - PCNA

4.2.5.2. CaSR

Os quelantes de P aumentaram a expressão do receptor de cálcio, sendo que a porcentagem de área marcada nas paratireoides foi significativamente maior nos grupos CaMg e Ca.

Figura 22 – Imunohistoquímica de paratireóides - CaSR

5. Discussão

O Osvaren[®] é uma associação de quelantes de P já utilizados isoladamente (carbonato de magnésio/acetato de cálcio), lançada recentemente na Europa que mostrou-se eficaz em reduzir o P e o PTH nos dois estudos clínicos disponíveis na literatura ^{45, 46}. Além do baixo custo, o Osvaren[®] agregaria outras vantagens como a ingestão de menor quantidade de cálcio elementar e os efeitos benéficos já associados ao magnésio na DRC, como a inibição da secreção de PTH e da CV. Baixos níveis de magnésio também já foram associados à dislipidemia, diabetes e a síndrome metabólica, comorbidades frequentemente presentes no doente renal crônico ^{62, 63, 64}.

Além da escassez de estudos clínicos, o Osvaren[®] não foi avaliado em nenhum estudo experimental, tampouco se sabe seu efeito na OR; portanto, decidimos avaliar seu efeito no metabolismo mineral e ósseo nos modelos experimentais de DRC mais comumente utilizados, o da nefropatia induzida por adenina e a NX5/6.

O modelo de uremia experimental induzido por adenina evolui com HP secundário, doença óssea de alta remodelação e CV cuja gravidade depende da dose e tempo de administração da adenina ⁵³. Em nosso estudo, administramos a dose de adenina utilizada por Nagano *et al* ⁵⁴ e os animais que receberam adenina evoluíram com hiperfosfatemia, HP secundário à DRC e com doença óssea de alta remodelação caracterizada por aumento da taxa de formação óssea (BFR) e de osteóide. Além disso, os

animais também ficaram hipertensos. Por outro lado, não observamos CV nos animais não tratados com quelantes de P, como o fez Katsumata *et al*, cujo estudo utilizou dieta com concentrações muito semelhantes de Ca e P, mas usou adenina em concentração maior (0.75% por 4 semanas), o que provavelmente explica esta diferença ⁶⁵. Os animais submetidos à NX5/6 evoluíram com HP secundário, doença óssea de alta remodelação e maior conteúdo de cálcio na aorta abdominal. Em experimento realizado anteriormente, comparamos os dois modelos de DRC e detectamos que o modelo NX5/6 evoluiu com maior conteúdo de cálcio na aorta após 9 semanas do insulto renal inicial (nephrectomia 5/6) quando comparado ao modelo adenina (4 semanas de adenina, 5 semanas sem adenina) ⁵⁶, o que atribuímos ao maior tempo de DRC no grupo NX5/6, já que o animal tem uma redução aguda da filtração glomerular no momento da nephrectomia, enquanto que no modelo adenina são necessários alguns dias para que a DRC se estabeleça.

Os animais que receberam adenina evoluíram com poliúria e como pudemos observar na histologia renal, a adenina causou uma nefropatia predominantemente túbulo-intersticial com fibrose, destruição importante dos túbulos renais e mínimas alterações glomerulares. Sabemos que o P tem papel importante na progressão da DRC ⁶⁶ e observamos uma redução significativa do volume urinário dos animais que receberam tratamento da hiperfosfatemia. O efeito dos quelantes em reduzir a absorção de P, e consequentemente o pool corpóreo total de P e a FeP, apesar do P sérico mantido, talvez possa explicar esse efeito. No experimento 2, observamos

que os animais submetidos à NX5/6, também evoluíram com maior débito urinário, mas ao contrário do experimento 1, o acetato de cálcio aumentou mais ainda o volume urinário, o que atribuímos à calciúria que foi significativamente maior que todos os outros grupos.

O atual experimento mostrou que nos dois modelos de uremia, os quelantes acetato de cálcio e Osvaren[®] foram equivalentes na redução da absorção intestinal de P, avaliada através da FeP, mas não reduziram o P sérico. Os quelantes também não alteraram o cálcio iônico, mas a calciúria aumentou significativamente nos animais que receberam acetato de cálcio. Os níveis de PTH também não apresentaram redução significativa, mas observamos uma tendência a menores níveis séricos no grupo Ca, enquanto que o FGF23 reduziu significativamente no grupo Ca do modelo NX5/6. Esses resultados são incongruentes com os estudos clínicos disponíveis, nos quais os pacientes tratados com Osvaren[®] apresentaram níveis plasmáticos de P e PTH significativamente menores, quando comparados a pacientes tratados com sevelamer⁴⁶ e carbonato de cálcio⁴⁵. Além disso, no modelo NX5/6, o grupo de animais tratado com Osvaren[®] apresentou uma mortalidade elevada, o que acabou por reduzir o número final de animais a cinco. A perda de função renal predispõe ao aumento do nível sérico de Mg⁶⁷. Provavelmente essa maior mortalidade seja decorrente da hipermagnesemia, favorecida por um modelo de doença renal predominantemente glomerular que é o modelo NX5/6, já que não observamos tal mortalidade no modelo adenina, diante de níveis semelhantes de Mg sérico nos grupos CaMg dos dois experimentos. Para tal

confirmação seria necessário avaliar o magnésio urinário, já que o Mg sérico foi significativamente elevado e semelhante nos dois experimentos.

Acreditamos que nos dois modelos de DRC, a hiperfosfatemia foi mantida as custas da intensa reabsorção óssea, já que o aporte dietético de P foi o mesmo para todos os grupos, e o efeito dos quelantes na remodelação óssea não foi tão intenso a ponto de causar uma doença adinâmica, a qual também justificaria a hiperfosfatemia. Esse resultado foi diferente dos estudos anteriores que mostraram redução da hiperfosfatemia com o uso de sevelamer⁶⁵ e lantânio no modelo adenina⁵⁵, mas é importante ressaltar que estes estudos começaram a administração dos quelantes na terceira semana de adenina, ou seja, mais precocemente, o que provavelmente culminou com menores níveis de P sérico. Além disso, não avaliaram a FeP, que diante de nossos resultados, é fundamental no estudo do balanço de P.

No modelo adenina, os quelantes de P reduziram a reabsorção e a formação ósseas, e favoreceram um acúmulo de osteóide. Comparando os dois quelantes, não houve diferença estatisticamente significativa nesses parâmetros, mas tais alterações tenderam a ser mais intensas no grupo Ca. Katsumata *et al*, administraram sevelamer por 5 semanas aos animais, após duas semanas de dieta com adenina 0.75%, e observaram uma redução do osteóide e fibrose. Já Dament *et al*, tiveram resultados semelhantes aos nossos após 22 semanas de carbonato de lantânio em animais que receberam adenina 0.75% por 3 semanas. O lantânio reduziu o volume trabecular e a fibrose, mas a superfície osteoblástica e osteoclástica

mantiveram-se elevados, bem como a superfície e volume osteóides ⁶⁸. É importante frisar que nenhum desses estudos avaliou os parâmetros dinâmicos ósseos através da administração de tetraciclina, mas Oste *et al*, em 2007, estudando a doença óssea em ratos submetidos à NX5/6, submetidos à dieta pobre e rica em P, cuja histomorfometria óssea foi realizada 6 e 12 semanas após a nefrectomia, mostrou que animais com insuficiência renal moderada (o que ele considerou creat > 1.0), evoluíram com aumento de osteóide (volume, perímetro e espessura) independente da quantidade de P da dieta. Curiosamente, os animais submetidos à dieta pobre em P apresentaram defeito na mineralização óssea, caracterizado por um maior intervalo de mineralização e menor taxa de aposição mineral, quando comparados aos animais submetidos à dieta rica em P ⁶⁹. Damment *et al*. testaram essa hipótese estudando ratos submetidos a NX5/6 e mostraram que a dieta pobre em P e o tratamento com carbonato de lantânio diminuíram a mineralização óssea ⁷⁰. Esse mecanismo provavelmente explica o acúmulo de osteóide que nós encontramos nos animais que receberam os quelantes de P de nosso estudo, já que a menor absorção intestinal de P pode ter reduzido a quantidade deste íon disponível para a mineralização óssea. Por outro lado, no experimento 2, observamos que os animais do grupo Osveren[®] apresentaram maior número de osteoblastos e maior intervalo de mineralização comparado ao grupo Ca. Sabemos que o magnésio potencializa o efeito do pirofosfato, formando com o mesmo um complexo estável, resistente à ação da pirofosfatase, e consequentemente dificultando a mineralização óssea ⁷¹. Além disso, o PTH do grupo CaMg foi

numericamente maior que o do grupo Ca, apesar de não ter atingido significância estatística, o que justificaria uma doença óssea mais severa, com maior número de osteoblastos.

A DRC levou ao aumento do conteúdo de cálcio da aorta abdominal nos dois experimentos, no entanto somente os animais tratados do experimento 1 calcificaram, apesar da administração de cálcio através dos quelantes de P. Talvez isso seja explicado novamente pelas características peculiares a cada modelo experimental de DRC já que sabemos que o modelo NX5/6 desenvolve CV após 12 semanas da nefrectomia se submetido a sobrecarga de P e/ou calcitriol e nosso estudo teve nove semanas de duração. Além disso, os quelantes de P foram administrados imediatamente após a cirurgia, o que provavelmente preveniu um maior acúmulo de P.. No experimento 1, a CV ocorreu em três animais do grupo Ca e em um animal do grupo CaMg, Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que cálcio, P e PTH têm papel na CV ^{10,72,73} mas estudos clínicos ainda são controversos em relação ao efeito dos quelantes de P a base de cálcio ^{74, 75,7} e estudos experimentais com o acetato de cálcio inexistem. Phan *et al.* observaram redução da CV em animais propensos à aterosclerose (deficientes em apolipoproteína E) submetidos à NX por eletrocautério, quando tratados com carbonato de cálcio por 8 semanas, e atribuiu esse resultado ao melhor controle do P ⁷⁶. O mesmo resultado foi observado por Davies *et al* em animais com doença óssea adinâmica e DRC induzida por NX5/6 ⁷⁷. Já o Mg parece ter um efeito contrário, prevenindo a CV ^{42,44}. Os animais tratados com CaMg nos dois experimentos, apresentaram Mg sérico

maior, mas o grupo Ca evoluiu com maior calciúria, ou seja, foram submetidos a uma maior sobrecarga de Ca e provavelmente tiveram maior propensão a calcificar, apesar de calcemia semelhante e menor PTH, não nos permitindo atribuir a menor prevalência de calcificação no grupo Osvaren[®] ao Mg.

Em relação às paratireóides, os animais urêmicos apresentaram número de células PCNA positivas maior que os animais com função renal normal em ambos os experimentos, e os quelantes de P reduziram a proliferação, mas esse efeito só foi significativo com o quelante acetato de cálcio. Nagano *et al*, obtiveram resultado semelhante em animais submetidos à NX5/6 tratados com sevelamer por 4 semanas⁷⁸. Sabemos que a manutenção de níveis séricos normais de P e Ca é necessária para prevenir a hiperplasia das paratireóides na DRC^{79, 80}, mas no atual estudo não observamos redução do P, nem aumento do Ca, nos animais tratados com quelantes que justifique a menor proliferação de células nos animais do grupo Ca, mesmo porque a redução da FeP foi equivalente com ambos os quelantes. Por outro lado, a quantidade de Ca elementar do acetato de cálcio é maior, o que pode justificar o menor número de células PCNA positivas e o menor PTH observado nesses animais. Uma evidência de que esses animais foram submetidos a uma maior sobrecarga de Ca é a maior calciúria apresentada por eles. Mais uma vez, esse é o primeiro estudo com esses quelantes em modelos experimentais de uremia. Em relação ao CaSR nas paratireóides, ambos os quelantes aumentaram sua expressão nos dois experimentos, provavelmente devido ao melhor controle da sobrecarga de P,

já que sabemos de estudos anteriores que a restrição de P é capaz de reverter a *downregulation* do CaSR na uremia experimental^{81, 82}.

Comparando os dois quelantes de P, o acetato de cálcio teve efeitos similares nos dois modelos, com redução do PTH, da proliferação das paratireóides, acúmulo de osteóide, e favorecimento da CV, enquanto o Osvaren[®] levou a consequências significativas no modelo NX5/6, com maior mortalidade, prejuízo na mineralização óssea, e manutenção dos níveis de PTH. Talvez isso seja explicado pelo efeito da sobrecarga de magnésio em diferentes tipos de nefropatias. No caso da adenina, predominantemente tubular e, no caso da NX5/6, predominantemente glomerular. Apesar de níveis séricos semelhantes de Mg observados nos dois modelos, não dosamos o Mg urinário o que contribuiria para avaliarmos se o modelo adenina apresenta maior excreção urinária pela nefropatia tubular. A hipermagnesemia é uma complicação que requer atenção com o uso do quelante Osvaren[®], já que pode causar arritmias e pacientes em diálise podem ter magnésio sérico elevado⁸³.

Um resultado de impacto em nosso estudo foi a manutenção dos níveis de P sérico e o acúmulo de osteóide com o uso de quelantes de P. Esse achado enfatiza a importância da análise do balanço de P do paciente, incluindo a dosagem da FeP, já que o P sérico isoladamente não nos permite entender a comunicação entre intestino, osso, rim e paratireóide. O atual estudo nos fez concluir que diante de uma alta remodelação óssea, níveis altos de P são necessários para que a mineralização óssea seja mantida. Então nos perguntamos se em pacientes com HP severo os

quelantes de P são prejudiciais para o osso, afinal não estamos reduzindo o risco de CV, pois o P sérico não diminui, mas talvez estejamos dificultando a mineralização óssea desses pacientes. Para termos essa resposta, teríamos que estudar pacientes com este perfil e submetê-los à biópsia óssea após determinado período de tempo em tratamento com quelantes de P, sem utilizar concomitantemente medicações como análogos de vitamina D ou calcimiméticos. Do ponto de vista ético, um estudo como este parece inviável.

O quelante Osvaren[®] mostrou eficácia equivalente à do acetato de cálcio na redução da absorção do P intestinal; no entanto não observamos redução do PTH observada em estudos clínicos e nem podemos afirmar que inibiu a CV através do Mg já a quantidade de Ca elementar de sua fórmula é menor que a do acetato de cálcio. A maior mortalidade dos animais nefrectomizados submetidos ao tratamento com Osvaren[®] precisa ser esclarecida em novo estudo experimental, com maior número de animais e com dosagem periódica do Mg sérico bem como do Mg urinário. Em relação à OR, estudos clínicos com biópsia óssea são necessários para se averiguar os efeitos deste quelante na mineralização óssea.

A dosagem do magnésio urinário é imprescindível para uma melhor avaliação do balanço deste íon nos modelos de DRC NX5/6 e adenina, e esta foi uma limitação do nosso estudo. Também não foi possível realizar a dosagem de calcitriol no experimento 2. O reduzido número de animais do grupo CaMg do experimento 2 decorrente da alta mortalidade pode ter prejudicado os resultados finais, principalmente da histomorfometria óssea,

cuja numerosas variáveis demandam um número maior de animais para uma adequada estatística.

6. Conclusão

O Osvaren[®] foi tão eficaz quanto o acetato de cálcio na redução da absorção de P intestinal, no entanto, os animais tratados com o último apresentaram menores níveis de PTH, FGF23, bem como menor proliferação de células da paratireóide.

O acetato de cálcio levou a uma sobrecarga de Ca, evidenciada por maior calciúria nos dois experimentos, e maior prevalência de CV avaliada por *Von Kossa*, no modelo adenina.

No modelo de DRC por adenina, ambos os quelantes reduziram o *Turnover* ósseo e levaram a um acúmulo de osteóide, sem diferença entre os grupos tratados. Porém, no modelo NX5/6, o Osvaren[®] reduziu significativamente a mineralização óssea e levou ao acúmulo de osteóide quando comparado ao acetato de cálcio.

A alta mortalidade dos animais tratados com Osvaren[®] no modelo NX5/6 precisa ser melhor elucidada e pode estar relacionada a um maior acúmulo de Mg favorecido por modelo de uremia predominantemente glomerular. Esse acúmulo de magnésio também pode ter prejudicado a mineralização óssea.

7. Referências

- ¹ KDIGO - Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int.* 2009; 76 (S113): S3-8.
- ² Torres PA, Brawere DP. Three feedback loops precisely regulating serum phosphate concentration. *Kidney Int.* 2011; 80: 443-445.
- ³ Lopes I, Rodriguez-Ortiz ME, Almadén Y, Guerrero F, Oca AM, Pineda C, *et al.* Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int.* 2011; 80: 475-482.
- ⁴ Hruska KA, Mathew S. Chronic Kidney Disease Mineral Bone Disorder (CKD-MBD). Chronic Kidney Disease Mineral Bone Disorder (CKD-MBD). *Primer on the metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 2008; 73: 343-9.
- ⁵ Block GA, Klassen P, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie E, Chetow G. Mineral metabolism, mortality and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15: 2208–18.
- ⁶ Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yon C, Gales B, Sider D, *et al.* Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *New England J of Med.* 2000; 342 (20): 1478-83.
- ⁷ London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier S, Pannier B, Adda H. Arterial Media Calcification in End Stage Renal Disease: impact in all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 1731-40.
- ⁸ Watanabe R, Lemos M, Manfredi SR, Draibe SA, Canziani ME. Impact of Cardiovascular Calcification in Nondialyzed Patients after 24 Months of Follow-up. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5: 189-94.
- ⁹ Li X, Yang HI, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research.* 2006; 98: 905-12.
- ¹⁰ Lomashvili K, Garg P, O'Neil WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification *in vitro* . *Kidney Int.* 2006; 69:1464-70.
- ¹¹ Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 2004; 66: 2293-9.
- ¹² Gracioli FG, Neves KR, Reis LM, Gracioli RG, Noronha IL, Moysés RA, *et al.* Phosphorus overload and PTH induce aortic expression of Runx2 in experimental uraemia. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24: 1416–21.

-
- ¹³ Young E, Akiba T, Albert JM, Mc Carthy JT, Kerr PG, Mendelssohn DC, Jadoul MD. Magnitude and Impact of Abnormal Mineral Metabolism in Hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J of Kidney Diseases*. 2004, 44 (5), Suppl 2, S34-S38.
- ¹⁴ Hernandez FR, Barreto FC, Rocha LA, Draibe SA, Canziani ME, Carvalho AB. Evaluation of the role of severe hyperparathyroidism on coronary artery calcification in dialysis patients. *Clin Nephrol*. 2007; 67 (2): 89-95.
- ¹⁵ Kalantar-Zadeh K, Gutekunst L, Mehrotra R, Kovesdy CP, Bross R, Shinaberger CS, Noori N, *et al*. Understanding Sources of Dietary Phosphorus in the Treatment of Patients with Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010; 5: 519–530.
- ¹⁶ Achinger SG, Ayus RC. The role of daily dialysis in the control of hyperphosphatemia. *Kidney Int*. 2005; 67 (S95): 28-32.
- ¹⁷ Noordzij M, Korevaar JC, Bos WJ, Boeschoten E, Dekker FW, Bossuyt PM, *et al*. Mineral metabolism and cardiovascular morbidity and mortality risk: peritoneal dialysis patients compared with haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 2513-20.
- ¹⁸ Kopple JD. National Kidney Foundation K/DOQI clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*. 2001; 37 (S2): S66-S70.
- ¹⁹ Alfrey AC, Mishell J M, Burks J, Contigluglia ST, Rudolph H, Lewin E, *et al*. Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic renal hemodialysis. *Trans Am Soc Artif Organs*. 1972; 18:257-61.
- ²⁰ Pierides AM, Edwards WG, Cullum UX, McCall JT, Ellis HA. Hemodialysis encephalopathy with osteomalatic fractures and muscle weakness. *Kidney Int*. 1980; 8: 115-24.
- ²¹ Mai M, Emmett M, Sheikh MS, Santa Ana CA, Schiller L, Fordtran JS. Calcium acetate, an effective phosphorus binder in patients with renal failure. *Kidney Int*. 1989; 36: 690-5.
- ²² Savica V, Calò LA, Monardo P, Santoro D, Bellinghieri G. Phosphate binders and management of hyperphosphatemia in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 2065-8.
- ²³ Bushinsky DA. Contribution of Intestine, Bone, Kidney, and Dialysis to Extracellular Fluid Calcium Content. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010; 5 (Suppl1): S12-S22.
- ²⁴ Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin Nephrol*. 2005; 63: 146-57.

-
- ²⁵ Emmet M. A comparison of clinically useful phosphorus binders for patients with chronic kidney failure. *Kidney Int.* 2004 ; (Suppl 90): S25–S32.
- ²⁶ Chertow GM, Burke SK, Lazarus JM, Stenzel KH, Wombolt D, Goldberg D, *et al.* Renagel: A noncalcemic phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29: 66-71.
- ²⁷ Slatopolsky EA, Burke SK, Dillon MA. The RenaGel Study Group: RenaGel, a nonabsorbed calcium – and aluminum - free phosphate binder, lowers serum phosphorus and parathyroid hormone. *Kidney Int.* 1999; 55: 299-307.
- ²⁸ Pai AB, Shepler BM. Comparison of Sevelamer hydrochloride and sevelamer carbonate: risk of metabolic acidosis and clinical implications. *Pharmacotherapy* 2009; 29 (5): 554-61.
- ²⁹ Chertow GM, Burke SK, Lazarus JM, Stenzel KH, Wombolt D, Goldberg D, *et al.* Poly (allylamine hydrochloride) (RenaGel): a noncalcemic phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29 (1): 66-71.
- ³⁰ Chertow GM, Burke SK, Raggi P. Treat to Goal Working Group: Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002; 62: 245-52.
- ³¹ Barreto DV; Barreto FC; Carvalho AB; Cuppari L; Draibe SA; Dalboni MA; *et al.* Phosphate Binder Impact on Bone Remodeling and Coronary Calcification – Results from the BRIC Study. *Nephron Clin Pract.* 2008; 110:c273–c283.
- ³² Hart HE, Greenberg J, Lewin R, Spencer H, Stern KG, Laszlo D. Metabolism of Lanthanum and yttrium chelates. *J Lab Clin Med.* 1955; 46: 182-92.
- ³³ Stewart J. Administration of a novel phosphate binder, Fosrenol with food is associated with good tolerability and low systemic absorption (abstract). *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 386.
- ³⁴ Damment SJP, Gill M. The pharmacokinetics and tissue distribution of lanthanum carbonate, a new non-aluminum, non-calcium phosphate binder (abstract). *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 204 A.
- ³⁵ Lacour B, Lucas A, Auchere D, Ruelan N, Patey N, Drueke T. Chronic renal failure is associated with increased tissue deposition of lanthanum after 28-day oral administration. *Kidney Int.* 2005; 67: 1062-69.
- ³⁶ Slatopolsky E, Liapis H, Finch J. Progressive accumulation of lanthanum in the liver of normal and uremic rats. *Kidney Int.* 2005; 68: 2809-13.

-
- ³⁷ Spiegel DM. The Role of Magnesium Binders in Chronic Kidney Disease. *Seminars in Dialysis*. 2007; 20 (4): 333-6.
- ³⁸ Tzanakis IP, Oreopoulos DG. Beneficial effects of magnesium in chronic renal failure: a foe no longer. *Int Urol Nephrol*. 2009; 41: 363-371.
- ³⁹ Spiegel DM, Farmer B, Smits G, Chonchol M. Magnesium Carbonate Is an Effective Phosphate Binder for Chronic Hemodialysis Patients: A Pilot Study. *Journal of Renal Nutrition*. 2007; 17 (6): 416–422.
- ⁴⁰ Tzanakis IP, Papadaki NA, Wei M, Kagia S, Spadidakis V, Kallivretakis N, *et al*. Magnesium carbonate for phosphate control in patients on hemodialysis. A randomized controlled trial. *Int Urol Nephrol*. 2008; 40 (1):193-201.
- ⁴¹ Vetter T; Lohse MJ. Magnesium and the parathyroid. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2002, 11: 403-10.
- ⁴² Meema HE, Oreopoulos DG, Rapoport A. Serum magnesium level and arterial calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 1987; 32: 388-94.
- ⁴³ Meema HE, Oreopoulos DG, Deveber GA. Arterial calcifications in severe chronic renal disease and their relationship to dialysis treatment, and parathyroidectomy. *Radiology*. 1977: 121:315-21.
- ⁴⁴ Tzanaki I, Pras A, Kounali D, Mamali V, Kartsonakis V, Mayopoulou D, *et al*. Mitral annular calcifications in haemodialysis patients: a possible protective role of magnesium. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12: 2036-7.
- ⁴⁵ Deuber HJ. Long-term efficacy and safety of an oral phosphate binder containing both calcium acetate and magnesium carbonate in hemodialysis patients. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten*, Jahrgang 2004 (33): S 403-408.
- ⁴⁶ Francisco AL; Leidig M; Covic AC; Ketteler M; Lorens EB; Mircescu GM; *et al*. Evaluation of calcium acetate/magnesium carbonate as a phosphate binder compared with sevelamer hydrochloride in haemodialysis patients: a controlled randomized study (CALMAG study) assessing efficacy and tolerability. *Nephrol Dial Transplant* . 2010; DOI: 101093/ndt/gfq292.
- ⁴⁷ Wei M, Esbaei K, Bargman J, Oreopoulos DG. Relationship between serum magnesium, parathyroid hormone, and vascular calcification in patients on dialysis: a literature review. *Perit Dial Int*. 2006; 26:366–73.
- ⁴⁸ Wei M, Esbaei K, Bargman JM, Oreopoulos DG. Inverse correlation between serum magnesium and parathyroid hormone in peritoneal dialysis patients: a contributing factor to adynamic bone disease. *Int Urol Nephrol*. 2006; 38: 327-32.

-
- ⁴⁹ Heggveit HA, Herman L, Mishra RK. Cardiac necrosis and calcification in experimental magnesium deficiency. *Magnesium deficiency*. 1962; 45(5):757-82.
- ⁵⁰ Planells E, Llopis J, Péran F, Aranda P. Changes in tissue calcium and phosphorus content and plasma concentrations of PTH and calcitonin after long-term magnesium deficiency in rats. *J Am Coll Nutr*. 1995; 14 (3): 292-8.
- ⁵¹ Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: a review. *Am J Nephrol*. 2010;31:471-81.
- ⁵² Yokosawa T, Oura H, Okada T. Metabolic effects of dietary purine in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1982; 28: 519-26.
- ⁵³ Tamagaki K, Yuan Q, Ohkawa H. Severe Hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcifications in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 651-59.
- ⁵⁴ Nagano N, Miyata S, Abe M, Kobayashi M, Wakita S, Yamashita T, *et al*. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF23 in renal failure rats. *Kidney Int*. 2006; 69:531-7.
- ⁵⁵ Neven E, Dams G, Postnov A, Chen B, Clerck ND, Broe NE, *et al*. Adequate phosphate binding with lanthanum carbonate attenuates arterial calcification in chronic renal failure rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; doi: 10.1093/ndt/gfn737.
- ⁵⁶ Ferrari GO, Ferreira JF, Cavallari RT, Dominguez WV, Gracioli FG, *et al*. Experimental CKD-MBD: a Comparison between 5/6 Nephrectomy and Adenine Models (abstract). *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22: 638A.
- ⁵⁷ Shimamura T, Morrison AB. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol*. 1995; 79: 95–106.
- ⁵⁸ 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.
- ⁵⁹ Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis J, Maluche H, Meunier P, *et al*. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Miner Res*. 1987; 2: 595-610.
- ⁶⁰ Moe SM, Chen NX, Seifert MF, Sinders RM, Duan D, Chen X, *et al*. A rat model of chronic kidney disease-mineral bone disorder. *Kidney Int*. 2009; 75: 176-184.
- ⁶¹ Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, *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.

-
- ⁶² Kao WH, Folsom AR, Nieto FJ, Mo JP, Watson R, Brancati F. Serum and dietary magnesium intake and the risk for type 2 diabetes mellitus: the atherosclerosis risk in communities study. *Arch Int Medicine*. 1999; 159 (18): 2151-9.
- ⁶³ Song Y, Manson JE, Buring JE, Liu S. A prospective study of read met consumption and type 2 diabetes in middle-aged and elderly women: the women's health study. *Diabetes Care*. 2004; 27 (9): 2108-15.
- ⁶⁴ He K, Liu K, Daviglus ML, Morris SJ, Loria CM, Van Horn L, *et al*. Magnesium intake and incidence of metabolic syndrome among young adults. *Circulation*. 2006; 113 (13): 1675-82.
- ⁶⁵ Katsumata K, Kusano K, Hirata M, Tsunemi K, Nagano N, Burke SK, *et al*. Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int*. 2003; 64: 441-50.
- ⁶⁶ Neves K, Graciolli F, Reis L, Pasqualucci C, Moysés R, Jorgetti V. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. *Kidney Int*. 2004; 66: 2237-44.
- ⁶⁷ Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Garcia-Perez J. Clinical Implications of Disordered Magnesium Homeostasis in Chronic Renal Failure and Dialysis. *Seminars in dialysis*. 2009; 22: 37-44.
- ⁶⁸ Damment S, Secker R, Shen V, Lorenzo V, Rodriguez M. Long-term treatment with lanthanum carbonate reduces mineral and bone abnormalities in rats with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* . 2011; 26: 1803-12.
- ⁶⁹ Oste L, Behets G, Dams G, Bervoets A, Marynissen R, Geryl H. Role of Dietary Phosphorus and Degree of Uremia in the Development of Renal Bone Disease in Rats. *Renal Failure*. 2007; 29: 1-12.
- ⁷⁰ Damment SJ, Shen V. Assessment of effects of lanthanum carbonate with and without phosphate supplementation on bone mineralization in uremic rats. *Clin Nephrol* 2005; 63 (2): 127-37.
- ⁷¹ Drueke T: Does magnesium excess play a role in renal osteodystrophy?. *Contrib Nephrol* . 1984; 38: 195-204.
- ⁷² Shanahan CM. Vascular calcification – a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* . 2006; 21: 1166-69.
- ⁷³ Neves KR, Graciolli FG, Reis L, Graciolli RG, Neves CL, Magalhães AO, *et al*. Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int*. 2007; 71: 1262-70.

-
- ⁷⁴ Barreto D, Barreto F, Carvalho A, Cuppari L, Draibe S, Dalbomi MA, *et al.* Phosphate binder impact on Bone Remodeling and Coronary Calcification – Results from the BRIC Study. *Nephron Clin Pract* 2008; 110: 273-83.
- ⁷⁵ Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* . 2004; 19 [5]: 59-66.
- ⁷⁶ Phan O, Ivanovski O, Nikolov I, Joki N, Maizel J, Louvet L, *et al.* Effect of oral calcium carbonate on aortic calcification in apolipoprotein E-deficient (apo E-/-) mice with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 82-90.
- ⁷⁷ Davies M, Lund R, Mathew S, Hruska k. Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* . 2005; 16: 917-28.
- ⁷⁸ Nagano N, Myiata S, Obana S, Kobayashi N, Abe M, Fukushima N, Wada M. Sevelamer hydrochloride, a calcium-free phosphate binder, inhibits parathyroid cell proliferation in partially nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18 (3): 81-5.
- ⁷⁹ Nave-Many T, Rahamimov R, Livni N, Silver J. Parathyroid cell proliferation in Normal and Chronic Renal Failure Rats. The Effects of Calcium, Phosphate, and Vitamin D. *J Clin Investigation* 1995; 96:1786-93.
- ⁸⁰ Ritter C, Finch J, Slatopolsky E, Brown A. Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int* . 2001; 60:1737-44.
- ⁸¹ Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, *et al.* Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphate directly stimulates PTH secretion *in vitro*. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2534–40.
- ⁸² Ritter CS, Martin DR, Lu Y, Slatopolsky E, Brown A. Reversal of secondary hyperparathyroidism by phosphate restriction restores parathyroid calcium sensing receptor expression and function. *J Bone Miner Res*. 2002; 17: 2206-13.
- ⁸³ Okuno S, Inaba N. Magnesium in hemodialysis patients. New perspectives in magnesium research. Nutrition and health. 2ed, London: Springer 2007; 316-29.

ANEXO