

Melani Ribeiro Custódio

Avaliação do efeito isolado do fósforo e do paratormônio sobre o tecido cardíaco de ratos urêmicos paratireoidectomizados

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

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

São Paulo
2007

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante”.

Charles Chaplin

Agradecimentos

Dra. Vanda Jorgetti

Minha orientadora, um modelo de Mulher: pesquisadora brilhante, médica admirável, incansável na sua luta, sensível e feminina, dona de um coração imenso, que abriga o mundo. Com você tenho aprendido muito, crescido...graças à sua compreensão, incentivo, paciência e carinho.

Sinto tanto orgulho de às vezes poder ser sua “cover”...

A sua amizade continua sendo a minha maior conquista.

Sem ar de “despedida”... esta sessão vai ser leve, simples e alegre:

Meu filhos Luciano, Rafael e Flávio

Sinto-me orgulhosa em perceber que, freqüentemente, vocês é que têm sido meus modelos de perseverança, ousadia e determinação. É um privilégio.

O amor por vocês é imenso, incondicional e eterno.

Minhas queridas “meninas” Daniela, Vanessa, Thaís e Mariana

Muito além do sentimento de responsabilidade, o do amor que compartilha, principalmente coisas da alma feminina. Maravilhoso, é uma benção ter vocês!!!

Roberto

Meu amigo, companheiro de muitos momentos importantes, sempre me apoiando, incentivando, dividindo as alegrias e dificuldades do caminho.

Jair e Cristina

Meus amigos irmãos, presentes toda uma vida no meu dia a dia, incansáveis em ouvir, partilhar. Me dão a certeza de que não estou só.

...

Dra. Viktoria Woronik

São muitos anos de convivência, de uma amizade profunda, compartilhando tantos momentos e experiências importantes de nossas vidas.

Minha amiga Vick, não sei como te agradecer o apoio que sempre torna mais fácil meus momentos “dark”. Mas, da próxima vez (?), vai para a sessão família.

Dra. Rosa M. A. Moysés

Fico feliz quando olho para trás e vejo o início de uma carreira que progrediu brilhantemente e tão rápido! E hoje, Rosinha, você distribui com carinho, a Glória e a Fama para todos que estão ao seu redor (inclusive eu). Você é demais!!!

Dr. Roberto Zatz

A minha admiração por você é imensa. Não sei o que brilha mais: se o pesquisador ou o ser humano simples, carinhoso, sempre próximo quando precisamos. É um privilégio conviver com você e escutar as histórias de “minerin”

Dr. Joel Heimann

Mais do que os ensinamentos de hipertensão, obrigada pelo carinho e brincadeiras em cada encontro no lab.

Aproveito para estender meu carinho e gratidão a Dra. Clarice, Dra. Denise Malheiros, Dra. Regina, Dr. Praxedes, Dr. Luis Yu, Dr. Hugo, Dr. João Egídio e à toda equipe da Nefrologia: residentes, enfermeiros, secretárias (especialmente Denise, Neide, Eliana, Célia) e todos os funcionários (Janice e Walter).

Obrigada por todos estes anos de ensinamento, colaboração e amizade.

Dra. Irene Noronha

Através do mundo das imunohistoquímicas, ganhei conhecimento e uma amiga.

Dr. Rui Toledo Barros

Cheguei até aqui porque o senhor me abriu as portas deste brilhante serviço de nefrologia, me incentivou e, aprendi que ser cobrada, também faz parte. Sou eternamente grata.

Dr. Carlos A. Pasqualucci

Pelo apoio nas análises histológicas, pela colaboração técnica do seu laboratório. Foi de grande importância para meu trabalho.

Minha família Ósseo Metabólica:

Fabi - Nosso modelo de elegância! Tenho acompanhado com o maior orgulho seu crescimento... Guiachellinha, sei que implica comigo, mas no fundo me ama.

Dani - minha amiga querida, parceira na organização do lab. Conviver com você é bem leve, acho que é reflexo da Disney...

Carol - aquele tempo juntas, é inesquecível. Sinto muita sua falta, e agora, a do Pedrinho também.

Kátia - nossa "Magaldinha", brilhante! Viabilizou nossos projetos, sem palavras...Será que é o sol de Salvador?

Andréa - minha partner de tese, projetos, é muito bom compartilhar de sua alegria, bom humor e ainda aprender tantos apelidos.

Lulú

O seu agradecimento é especial porque você e o Marc trouxeram uma alegria tão grande para nós: este serzinho amado que é o Lucas, o mais novo membro de nossa família, está nos dando a oportunidade de trocar fraldas, dar colo. Não é um sucesso?

Wagner

Você faz tantas contas, tabelas e confusão na minha cabeça, que não cabe junto com ninguém. De novo, o que seria de nós todas sem você?

Obrigada também pelo companheirismo das noites passadas no lab, dos cinemas, vinhos, do caminho de volta para casa...

Alúzio

Conviver e aprender com você é um prazer...

São tantas lembranças gostosas, alegres...

Cris e Cilene - agregadas especiais, amigas e companheiras...

Cris Karohl - amiga carinhosa, diretamente do sul, Secretment poderosa!

Mariana - com a tarefa inglória de nos emagrecer e, tão especial, que merece mesmo um armador.

Rozi - encontramos pouco, como sol e lua, mas, o carinho é o mesmo.

Meire - obrigada pelo carinho. Sua amizade é importante para mim.

Rita - Com seu jeitinho tímido, especial, sempre pronta para colaborar.

Rodrigo - Será que é karma ter que agüentar nós todas? E sempre gentil

Ludmila, Bia, Juliana, Cris, Luciene, Patrícia, Flávia, Verônica e Verônica (iniciação) - muito gostoso conviver com vocês, espero que ainda tenhamos muito tempo pela frente.

Wagner, Rafa - a tese de vocês podia ser: Emagreça com pouco esforço!!!

Patrícia e Valéria - muito gracinhas, fazendo parte do nosso ambula.

Fábio Montenegro - uma história muito longa de parceria, amizade e troca de experiências. Um amigo muito querido.

Philippe - meu primeiro "iniciante científico". Sua participação foi valiosa para o meu trabalho. Fiquei encantada com sua responsabilidade e capacidade de aprendizado.

Ivone - amiga querida, o que seria de nós sem seus conhecimentos, sua colaboração e paciência ?

Tatiana e Fátima (LIM51) - obrigada pela ajuda imunohistoquímica.

A todo LIM 16

Estou aqui há um longo tempo, convivendo com vocês, em diferentes tempos e profundidade. São muitas as alegrias, trabalhos, comemorações, angústias e dificuldades partilhados. Obrigada pelo carinho e paciência de todos vocês.

Márcia Koike - Sem sua colaboração este trabalho não teria sido completo. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos que foram além da morfologia miocárdica.

Dr. Clóvis De Carvalho Frimm

Obrigada por ter me aberto as portas do LIM 51, pela colaboração valiosa ao meu projeto.

Ao Instituto do Rim de Uberlândia

Dr. Hélio Teixeira e Dr. Paulo César de Oliveira - Há muitos anos vocês vêm colaborando com um sonho que agora é uma conquista. Sem a compreensão e amizade de vocês isto não seria possível. Obrigada!!

Heloísa e Deusdélia- muito mais que colaboradoras, minhas amigas sempre presentes, principalmente nos momentos difíceis. Vocês fazem diferença, me dão aquela sensação de que sou importante, necessária e querida!

A toda equipe de enfermagem, Dra. Carina, colaboradores, funcionários e pacientes: espero ser importante para vocês como são para mim.

Minhas filhas adotivas Chiquinha e Silemar: muito queridas e especiais

A todos, obrigada pelo carinho de cada volta.

A Universidade Federal de Uberlândia, especialmente à Nefrologia:
Agradeço a colaboração da direção do Hospital das Clínicas, de todos os meus amigos e colegas que deram suporte à minha ausência.

Aos outros amigos

Reúno aqui as pessoas queridas que convivem comigo...são muitos nomes e rostos. Podem ter certeza de que não esqueci de ninguém.
Obrigada por aquela palavrinha, aquele abraço, aquela força.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos Ratinhos que participaram deste projeto...

Obrigada por serem instrumentos de nosso aprendizado.
Sem vocês, a história dos Homens não seria a mesma. Espero que sempre os resultados sejam revertidos em benefícios de muitos.

Ao Universo

Que compactuou para que hoje fosse Hoje.
Que abriga meus entes queridos e os deixa mais próximos.
Uma energia de amor que envolve a gente.
Que esta força continue sempre viva dentro de mim,
Impulsionando e fazendo a diferença no meu Caminho.

OBRIGADA!!!

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 - Fatores de risco para DCV	2
1.1.1 - Fatores de risco tradicionais	2
1.1.2 - Fatores de risco relacionados à terapia dialítica	2
1.1.3 - Fatores de risco relacionados à uremia	3
1.2 - Remodelação cardíaca ou HVE	7
1.2.1 - Estrutura do coração	7
1.2.2 - Definição e fisiopatologia da remodelação cardíaca	8
1.3 - Interrelação da DRC e RC.....	14
2. Objetivos	16
3. Material e Métodos	17
3.1 - Seleção dos animais	17
3.2 - Paratireoidectomia (PTX)	17
3.3 - Nefrectomia 5/6 (Nx) e implante de mini-bomba osmótica	18
3.4 - Dietas	19
3.5 - Grupos experimentais	19
3.6 - Medida da pressão arterial caudal (PAC).....	21
3.7 - Coleta de sangue e obtenção de fragmentos cardíacos	21
3.8 - Avaliação bioquímica.....	21
3.9 - Histologia do tecido cardíaco	22
3.9.1 - Preparo do tecido cardíaco	22
3.9.2 - Parafinização do tecido cardíaco	22
3.9.3 - Desparafinização e colorações histológicas	23
3.9.4 - Avaliação da histologia miocárdica	25
3.9.5 - Avaliação histológica das artérias coronarianas	26
3.9.6 - Imuno-histoquímica.....	27
3.10 - Avaliação da imuno-histoquímica.....	32
3.11 - Análise estatística	32
4. Resultados	34
4.1 - Características gerais e bioquímicas.....	34
4.2 - Hipertrofia miocárdica.....	37
4.3 - Fibrose miocárdica	37
4.4 - Imuno-histoquímica	38
4.5 - Análise dos vasos coronarianos	41
4.6 - Análise de correlação univariada	45
4.7 - Análise de regressão linear múltipla.....	46
5. Discussão	48
6. Conclusão	58
7. Referências Bibliográficas	59

Lista de Figuras

Figura 1.	Patogênese da doença cardíaca na insuficiência renal crônica	10
Figura 2.	Esquema dos grupos experimentais	20
Figura 3.	Diâmetros dos miócitos nos diferentes grupos, expressos em μm	37
Figura 4.	Fração de volume de colágeno na região subendocárdica, nos diversos grupos	38
Figura 5.	Fotomicrografias de tecido miocárdico com expressão de TGF- β em vaso (A) e fibras miocárdicas (B)	38
Figura 6.	Quantificação da expressão de TGF- β no miocárdio, expressa em %	39
Figura 7.	Fotomicrografias de tecido miocárdico com expressão de angio II em vaso (A) e fibras miocárdicas (B)	39
Figura 8.	Quantificação da expressão de angio II no miocárdio, expressa em %	40
Figura 9.	Fotomicrografias de tecido miocárdico mostrando vasos com diferentes escores de lesão: escore 0 (A), escore 1 (B), escore 2 (C) e escore 3 (D)	42
Figura 10.	Escore médio de lesão dos vasos coronarianos avaliados nos diferentes grupos.....	43
Figura 11.	Fotomicrografias de tecido miocárdico com expressão de α -actina em vaso normal (A) e vaso calcificado (B).....	43
Figura 12.	Quantificação da expressão da α -actina nos vasos coronarianos	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados gerais dos animais do estudo	35
Tabela 2 - Análise bioquímica e do hematócrito dos animais	36
Tabela 3 - Análise da espessura da camada média dos vasos coronarianos	41
Tabela 4 - Correlação univariada de parâmetros morfológicos.....	45
Tabela 5 - Regressão múltipla dos parâmetros morfológicos	46
Tabela 6 - Regressão múltipla dos parâmetros avaliados por imuno-histoquímica	47

Resumo

Custódio MR. *Avaliação do efeito isolado do fósforo e do paratormônio sobre o tecido cardíaco de ratos urêmicos paratireoidectomizados* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 70p.

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de mortalidade nos pacientes com doença renal crônica (DRC) e a hipertrofia de ventrículo esquerdo (HVE), a alteração mais freqüente. A remodelação cardíaca (RC) patológica ocorre em resposta a agressões como sobrecarga de volume ou de pressão e é influenciada por ativação neurohormonal, fatores locais, inflamação, isquemia, necrose e apoptose celular. Os miócitos são as principais células envolvidas na RC. Avaliamos o papel da hiperfosfatemia e do paratormônio (PTH) em animais urêmicos. Trinta e dois ratos Wistar machos foram submetidos à paratireoidectomia (PTX) e nefrectomia (Nx), com reposição contínua de PTH em concentração fisiológica (PTHf= 0,022 µg/100g/h) ou elevada (PThE=0,11µg/100g/h). Os animais *sham* (N=16) foram operados e recebiam infusão de veículo. Apenas o conteúdo de fósforo nas dietas era diferente, ou seja: pobre=0,2% (pP) ou rica em fósforo=1,2% (rP). Dividimos os animais em 6 grupos: **Sham**: Sham-pP (G1), Sham-rP (G2); **PTX+Nx**: PTHf-pP (G3), PTHf-rP (G4), PThE-pP (G5), PThE-rP (G6). Semanalmente determinamos o peso e a pressão arterial caudal. Creatinina, fósforo, cálcio PTH e hematócrito foram analisados. Após 8 semanas os animais foram sacrificados. A hipertrofia e fibrose miocárdicas foram analisadas com o sistema digital Leica. O peso do coração corrigido por 100g peso corporal foi maior nos grupos G5 e G6 e apresentou uma correlação positiva com hipertrofia e fibrose miocárdica. A hipertrofia e fibrose foram menores no G3, quando comparado aos grupos Nx. A hipertrofia miocárdica foi maior no G6, evidenciando o papel do P neste processo. A fibrose miocárdica ocorreu principalmente em subendocárdio e foi mais intensa no G6. Analisamos a expressão do fator transformador de crescimento (TGF-β) e angiotensina II que foram mais intensas nos grupos G5 e G6. As lesões das artérias coronarianas foram avaliadas de forma semi-quantitativa e os animais G5 e G6 mostraram calcificações de camada média. A expressão da α-actina se correlacionou negativamente com as lesões coronarianas. Nossos resultados demonstraram a importância do fósforo e PTH na fisiopatologia da DCV, sendo necessário um melhor controle destes elementos para prevenção de mortalidade nos pacientes com DRC.

Descritores: doença cardiovascular, hiperfosfatemia, paratormônio, hipertrofia de ventrículo esquerdo, remodelação cardíaca, fibrose, angiotensina II, calcificação vascular.

Summary

Custódio MR. *Evaluation of the isolated effect of phosphorus and parathyroid hormone on the cardiac tissue of parathyroidectomized uremic rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 70p.

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of mortality in patients with chronic kidney disease (CKD), and left ventricular hypertrophy (LVH) is the most common alteration. Pathologic cardiac remodeling (CR) occurs in response to injuries such as volume or pressure overload, and it is influenced by neurohormonal activation, local factors, inflammation, ischemia, necrosis and cellular apoptosis. Myocytes are the principal cells involved in CR. We evaluated the role of hyperphosphatemia and parathyroid hormone (PTH) in uremic animals. Thirty-two male Wistar rats were submitted to parathyroidectomy (PTX) and nephrectomy (Nx), with PTH continuous replacement in physiologic concentration (PTHf=0.022 μ g/100g/h) or elevated (PTH_e=0.11 μ g/100g/h). The sham animals (N=16) were operated and received vehicle infusion. Only the phosphorus content in diets was different, that is: poor = 0.2% (pP) or rich in phosphorus = 1.2% (rP). We divided the animals into 6 groups: **Sham**: Sham-pP (G1), Sham-rP (G2); **PTX+Nx**: PTHf-pP (G3), PTHf-rP (G4), PTH_e-pP (G5), PTH_e-rP (G6). We determined the weight and caudal blood pressure weekly. Creatinine, phosphorus, PTH calcium and hematocrit were analyzed. After 8 weeks, the animals were sacrificed. Myocardial hypertrophy and fibrosis were analyzed using Leica digital system. The weight of the heart corrected for 100g body weight was greater in groups G5 and G6 and presented a positive correlation with myocardial hypertrophy and fibrosis. Hypertrophy and fibrosis were lower in G3, when compared to Nx groups. Myocardial hypertrophy was higher in G6, determining the role of P in this process. Myocardial fibrosis occurred mainly in subendocardium and was more intense in G6. We analyzed the expression of transforming growth factor (TGF- β) and angiotensin II, which were more intense in groups G5 and G6. Coronary artery lesions were evaluated semiquantitatively and G5 and G6 animals showed middle layer calcifications. Expression of α -actin correlated negatively with coronary lesions. Our results demonstrated the importance of phosphorus and PTH in the pathophysiology of CVD; therefore, a better control of these elements is required in order to prevent mortality in patients with CKD.

Keywords: cardiovascular disease, hyperphosphatemia, parathyroid hormone, left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling, fibrosis, angiotensin II, vascular calcification.

1. Introdução

Os estudos que avaliam a sobrevida dos pacientes portadores de doença renal crônica (DRC) vêm despertando grande interesse nas últimas décadas.

Lindner e cols em 1974 descreveram elevada incidência de doença coronariana e morte por acometimento cardíaco nesses pacientes [1]. Ainda nos dias atuais, a doença cardiovascular (DCV) responde por aproximadamente 50% dos óbitos e um terço das hospitalizações de pacientes com DRC [2]. A DCV acomete pacientes de todas as idades e diferentes tempos em diálise, como demonstraram Goodman e cols estudando calcificação coronariana em adultos jovens [3].

De acordo com a American Heart Association, a presença de albuminúria e elevação da creatinina na população geral são consideradas fatores de risco independentes para DCV e acometem aproximadamente 20 milhões de americanos, caracterizando uma verdadeira epidemia desse século [4]. A prevalência da hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e doença obstrutiva coronariana (DOC) é de 75% e 40% respectivamente nos pacientes com DRC [5,6].

Um fato relevante é que a maioria dos pacientes em diálise não morre de infarto agudo do miocárdio (IAM), mas, de morte súbita, provavelmente devido a mecanismos não coronarianos, que afetam a função cardíaca [7]. Nesses pacientes são observadas lesões secundárias a remodelação das

artérias, arteríolas e capilares miocárdicos, além das lesões decorrentes da hipertensão arterial (HA), e parecem estar dissociadas entre si. Estas lesões estariam contribuindo para a reduzida tolerância à isquemia, desenvolvimento de insuficiência cardíaca e arritmias [8].

1.1 - Fatores de risco para DCV

Diversos fatores de risco, relacionados à uremia e terapia dialítica, contribuem para aumentar a morbidade e mortalidade por DCV nos pacientes com DRC, além dos fatores tradicionais presentes na população geral. São eles:

1.1.1 - Fatores de risco tradicionais

Idade avançada, sexo masculino, história familiar, hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, diabetes melito, menopausa e sedentarismo [4,9]

1.1.2 - Fatores de risco relacionados à terapia dialítica

A terapia dialítica, especialmente a hemodiálise (HD), promove alterações inflamatórias decorrentes da exposição de células mononucleares circulantes à membrana do dialisador, favorecendo o desenvolvimento da DCV. Além disto, alterações hemodinâmicas, próprias da HD, contribuem para isquemia miocárdica principalmente quando associadas à anemia. Por outro lado, na população de pacientes em diálise peritoneal, a elevação da proteína C reativa (PCR) tem sido atribuída à bioincompatibilidade das

soluções de diálise peritoneal ou ainda aos componentes plásticos das bolsas que acondicionam o dialisato [10].

1.1.3 - Fatores de risco relacionados à uremia

Dentre os principais fatores [4,11,12,13,14,15] destacamos:

a) O **estresse oxidativo**, ou seja, substâncias resultantes do desequilíbrio entre produção de compostos oxidantes e antioxidantes, levam ao dano celular e aumentam o risco de DCV [5,16,17]. Na uremia, há uma ativação crônica e inadequada deste processo, que, além disso, favorece inflamação. Essa inter-relação é complexa, podendo o estresse oxidativo atuar tanto como causa como consequência da inflamação;

b) A **aterosclerose** atualmente é considerada uma inflamação crônica, resultante da disfunção endotelial, com produção de citocinas, tromboxane e fatores de crescimento, além do acúmulo de macrófagos e linfócitos T nas placas ateroscleróticas. Na DRC, a inflamação associada a uma aterosclerose acelerada contribui para a elevada mortalidade observada nessa população [18]. Desta forma, na aterosclerose vários processos estão interrelacionados: estresse oxidativo, disfunção endotelial, calcificação vascular e inflamação [19].

c) Os **distúrbios do metabolismo mineral**: Alterações no metabolismo do cálcio (Ca), fósforo (P), paratormônio (PTH) e do calcitriol contribuem para o desenvolvimento de DCV [20,21,22,23,24]. A hipocalcemia, a hiperfosfatemia, e a deficiência de calcitriol, decorrentes da perda de função renal, desencadeiam e perpetuam o hiperparatireoidismo secundário (HPT2)

que acomete cerca de 50% dos pacientes com DRC [24,25]. Esses distúrbios, e medidas terapêuticas (uso de quelantes de fósforo a base de cálcio e de calcitriol em doses farmacológicas) empregadas para corrigi-los, favorecem o desenvolvimento de calcificações extra-ósseas [25,26]. Recentemente, constatou-se que o FGF23 (da família das fosfatoninas) participa da fisiopatologia da DCV aumentando a excreção de fósforo e diminuindo a síntese de 1, 25(OH)VD [27].

Cerca de 60% dos pacientes em diálise apresentam calcificação cardíaca (achados de autópsia). Os depósitos de cálcio são encontrados no sistema de condução, nas válvulas cardíacas, em arteríolas e artérias coronárias, levando a anomalia na condução, estenose e/ou refluxo valvular, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e óbito [28].

Tanto o PTH quanto o calcitriol aumentam a quantidade de Ca nos cardiomiócitos e células musculares lisas de vasos, alterando o metabolismo oxidativo, afetando a pressão e a contratilidade cardíaca. Estes eventos deixam o coração criticamente dependente de oxigênio e, portanto, mais susceptível à isquemia [29].

O coração apresenta receptores de PTH e *in vitro*, foi demonstrado que esse hormônio induz hipertrofia dos cardiomiócitos [30]. Estudos clínicos mostram a participação do PTH na HVE, fibrose e calcificação da camada média das artérias independentemente da pressão arterial, favorecendo a disfunção diastólica e arritmias [31,32].

Na DRC, para manter uma remodelação óssea adequada, preconiza-se que os valores de PTH sejam mantidos entre 2 a 3 vezes o maior valor da

normalidade [33]. Entretanto, para o sistema cardiovascular, esses valores deveriam ser menores, ou seja, em torno de 60 pg/ml, uma vez que, como já descrevemos, o excesso de PTH contribui para o desenvolvimento da DCV [31].

Recentemente, Block e cols demonstraram que valores de PTH acima de 600 pg/mL se correlacionaram positivamente com maior mortalidade e frequência de hospitalizações [34].

Aproximadamente 70% dos pacientes com DRC apresentam hiperfosfatemia ($P > 1,6 \text{ mmol/l}$), decorrente da excreção insuficiente do P absorvido da dieta e da falta de excreção renal. Sabe-se que o tratamento dialítico corrige parcialmente o P sérico, pois apenas 0,02% desse elemento encontra-se no plasma, portanto, acessível a depuração [35].

Classicamente, a importância do controle do P, na DRC, era atribuída ao seu papel na patogênese do HPT2 [36], mas, atualmente sabe-se que a hiperfosfatemia (fósforo sérico $> 5,5 \text{ mg/dl}$) aumenta a mortalidade decorrente de complicações cardiovasculares. O mesmo efeito foi detectado em relação ao Ca, ao produto cálcio X fósforo (Ca X P) e ao PTH [34].

O mecanismo exato, através do qual, a hiperfosfatemia aumenta a mortalidade não é bem conhecido, porém, cada vez mais se reconhece sua participação no desenvolvimento da calcificação vascular. O excesso de P é capaz de induzir a transformação fenotípica de células musculares lisas de vasos em osteoblastos. Essas células modificadas passam, então, a sintetizar e a mineralizar proteínas nas paredes vasculares [37]. Estudo de Jono e cols demonstraram, *in vitro*, que esta mudança fenotípica promovida

pelo P associava-se a um aumento na atividade do co-transportador sódio fósforo (Pit-1), favorecendo sua entrada nas células e levando a formação de cristais de apatita em células que normalmente não mineralizam [38,39]. Descreveu-se também a indução, estimulada pelo P, do Cbfa-1 (*Core binding factor-1*), fator determinante da diferenciação osteoblástica, na célula muscular lisa de vasos [37].

Uma outra via (indireta), pela qual o excesso de P induziria a calcificação vascular, seria aumentando a secreção de PTH que, por sua vez, aumenta a remodelação óssea (doença óssea de alto remanejamento), liberando cálcio e fósforo para a circulação e favorecendo a calcificação. Entretanto, a calcificação vascular também é observada na doença óssea de baixa remodelação, sendo que nesta situação, seria devido ao menor tamponamento ósseo do cálcio e fósforo que permanecendo no plasma, poderiam se depositar nos vasos e/ou partes moles [40,41].

Nos indivíduos normais, mesmo com concentrações fisiológicas de cálcio e fósforo, poderiam ocorrer calcificações vasculares, o que não acontece pela presença de inibidores desse processo como, por exemplo: a MGP (Matrix GLA protein), OPG (osteoprotegerina), fetuína-A e os pirofosfatos. Nos pacientes com DRC, alguns desses inibidores estão diminuídos, facilitando o aparecimento de calcificação [40].

A deficiência de calcitriol é um fator importante no desenvolvimento do HPT2 que ocorre desde as fases iniciais da DRC. Entretanto, sabe-se também que doses elevadas de calcitriol (usado para tratamento do HPT2),

promovendo maior absorção intestinal de cálcio e fósforo, favorecem o processo de calcificação, aumentando o risco CV [42].

A vitamina D (VD), além de atuar no metabolismo cálcio-fósforo e no tecido ósseo, apresenta outras ações. O receptor de VD é encontrado em inúmeros tecidos, inclusive coração, parede dos vasos, rins e células imunológicas e, como ligante de fator de ativação transcripcional, regula vários genes envolvidos em outros processos fisiológicos [43]. Levin e cols demonstraram em pacientes com HVE, uma associação entre diminuição de mortalidade e tratamento com calcitriol ou análogos. Potencialmente, seriam três os mecanismos que explicariam este efeito cardioprotetor da VD: a regulação da inflamação, a ação na hipertrofia e proliferação celular e no sistema renina-angiotensina [44,45,46,47].

Outros estudos mostraram que a VD exerce um papel na contração, proliferação, maturação e expressão de proteínas da célula cardíaca, entre elas, o colágeno. Assim, sugere-se que a VD seja importante na manutenção do tônus vascular e débito cardíaco [48].

Diante do exposto, o alto risco para DCV na DRC resulta de múltiplos fatores, como alterações hemodinâmicas, do metabolismo mineral e endócrino, que isoladamente ou em associação, desencadeiam a hipertrofia ou remodelação cardíaca e, posteriormente, insuficiência cardíaca (IC).

1.2 - Remodelação cardíaca ou HVE

1.2.1 - Estrutura do coração

Os principais componentes do músculo cardíaco são:

Miócitos - São células alongadas e ramificadas ligadas por junções intercelulares complexas. A estrutura e função das proteínas contráteis presentes nos miócitos são praticamente as mesmas das células do músculo esquelético [49].

Fibroblastos - Constituem cerca de dois terços das células cardíacas e são responsáveis principalmente pela síntese de colágeno e metaloproteinases. Os fibroblastos, em condições patológicas, se transdiferenciam em miofibroblastos aumentando a síntese de colágeno, enquanto sua degradação pelas metaloproteinases da matriz, encontra-se inalterada ou até diminuída [50].

Células musculares lisas e células endoteliais - Revestem internamente os vasos sangüíneos e estão unidas entre si por meio de zonas de oclusão,

Matriz extracelular - É formada por uma rede de colágeno fibrilar, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e moléculas de sinalização, Possui também colágenos do tipo I, III, IV, V e VI, assim como elastina.

A matriz extracelular possui função mecânica, suportando e mantendo a arquitetura do tecido, mas também regula funções celulares como migração, sobrevivência, proliferação e diferenciação [49,50].

1.2.2 - Definição e fisiopatologia da remodelação cardíaca

A remodelação cardíaca é uma resposta adaptativa do coração a uma agressão, levando a alterações funcionais, celulares e moleculares, Macroscopicamente, o coração apresenta modificações no seu tamanho e forma.

Algumas das causas de remodelação são: IAM, sobrecarga de pressão (estenose de aorta, hipertensão), doença inflamatória do miocárdio (miocardite), cardiomiopatia dilatada idiopática ou sobrecarga de volume [50].

A essência da hipertrofia cardíaca é um aumento do número de unidades geradoras de força (sarcômeros) no miócito bem como do tecido conectivo, dos capilares e terminações nervosas.

Em nível celular, a hipertrofia do cardiomiócito se caracteriza por aumento do seu tamanho devido a um incremento da síntese protéica. Analisando molecularmente, ocorre uma alteração gênica, levando a maior expressão fenotípica dos genes de beta-miosina de cadeia pesada e da α -actina esquelética. Há uma alteração das relações beta/alfa miosina e da α -actina esquelética/cardíaca, levando a anormalidades na contração cardíaca [51].

O processo de hipertrofia cardíaca também é caracterizado por um acúmulo exagerado de colágeno no interstício e ao redor das artérias e arteríolas coronarianas. O excesso de colágeno ventricular é resultado do aumento da sua síntese pelo fibroblasto e miofibroblasto e da diminuição da sua degradação pelas metaloproteinases da matriz. Os miofibroblastos diferem dos fibroblastos (não estimulados) por expressarem α -actina de músculo liso e produzirem maiores quantidades de colágeno [51].

Fatores hemodinâmicos e não hemodinâmicos estão envolvidos neste desequilíbrio de síntese/degradação do colágeno e, portanto, da remodelação cardíaca.

a) Fatores hemodinâmicos:

A figura 1 resume os principais fatores envolvidos na remodelação cardíaca

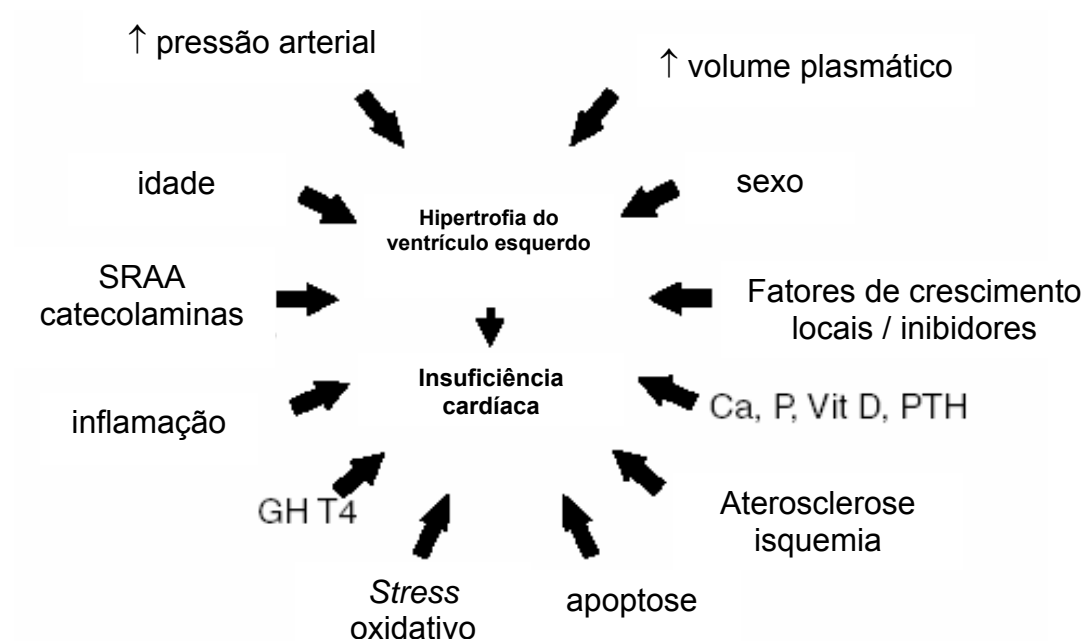


Figura 1. Patogênese da doença cardíaca na insuficiência renal crônica. (Adaptado de G.M. London)

(Clinical Epidemiology of Cardiovascular Diseases in Chronic Kidney Disease, vol 16 (2) 85-94, 2003)

A sobrecarga de pressão e/ou volume são estímulos que levam ao estiramento dos miócitos e aumento do estresse de parede no ventrículo, favorecendo a produção e liberação local de angiotensina II, norepinefrina e endotelina, que promovem a expressão de proteínas e hipertrofia dos miócitos. O aumento do estresse de parede é compensado por um aumento paralelo das unidades contráteis de cardiomiócitos, como citado anteriormente. Há um espessamento do VE e a progressão da hipertrofia favorece o desenvolvimento da IC. A deterioração do trabalho cardíaco

aumenta a ativação neurohormonal, elevando a produção de aldosterona e citocinas que estimulam mais ainda a síntese de colágeno [13].

Desta forma, ocorre um aumento desproporcional da matriz extracelular, mantendo a eficiência mecânica da contração cardíaca, as custas de enchimento diastólico prejudicado.

A disfunção diastólica é a principal anormalidade observada nos pacientes com IC, muitas vezes com função sistólica preservada.

O mesmo ocorre em modelo animal, onde foi observado que a inflamação também tem uma importante participação na remodelação cardíaca. A sobrecarga de pressão provoca um processo inflamatório perivascular, com transmigração precoce de macrófagos, produção de citocinas, fator transformador de crescimento (TGF- β), que induzindo a síntese de colágeno do tipo I e III, inicia o processo de fibrose, se estendendo posteriormente, para o interstício [52].

b) Fatores não hemodinâmicos:

Dois diferentes achados sugerem que fatores não hemodinâmicos também contribuem para a fibrose ventricular nos pacientes hipertensos. Em primeiro lugar, a fibrose tem sido identificada não só no VE, como também no VD, septo interventricular e átrio esquerdo. O segundo achado se refere à capacidade de algumas drogas, como os inibidores da enzima de conversão (ECA) e antagonistas de receptor tipo I da angiotensina, diminuírem a fibrose. Esse efeito é independente da ação anti-hipertensiva [53, 54].

Assim, a fibrose pode ser conseqüência da perda de regulação que normalmente existe entre moléculas profibróticas e antifibróticas e, a participação do sistema renina-angiotensina-aldosterona é particularmente importante.

O aumento da angiotensina II é decorrente da produção sistêmica e local e exerce múltiplos efeitos profibróticos no tecido cardíaco, induzindo hiperplasia do fibroblasto, sua diferenciação em miofibroblasto, ativação das vias de síntese de colágeno e inibição das vias de degradação. Além disto, a fibrose parece ser uma resposta à inflamação e ao estresse oxidativo induzidos pela angiotensina II, através de sua interação com receptor tipo I nas células do endotélio vascular [55].

A angiotensina II estimula a secreção de aldosterona e como o coração possui receptores para mineralocorticóides, esse hormônio também contribui para a indução do estresse oxidativo e fenótipos pro-inflamatórios/fibrogênicos. Deve-se destacar a presença freqüente de hiperaldosteronismo secundário na IC e que o uso da espironolactona (compete com receptor da aldosterona) favorece a redução da fibrose miocárdica [56,57].

A remodelação cardíaca é influenciada pela liberação de neurotransmissores, hormônios e substâncias vasoativas. Dependendo do fator desencadeante, outros processos podem ocorrer no miocárdio interagindo com a remodelação, tais como isquemia, necrose celular e apoptose [49].

A **apoptose** é uma forma programada de morte celular, caracterizada por fragmentação do DNA, condensação da cromatina, levando a formação de núcleos picnóticos e corpos apoptóticos. A mitocôndria induz a morte celular, liberando proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, entre elas as caspases. Quando há uma agressão miocárdica, a apoptose pode favorecer a hipertrofia miocárdica e disfunção do VE. Os mecanismos que levam a apoptose incluem algumas citocinas, estresse oxidativo e lesão mitocondrial [50,58,59].

A **necrose** é uma forma abrupta de morte celular iniciada por um determinado estímulo, levando a edema de organelas intracelulares, ruptura da membrana plasmática, desintegração do citoplasma, resultando em rápida interrupção da homeostase da célula [59]

Outros fatores que estão envolvidos na remodelação cardíaca são:

a) Endotelinas: São peptídeos vasoconstritores potentes que geralmente estão elevados na IC [50].

b) Citocinas: O TNF- α (fator α de necrose tumoral) e algumas citocinas estão aumentados na IC, e esse aumento é proporcional a severidade da doença. A viabilidade celular depende de uma complexa interação entre indutores e inibidores de apoptose, os quais são susceptíveis a modulação das citocinas, como TNF- α , que indiretamente aumentam a apoptose e diretamente a necrose (efeito citotóxico) [50].

c) Estresse Oxidativo: A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre no miocárdio, aorta, rins e musculatura esquelética. A IC está relacionada com o estresse oxidativo, que tem um efeito deletério na

integridade estrutural do miocárdio e na sua função de contração. A mitocôndria é a principal fonte da produção de ROS e ocorre em resposta a ação de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF) e óxido nítrico (NO), modificando a função de transporte elétrico e gerando O₂. Desta forma, existe uma correlação fisiopatológica entre disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (semelhante ao que ocorre na idade e nas doenças degenerativas).

A angiotensina II tem um papel importante na estimulação de outros sistemas enzimáticos, como o NADPH (células endoteliais vasculares e musculares), que também são fontes produtoras de ROS. Assim, o estresse oxidativo tem um papel importante no desenvolvimento e progressão da remodelação e falência cardíaca [60].

d) Metaloproteinase da matriz (MMP): contribui para a remodelação cardíaca e sua atividade está aumentada na HVE e IC, especialmente em resposta ao estresse oxidativo e a angiotensina II. Apesar da complexidade do mecanismo, a ação aumentada desta enzima leva a degradação progressiva da matriz extracelular, explicando em parte, a dilatação que ocorre no VE, apesar do mecanismo de fibrose [61].

1.3 - Interrelação da DRC e RC

Existem fatores comuns na fisiopatologia e/ou progressão da DRC e RC e, muitas vezes, é difícil avaliar isoladamente esses fatores. A hiperfosfatemia, por exemplo, cursa freqüentemente com elevação dos níveis de PTH, e as intervenções terapêuticas podem promover calcificação vascular ou mesmo piorar a função renal.

Recentemente um modelo experimental de uremia, desenvolvido por Neves e cols, possibilitou avaliar o efeito isolado do P no tecido cardiovascular, onde se variou a concentração de P na dieta, fixando-se os níveis de PTH [22]. Neste estudo, alguns animais desenvolveram hiperfosfatemia marcante, aumento do coração e calcificações vasculares, independentes da uremia e da hipertensão arterial.

Esses resultados nos levaram a supor que o P poderia participar da ativação da célula miocárdica, uma vez que Meleti e cols demonstraram, em osteoblastos, que o aumento de fósforo intracelular poderia alterar o potencial de membrana mitocondrial, provocando morte celular [62].

Até o momento, sabe-se que a hiperfosfatemia é um fator de risco em pacientes com DCV, provavelmente por favorecer a calcificação vascular. Entretanto, pouco se sabe sobre sua ação (direta ou indireta) no músculo cardíaco, principalmente no processo da remodelação cardíaca [63]. Embora tenhamos demonstrado que a hiperfosfatemia isolada favorece a HV [22], os mecanismos que levaram a esta alteração não foram elucidados:

- a) Qual o papel do P e do PTH nos processos de hipertrofia, fibrose miocárdica e lesão dos vasos? É possível isolar a ação do P?
- b) Através de quais mecanismos o P e o PTH participariam da RC? Síntese de proteínas? Inflamação? Calcificação?

2. Objetivos

Avaliar o efeito isolado do fósforo e do PTH na remodelação cardíaca, analisando especialmente a hipertrofia, a fibrose miocárdica e calcificação vascular em animais urêmicos.

3. Material e Métodos

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPESQ nº 293/01 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 - Seleção dos animais

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

3.2 - Paratireoidectomia (PTX)

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg de peso) por via intra peritoneal (ip), para realização da PTX. Foi feita uma incisão cervical anterior com exposição da traquéia e tireóide. As paratireóides foram cauterizadas com bisturi elétrico, preservando-se a tireóide. A incisão foi fechada com fio de algodão 4-0 e aplicada uma dose de penicilina benzatina (100,000 UI/kg intramuscular). Os animais controles foram submetidos à anestesia com exposição da traquéia e tireóide e receberam a

mesma dose de antibiótico. A eficácia da paratireoidectomia foi confirmada pela dosagem de cálcio iônico, ou seja, foram considerados paratireoidectomizados os animais cujos níveis de cálcio sérico eram $\leq 0,9$ mmol/L.

3.3 - Nefrectomia 5/6 (Nx) e implante de mini-bomba osmótica

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

Para realização da nefrectomia 5/6 (Nx) os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg) ip, a seguir realizamos tricotomia na face anterior do abdômen seguida de laparotomia com exposição do rim esquerdo e ligadura de dois a três ramos da artéria renal esquerda. A seguir, foi realizada nefrectomia total do rim direito. A incisão foi fechada por planos (muscular e peritônio parietal) com fio categute cromado 4-0 e a pele com fio algodão 4-0. Simultaneamente à Nx, a atividade do PTH era restaurada através do implante de uma minibomba osmótica (Alzet modelo: 2mL₄, Alza Corp, Palo Alto, CA, USA) colocada na região subcutânea interescapular. Essa minibomba liberava o hormônio de forma constante e de acordo com a concentração escolhida, ou seja: PTH normal (1-34 rat PTH na dose de 0,022/100g/h) ou alto (1-34 rat PTH na dose de 0,11/100g/h) (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA). No 28^o dia, a mini-bomba foi substituída por uma nova, com o animal anestesiado com éter, mantendo-se as mesmas

concentrações de infusão referidas anteriormente. A troca foi necessária, pois a vida útil de cada mini bomba era de 28 dias. Essa incisão foi fechada com fio de algodão 4-0. Foi aplicada uma dose de penicilina benzatina (100.000 Ui/kg i.m.). Os animais controles foram submetidos à laparotomia, com manipulação do hilo renal e implante de mini-bomba osmótica contendo veículo (cisteína a 2% em solução salina 0,9%. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.4 - Dietas

Após a recuperação cirúrgica da Nx, os animais receberam dietas com distintas concentrações de fósforo: dieta rica em fósforo [1,2%], dieta pobre em fósforo [0,2%], de acordo com o grupo estudado. O protocolo *pair feeding* foi mantido até o final do experimento.

3.5 - Grupos experimentais

Grupo 1 (Sham-pP)

Ratos controles com infusão contínua de veículo e dieta pobre em fósforo.

Grupo 2 (Sham-rP)

Ratos controles com infusão contínua de veículo e dieta rica em fósforo.

Grupo 3 (Nx PTHf-pP)

Ratos nefrectomizados, paratireoidectomizados, com infusão contínua de PTH na dose de 0,022µg/100g/h (para manter níveis séricos de PTH dentro da faixa fisiológica) e dieta pobre em fósforo.

Grupo 4 (Nx PTHf-rP)

Ratos nefrectomizados, paratireoidectomizados, com infusão contínua de PTH na dose de $0,022\mu\text{g}/100\text{g}/\text{h}$ e dieta rica em fósforo.

Grupo 5 (Nx PTHe-pP)

Ratos nefrectomizados, paratireoidectomizados, com infusão contínua de PTH na dose de $0,11\mu\text{g}/100\text{g}/\text{h}$ (para manter os níveis séricos de PTH em 5 vezes acima da faixa fisiológica) e dieta pobre em fósforo.

Grupo 6 (Nx PTHe-rP)

Ratos nefrectomizados, paratireoidectomizados, com infusão contínua de PTH na dose de $0,11\mu\text{g}/100\text{g}/\text{h}$ e dieta rica em fósforo.

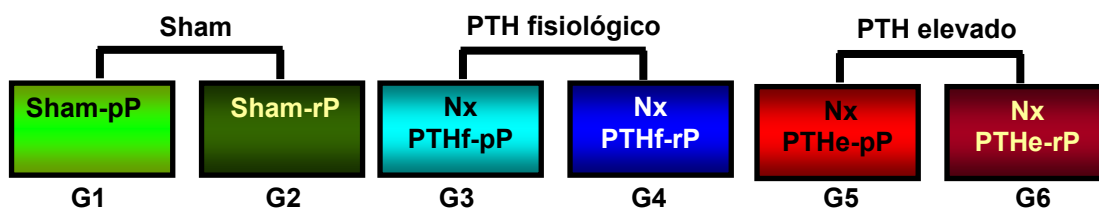


Figura 2. Esquema dos grupos experimentais.

3.6 - Medida da pressão arterial caudal (PAC)

As medidas de pressão arterial caudal foram realizadas nos animais acordados utilizando o método oscilométrico (Harvard Indirect Rat Tail Blood Pressure Monitor – Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, Kent, England). O equipamento estava conectado a um computador para o armazenamento e análise dos dados (CODAS-DATAQ Instruments). Os animais eram previamente treinados para adaptação a medida, ou seja, eram aquecidos em gaiola especial durante 30 minutos. A medida da PAC foi registrada 1 vez por semana.

3.7 - Coleta de sangue e obtenção de fragmentos cardíacos

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

3.8 - Avaliação bioquímica

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

3.9 - Histologia do tecido cardíaco

3.9.1 - Preparo do tecido cardíaco

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

3.9.2 - Parafinização do tecido cardíaco

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

Antes de serem seccionados, os blocos permaneceram 30 minutos a -20°C sendo então cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) na espessura de 5 µm. Os cortes foram colocados em lâminas previamente revestidas com gelatina 2% (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). Essas lâminas permaneceram na estufa

(Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60 °C por 2 horas e em seguida foram armazenadas a 4 °C.

3.9.3 - Desparafinização e colorações histológicas

Antes das colorações histológicas, as lâminas foram desparafinizadas em xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. A seguir, desidratadas em álcool absoluto (2 vezes), álcool 96% e álcool 70%. Finalizado este processo, as lâminas foram hidratadas e processadas para as diferentes colorações histológicas. Para a avaliação da fibrose e da hipertrofia miocárdica foi usado um sistema de imagem digital (Leica Imaging Systems Ltd. Cambridge, U).

a) Ácido periódico de Schiff (PAS)

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

Para o preparo do reagente de Schiff, foi adicionado 1 g de fucsina diamante (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 200 ml de água destilada fervente. Quando a temperatura atingiu 50 °C, esta solução foi filtrada em

papel de filtro fino adicionando-se então 30 ml de ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após atingir a temperatura ambiente, acrescentamos 9g de metabissulfito de sódio anidro (Merck, Darmstadt, Alemanha) e esta solução foi colocada em ambiente escuro durante 48 h. Após este período, a solução adquiriu coloração amarelo-palha. Foi então adicionado 1g de carvão ativo de Norita (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo filtrado com bomba a vácuo, adquirindo uma cor transparente.

A hematoxilina de Harris foi preparada dissolvendo-se em 1000 ml de água destilada fervente, 100g de alumínio e amônio sulfato dodecahidrato (alúmen) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em paralelo, dissolvemos 5g de hematoxilina (Sigma, Chemical Co, St Louis, EUA) em álcool aquecido. Em seguida, estas 2 soluções foram misturadas e fervidas rapidamente adicionando-se 2,5g de óxido de mercúrio vermelho (Merck, Darmstadt, Alemanha) até atingir a cor púrpura-escuro. O corante foi então filtrado.

b) Picrossírius

O método de picrossírius é específico para detecção de colágeno. Os cortes histológicos, corados por este método, podem ser estudados tanto na luz habitual do microscópio como sob luz polarizada. A luz polarizada permite a distinção entre o colágeno tipo I e III. O colágeno tipo I aparece formado por fibras grossas coradas em vermelho ou amarelo, em fundo escuro e o colágeno tipo III adquire cor verde birrefringente (Junqueira et al., 1986).

Não usamos luz polarizada para o estudo do colágeno.

c) Von Kossa

Esta coloração é específica para cálcio e melanina. As lâminas são cobertas com nitrato de prata a 5% e expostas à luz intensa (luz do sol ou lâmpada incandescente de 100W) e depois de tratadas com hipossulfito de sódio 5%, são contracoradas em cromalumen de Mayer.

d) Hematoxilina-eosina (HE)

Esta coloração utiliza a hematoxilina de Harris, eosina e álcool etílico 95%, acidificado com ácido clorídrico 1%. A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas (como porções do citoplasma ricas em RNA e a matriz da cartilagem hialina). A eosina por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em cor de rosa.

3.9.4 - Avaliação da histologia miocárdica

a) Diâmetro dos miócitos: Os cortes histológicos foram corados com PAS e analisados com aumento de 400 vezes. O diâmetro dos miócitos foi mensurado apenas naqueles com disposição longitudinal, núcleos ovalados e centralizados. Analisamos, em média, 10 miócitos por corte, cujos valores foram expressos em micrômetros (μm).

b) Fibrose: Na quantificação da fibrose empregamos cortes histológicos corados com *picrossirius red* e aumento de 200 vezes. A fração de volume do colágeno (FVC) foi calculada pela razão percentual da área do tecido miocárdico marcadas positivamente para as fibras colágenas (quantidade

absoluta de colágeno, excluindo áreas perivasculares) no ventrículo esquerdo (quantidade absoluta de colágeno e miócitos), campo a campo. Em cada corte, 30 campos foram examinados, sendo 10 para cada uma das seguintes regiões: subendocárdica, septo e parede livre do ventrículo esquerdo.

3.9.5 - Avaliação histológica das artérias coronarianas

a) Densidade celular da camada média: Para quantificação da densidade celular da camada média selecionamos artérias de 50-200 μm de diâmetro e relação diâmetro menor/maior superior a 0,5 μm , em cortes corados com HE. As artérias foram fotografadas em aumento de 580x e analisadas no *software* IMAGE J (National Institutes of Health, USA). A densidade celular da camada média foi expressa em número de células musculares lisas por área (células/ mm^2).

b) Espessura da camada média: Para avaliar a espessura da camada média, selecionamos artérias de 50-200 μm e de 200-400 μm de diâmetro, considerando a relação diâmetro menor/maior superior a 0,5 μm , em cortes corados com HE, fotografadas com aumento de 580x e analisadas no programa IMAGE J (National Institutes of Health, USA). Quatro medidas, duas no menor diâmetro e duas no maior diâmetro foram realizadas (μm).

c) Avaliação da parede das artérias: Avaliamos diferentes camadas das artérias coronarianas de forma semiquantitativa, atribuindo os seguintes escores:

(0) normal - túnica íntima e lâmina elástica íntegras, camada média organizada e ausência de calcificações.

(1) lesão leve - descontinuidade parcial ou total da túnica íntima e/ou lâmina elástica, camada média organizada e ausência de calcificações.

(2) lesão moderada - descontinuidade parcial ou total da túnica íntima e/ou lâmina elástica, camada média desorganizada e ausência de calcificações.

(3) lesão severa - descontinuidade parcial ou total da túnica íntima e/ou lâmina elástica, camada média desorganizada e presença de calcificações.

Em média, analisamos de 3 a 5 artérias em cada corte, sendo que cada artéria recebeu um escore. As comparações foram realizadas com a média de escores das artérias de cada animal.

d) Avaliação da calcificação: Para a avaliação da calcificação empregamos cortes histológicos submetidos à coloração de Von Kossa e aumento de 200x. A calcificação da camada média, identificada pela cor preta, foi estimada pelo cálculo da razão percentual entre a área corada positivamente em preto e a área total da camada média.

3.9.6 - Imuno-histoquímica

a) Silanização de lâminas para imuno-histoquímica

Inicialmente as lâminas foram lavadas com detergente neutro por 24 hs (Extran 10%) (Merck, Darmstadt, Alemanha). No dia seguinte foram novamente lavadas durante uma hora em água corrente seguido por 10 minutos em água destilada. A seguir, foram mergulhadas em solução de

álcool absoluto e éter (1:1) por 15 minutos (2 vezes) e, posteriormente, lavadas com água destilada. Permaneceram em estufa a 60 °C, até a secagem.

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

b) Métodos de imuno-histoquímica

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

c) Desparafinização e exposição antigênica

Inicialmente as lâminas foram desparafinizadas. Esse procedimento consiste em, permanecer 30 minutos em estufa a 60°C, quando então as lâminas foram imersas em xilol durante 9 minutos, 3 vezes.

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

Finalizado este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS) pH=7,6. A solução TBS foi preparada misturando-se Tris HCl a 0,5M (Serva, Heidelberg, Alemanha) pH=7,6

acrescida de cloreto de sódio (NaCl) a 0,15M (Merck, Darmstadt, Alemanha), na proporção de 1:10.

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

d) Reações de imuno-histoquímica para angio II, α -actina e TGF- β

As reações de imuno-histoquímica, para identificação da expressão de angio II e α -actina foram realizadas pela técnica estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (Fujihara e cols, 1998). Para avaliação da expressão do TGF- β foi utilizada a técnica da avidina-biotina/peroxidase.

Angio II: Após exposição antigênica em tampão citrato, realizamos o bloqueio da avidina e da biotina endógena 15 minutos cada um, seguido de bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:70, durante 30 minutos. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-angio II (Península, Belmont, EUA) na diluição de 1:400 durante a noite, a uma temperatura de 4 °C, em câmara úmida. A etapa seguinte foi uma incubação

com imunoglobulina biotinilada de cabra anti-coelho (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1000, durante 45 minutos e em seguida com o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. O tempo de revelação com o substrato cromogênico foi de 10 minutos e a contra-coloração realizada com hemalumbre de Mayer. As células que expressavam a angio II apresentavam cor vermelha.

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

TGF- β : Realizamos o bloqueio de peroxidase endógena durante 30 minutos, com uma solução de peróxido de hidrogênio 10% em álcool metílico, com uma concentração final de 3%. Em seguida, as lâminas foram lavadas em

PBS durante 5 minutos. Seguiu-se o bloqueio da avidina endógena, por 15 minutos, e o bloqueio inespecífico com soro não imune de cavalo durante 30 minutos. O anticorpo primário foi o anticorpo policlonal de coelho anti-TGF- β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), na diluição de 1:10 seguido de incubação foi durante toda a noite a uma temperatura de 4 °C, em câmara úmida.

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

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

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

3.10 - Avaliação da imuno-histoquímica

Quantificação da expressão de angiotensina II e TGF- β

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

Quantificação da expressão da α -actina

A positividade para α -actina nos vasos cardíacos foi estimada semiquantitativamente, empregando-se o seguinte escore:

- (1) marcação fraca ou ausente, restrita a poucas áreas da camada média;
- (2) marcação moderada, irregular e dispersa na camada média;
- (3) marcação intensa e uniformemente distribuída na camada média.

3.11 - Análise estatística

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Quando as variâncias entre os grupos diferiam, foi feita a transformação logarítmica dos dados para normalização dos mesmos, e posteriormente, realizada a comparação entre os grupos por ANOVA (pós-teste de Newman-Keuls).

Caso as variâncias ainda diferissem, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

Análise de correlação univariada foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson para seleção das variáveis a introduzir na regressão múltipla. Utilizamos o software Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, EUA). Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

Análise de regressão linear múltipla *stepwise* foi feita para determinar quais variáveis independentes influenciaram significativamente a variável dependente (diâmetro do miócito, percentual de fibrose subendocárdica ou escore de lesão vascular). Nesta etapa utilizamos o software SYSTAT versão 10. Para manutenção das variáveis no modelo de regressão foi adotado $p < 0,150$ (coeficiente com intervalo de confiança de 95%).

4. Resultados

4.1 - Características gerais e bioquímicas

As características gerais dos animais estão resumidas na tabela 1.

Com relação ao **peso inicial** dos animais, não notamos diferenças entre os grupos,

O **peso final** dos animais foi maior nos grupos controles e no Nx G3, que recebeu infusão fisiológica de PTH e dieta pobre em P ($p < 0,05$).

A **ingestão** de dieta foi maior nos grupos controles (G1 e G2) e nos grupos Nx com PTH fisiológico (G3 e G4), independente da concentração de P ($p < 0,001$).

O **peso do coração**, corrigido para 100g de peso do animal, foi maior nos grupos Nx com PTH elevado (G5 e G6) do que nos grupos controles e no G3 ($p < 0,05$),

A **pressão arterial caudal** dos grupos Nx G5 e G6 foi maior do que nos grupos controles ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Dados gerais dos animais do estudo

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ingestão (g/dia)	Peso do coração (g)/ 100 g de peso corpóreo	PAC (mmHg)
G1 – Sham-pP (n=8)	310,25±10,53	432,25±13,02 a	17,59±0,47 b	0,28±0,01	114,87±1,19
G2 – Sham-rP (n=8)	311,13±13,18	397,88±8,82 a	17,53±0,40 b	0,29±0,01	109,59±1,12
G3 – Nx PTHf-pP (n=8)	307,88±11,77	416,88±12,29 a	17,19±0,53 b	0,31±0,01	141,64±2,11
G4 – Nx PTHf-rP (n=8)	322,00±9,93	352,25±16,82	15,77±0,38 b	0,36±0,01	137,49±1,31
G5 – Nx PTHe-pP (n=9)	307,44±6,18	305,89±7,26	12,28±0,29	0,42±0,02 c	149,55±2,58 d
G6 – Nx PTHe-rP (n=7)	336,43±8,46	340,14±20,77	11,89±0,86	0,41±0,03 c	143,49±4,69 d

Média±erro padrão

a $p < 0,05$ vs G4, G5, G6

b $p < 0,001$ vs G5, G6

c $p < 0,05$ vs G1, G2, G3

d $p < 0,05$ vs G1, G2

Os resultados da análise bioquímica e do hematócrito estão descritos na tabela 2. As principais observações foram:

Creatinina - Os grupos Nx apresentaram a creatinina mais elevada do que a dos grupos controles, com exceção do G3, que recebeu infusão fisiológica de PTH e dieta pobre em P ($p < 0,05$).

Cálcio - Os grupos controles (G1 e G2) e os Nx submetidos a dieta pobre em P (G3 e G5), tiveram os valores maiores de cálcio sérico, se destacando o G5, que também foi superior ao G2 e G3 ($p < 0,01$).

Fósforo - Os grupos Nx que receberam dieta com concentração elevada de fósforo (G4 e G6), concordantemente, apresentaram maiores valores de P

sérico quando comparados aos grupos controles e aos animais que receberam dieta com baixa concentração de P, G3 e G5 ($p<0,001$).

PTH - Os grupos Nx G5 e G6 apresentaram valores maiores do que os controles e que os grupos Nx G3 e G4 ($p<0,05$).

Hematócrito - Houve diferença entre os grupos controles e G3 e o grupo G6 ($p<0,05$).

O **produto Ca x P** (dado não demonstrado) foi maior nos grupos Nx G4, G5 e G6 com relação aos controles ($p<0,05$).

Tabela 2 - Análise bioquímica e do hematócrito dos animais

	Cr (mg/dL)	iCa (mmol/L)	P (mg/dL)	iPTH (pg/mL)	Ht (%)
G1 – Sham-pP (n=8)	0,31±0,01	1,21±0,05 b	4,43±0,39	10,52±2,88	42,88±0,46 f
G2 – Sham-rP (n=8)	0,46±0,03	1,17±0,03 b	4,95±0,33	111,90±18,29	43,50±0,51 f
G3 – Nx PTHf-pP (n=8)	0,56±0,04	1,19±0,05 b	5,59±0,48	114,95±30,12	42,94±1,09 f
G4 – Nx PTHf-rP (n=8)	1,09±0,14 a	0,61±0,05	14,70±2,44 d	86,76±20,31	39,08±1,30
G5 – Nx PTHe-pP (n=9)	1,02±0,10 a	1,44±0,07 c	5,04±0,51	249,64±45,25 e	39,39±1,63
G6 – Nx PTHe-rP (n=7)	0,95±0,15 a	0,65±0,09	12,99±1,47 d	379,97±66,68 e	36,69±0,88

Média±erro padrão

a $p<0,05$ vs G1,G2

b $p<0,001$ vs G4,G6

c $p<0,01$ vs G2,G3,G4,G6

d $p<0,001$ vs G1,G2,G3,G5

e $p<0,05$ vs G1,G2,G3,G4

f $p<0,05$ vs G6

4.2 - Hipertrofia miocárdica

A avaliação da **hipertrofia miocárdica**, através da medida dos miócitos, mostrou que os grupos Nx apresentaram valores maiores que os controles ($p < 0,05$). Dentre os animais Nx, o G3 (PTH fisiológico e dieta pobre em P) apresentou os menores valores, enquanto no G6 (PTH elevado e dieta rica em P) o diâmetro dos miócitos foi maior do que no G3 e G5 ($p < 0,001$) (Figura 3).

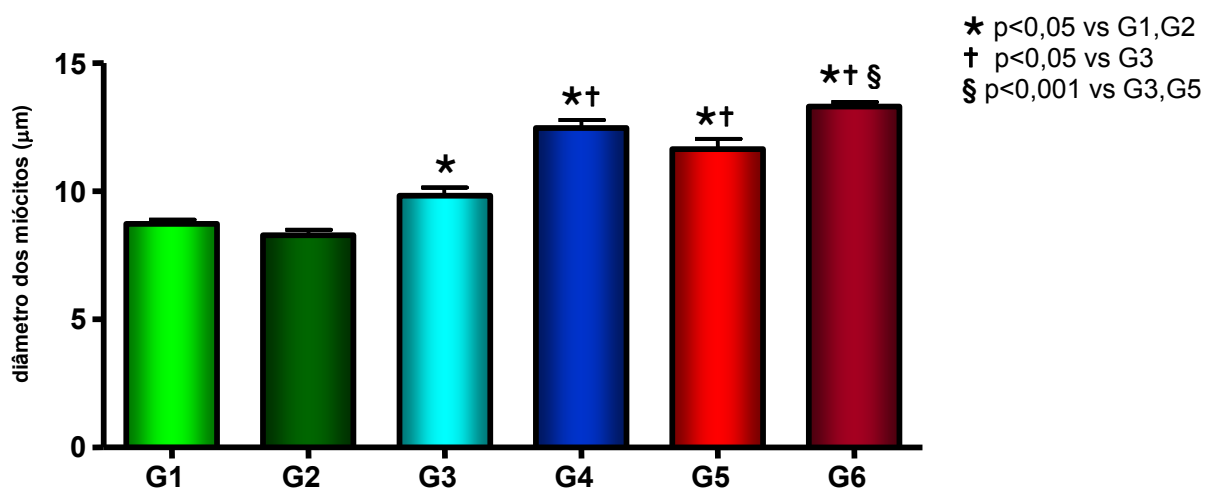


Figura 3. Diâmetros dos miócitos nos diferentes grupos, expressos em μm .

4.3 - Fibrose miocárdica

A análise da porcentagem do **volume de colágeno**, na região do subendocárdio, mostrou maiores valores no grupo G6 quando comparado aos controles e ao G3 ($p < 0,05$) (Figura 4). Nas demais regiões analisadas não encontramos diferenças entre os grupos.

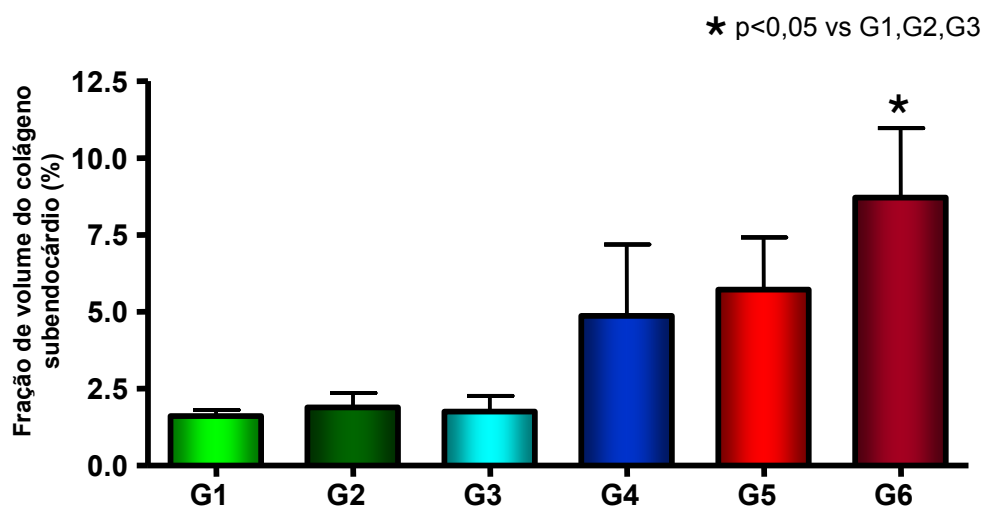


Figura 4. Fração de volume de colágeno na região subendocárdica, nos diversos grupos.

4.4 - Imuno-histoquímica

TGF- β - A Figura 5 mostra a expressão de TGF- β em vasos e fibras miocárdicas.

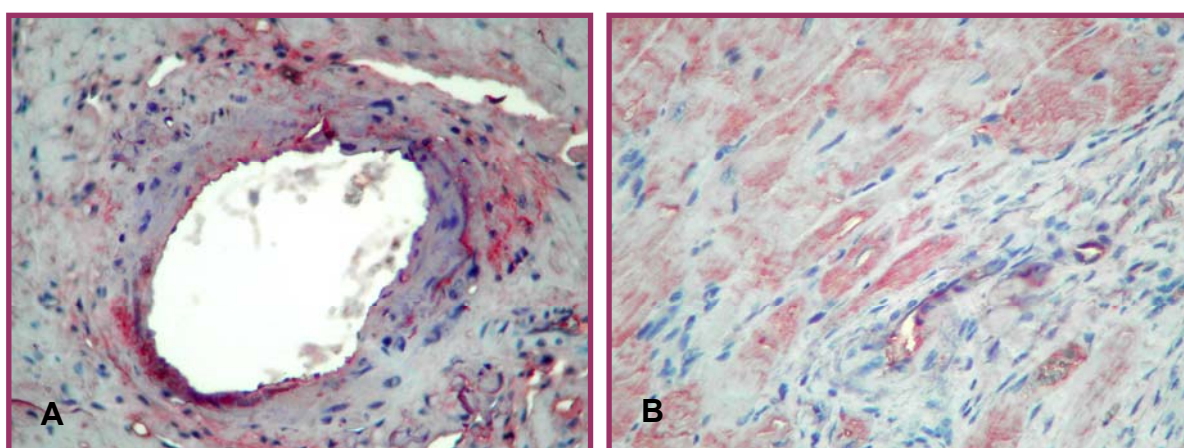


Figura 5. Fotomicrografias de tecido miocárdico com expressão de TGF- β em vaso (A) e fibras miocárdicas (B). Aumento de 400x

A análise da expressão do TGF- β no miocárdio mostrou diferença entre os grupos com PTH alto (G5 e G6) e o controle G2 ($p < 0,05$) (Figura 6).

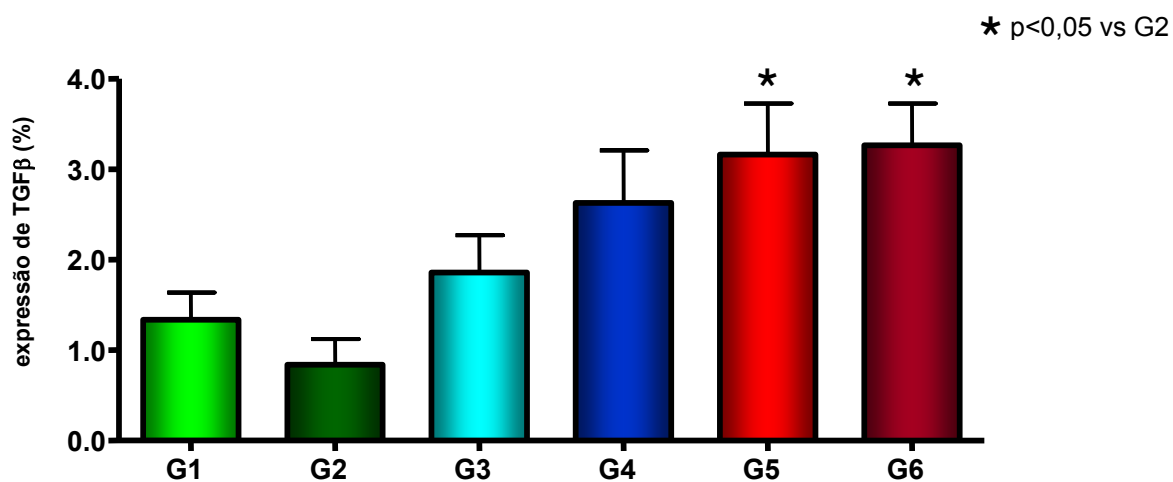


Figura 6. Quantificação da expressão de TGF- β no miocárdio, expressa em %

Angiotensina II - A Figura 7 mostra a expressão de angio II em vasos e fibras miocárdicas.

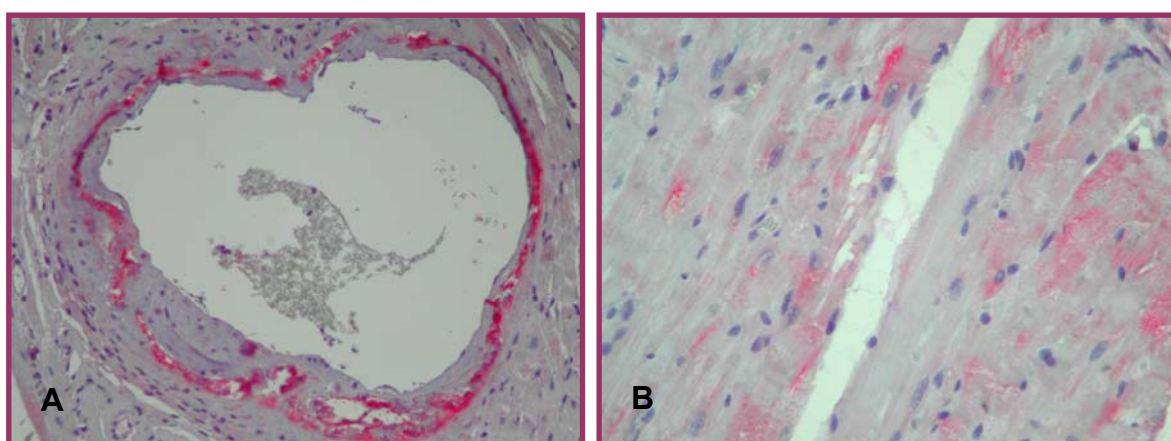


Figura 7. Fotomicrografias de tecido miocárdico com expressão de angio II em vaso (A) e fibras miocárdicas (B). Aumento de 400x

A expressão de angio II no tecido miocárdico mostrou uma intensidade maior nos grupos com PTH alto (G5 e G6) quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 8).

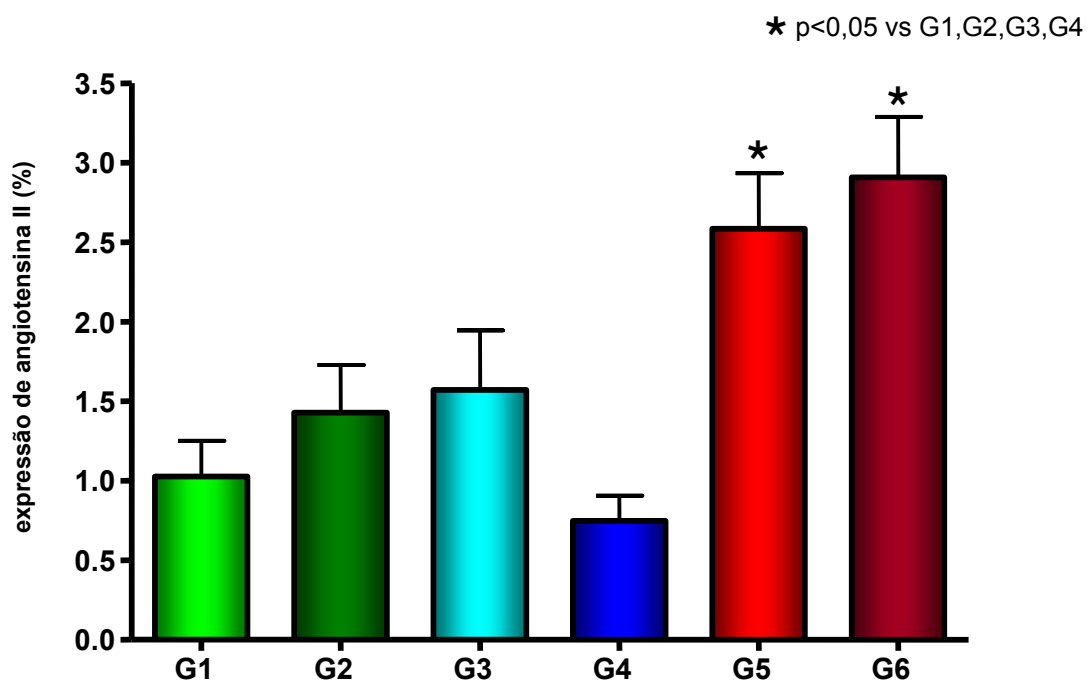


Figura 8. Quantificação da expressão de angio II no miocárdio, expressa em %.

4.5 - Análise dos vasos coronarianos

A diferença entre as medidas de **densidade celular da camada média** relativa a todos os grupos não foi significativa (dados não mostrados).

A medida da **espessura da camada média** não foi diferente entre os grupos estudados, mesmo quando os vasos foram agrupados em diâmetros de 50-200 μm e de 200-400 μm . Os dados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise da espessura da camada média dos vasos coronarianos.

	G1 (n=6)	G2 (n=5)	G3 (n=6)	G 4 (n=6)	G5 (n=8)	G6 (n=7)
Espessura da camada média (vasos de 50-200 μm)	23 \pm 3	18 \pm 4	27 \pm 1	27 \pm 4	25 \pm 4	27 \pm 6
	-	(n=2)	(n=3)	(n=5)	(n=6)	(n=7)
Espessura da camada média (vasos de 200-400 μm)	---	30 \pm 4	35 \pm 4	38 \pm 3	41 \pm 6	44 \pm 6
Média \pm erro padrão						

A Figura 9 demonstra as diferentes lesões vasculares que foram classificadas por escores variando de 0 a 3.

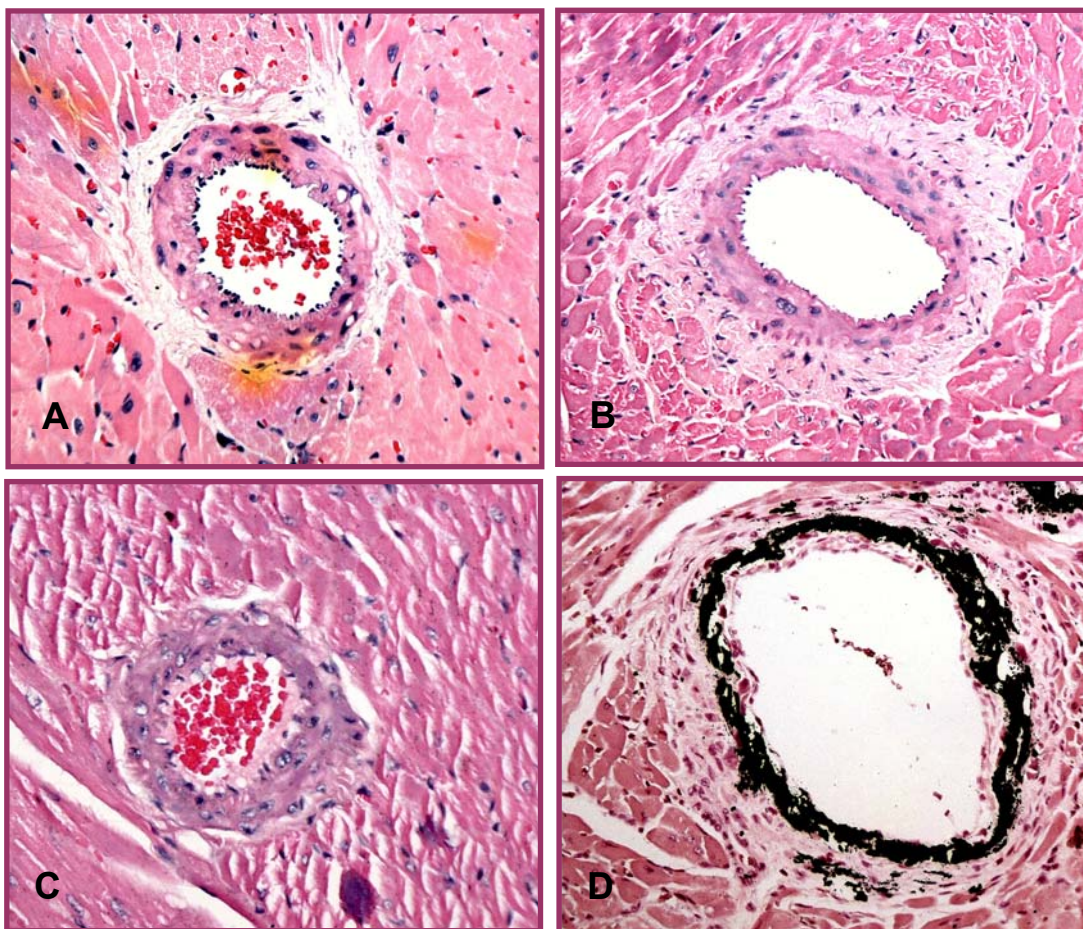


Figura 9. Fotomicrografias de tecido miocárdico mostrando vasos com diferentes escores de lesão: escore 0 (A), escore 1 (B), escore 2 (C) e escore 3 (D). Aumento de 580x.

O escore de **lesão dos vasos** foi maior nos grupos com infusão elevada de PTH (G5 e G6) quando comparados aos controles e aos Nx G3 e G4 ($p < 0,01$) (Figura 10).

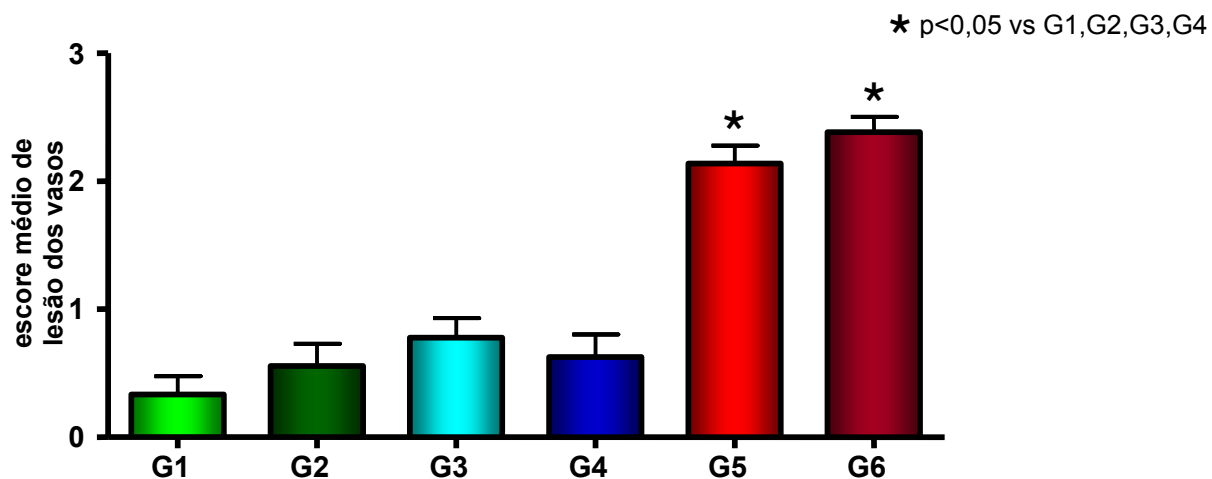


Figura 10. Escore médio de lesão dos vasos coronarianos avaliados nos diferentes grupos.

α -actina - A Figura 11 mostra a expressão de α -actina em vasos com estrutura normal e vasos calcificados.

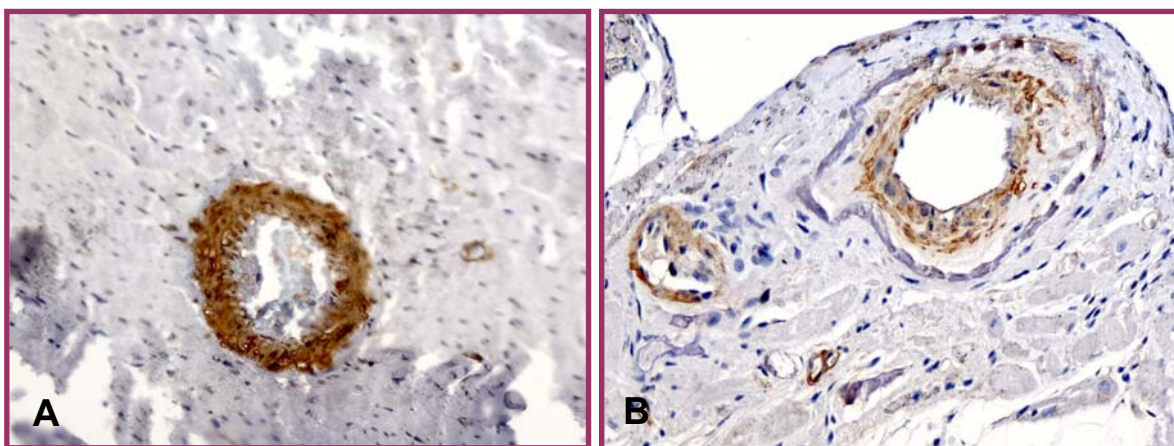


Figura 11. Fotomicrografias de tecido miocárdico com expressão de α -actina em vaso normal (A) e vaso calcificado (B). Aumento de 580x.

O escore de expressão da α -actina mostrou-se significativamente menor nos animais dos grupos com infusão elevada de PTH (G5 e G6) quando comparados aos controles e aos Nx G3 e G4 ($p < 0,05$) (Figura 12).

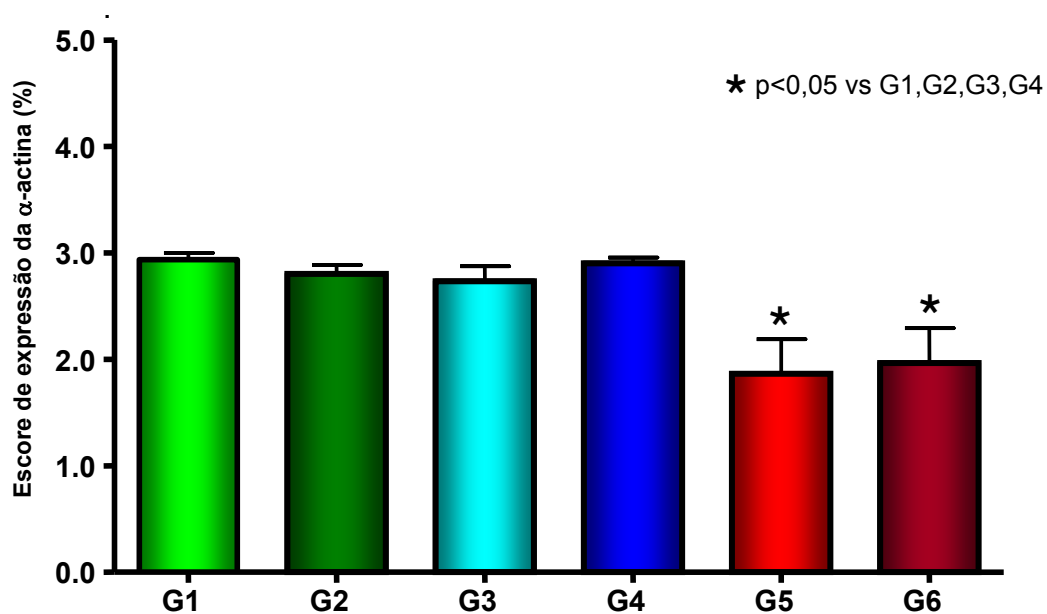


Figura 12. Quantificação da expressão da α -actina nos vasos coronarianos.

4.6 - Análise de correlação univariada

A tabela 4 mostra os resultados da análise univariada, revelando que o diâmetro de miócitos correlacionou-se positivamente com a PAC, Cr, P, produto CaxP, iPTH, expressão de TGF- β e de angio II e negativamente com Ht, iCa e expressão de α -actina. No tecido cardíaco, a fibrose subendocárdica também apresentou correlação positiva com PAC, Cr, P, iPTH e expressão de TGF- β e negativamente com Ht, iCa, e expressão de α -actina. O escore de lesão dos vasos correlacionou-se positivamente com PAC, Cr, iPTH, expressão de TGF- β e angio II e negativamente com Ht e expressão de α -actina.

Tabela 4 – Correlação univariada de parâmetros morfológicos.

	PAC	Ht	Cr	P	iCa	CaxP	iPTH	TGF- β	α -actina	Angio II
Diâmetro miócitos	0,71 <0,0001	-0,64 <0,0001	0,71 <0,0001	0,60 <0,0001	-0,52 0,0007	0,56 0,0002	0,50 0,002	0,41 0,01	-	0,42 0,02
Fibrose	0,38 0,01	-0,50 0,0005	0,45 0,002	0,45 0,002	-0,35 0,02	0,26 ns	0,37 0,02	0,37 0,02	-	0,34 ns
Escore de lesão vascular	0,60 0,0001	-0,35 0,03	0,36 0,03	0,12 ns	-0,15 ns	0,18 ns	0,64 <0,0001	0,45 0,007	-0,81 <0,0001	0,76 <0,0001

4.7 - Análise de regressão linear múltipla

A tabela 5 mostra os resultados da regressão linear. O diâmetro dos miócitos foi dependente principalmente da PAC e do PTH, enquanto o Ht contribuiu para diminuição do mesmo. Com relação à fibrose miocárdica, pode-se notar que foi dependente do PTH, sendo influenciada negativamente pelo iCa. O outro resultado observado foi que o escore de lesão vascular foi dependente do PTH e se relacionou negativamente com a expressão da α -actina.

Tabela 5 - Regressão múltipla dos parâmetros morfológicos

	Coefficiente de regressão	Intervalo de confiança (95%)	p
Diâmetro de miócitos			
PTH	0,004	(0,002 ; 0,006)	0,01
PAC	0,059	(0,032 ; 0,086)	0,002
Hematócrito	-0,135	(-0,249 ; -0,021)	0,059
Fibrose miocárdica			
Cálcio	-3,120	(-6,206; -0,034)	0,100
PTH	0,012	(0,005; 0,019)	0,007
Escore de lesão vascular			
PTH	0,002	(0,0003; 0,0037)	0,020
α -actina	-0,804	(-1,093; -0,515)	<0,0001

Tabela 6 – Regressão múltipla dos parâmetros avaliados por imunohistoquímica

	Coefficiente de regressão	Intervalo de confiança (95%)	p
TGF-β			
PAC	0,039	(0,011; 0,067)	0,026
Angiotensina II			
PAC	0,024	(0,007; 0,041)	0,023
PTH	0,002	(0,005; 0,019)	0,052
α-actina			
PAC	-0,019	(-0,031; -0,007)	0,020
PTH	-0,001	(-0,003; 0,000)	0,105

A tabela 6 apresenta os resultados da regressão múltipla das diferentes citocinas avaliadas. Podemos observar que a PAC foi a que mais influenciou a expressão do TGF- β . Com relação à expressão da angio II e da α -actina, observamos a participação da PAC e do PTH sérico.

5. Discussão

São inúmeros os estudos sobre a incidência, fisiopatologia e prevenção da DCV na DRC, considerando sua importância na mortalidade destes pacientes. Entretanto, muitos questionamentos persistem e o conhecimento de novos mecanismos fisiopatológicos permitiria ampliar o tratamento, além de melhor prevenir essa comorbidade.

Nosso estudo avaliou o papel do P e do PTH na remodelação cardíaca de animais urêmicos. Analisar isoladamente a ação da sobrecarga de P e/ou do excesso de PTH, na uremia, é difícil uma vez que suas ações estão interligadas. Anteriormente, nosso laboratório demonstrou em animais urêmicos que a ingestão excessiva de P favorecia a hipertrofia miocárdica, analisando o peso do coração [22]. No estudo atual avaliamos, através de análise morfométrica e de técnicas de imuno-histoquímica, os processos que participam não só da hipertrofia miocárdica como das lesões das artérias coronarianas.

Uma das principais complicações da uremia é a hipertensão arterial. Nossos resultados revelaram que elevadas concentrações de PTH agravam essa comorbidade. Além de seu papel determinante na homeostase do Ca e P, o PTH atua em vários outros tecidos, dentre eles, o sistema cardiovascular. Tanto fragmentos de PTH (amino terminal) como a molécula intacta se ligam ao receptor PTH/PTHrP e agudamente agem como potentes vasodilatadores, aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico, que

por sua vez, inibem os canais de Ca dessas células, diminuindo o influxo de Ca e conseqüentemente as concentrações de Ca intracelular [64]. Rashid e cols mostraram ainda ação do PTH em células endoteliais, aumentando a síntese e liberação de óxido nítrico (NO), também com potente efeito vaso dilatador [65].

Nos pacientes com HPT1 e HPT2 a secreção cronicamente elevada de PTH mantém o Ca intracelular aumentado, alterando a função de vasodilatação e a produção de substâncias vasoativas, especialmente a síntese de NO, pelas células endoteliais, favorecendo a hipertensão arterial. Além disso, o PTH aumenta a síntese de substâncias vasoconstritoras que impedem a vasodilatação, via canais de K das células musculares lisas, contribuindo ainda mais para a elevação da pressão arterial. É importante lembrar que o PTH age não só na função dos vasos, mas também na estrutura das paredes, promovendo um espessamento que favorece a HA [66]. Azar e cols mostraram uma correlação direta entre níveis séricos de PTH e severidade da HA em pacientes submetidos à hemodiálise [67].

Ainda em relação a análise da HA, é interessante ressaltar que quando comparamos os pares de animais entre si, os animais do G5 eram mais hipertensos do que os do G6, assim como os do G3 mais que os do G4, embora sem diferença estatística. Vale lembrar que esses animais eram também os mais hipercalcêmicos (provavelmente como conseqüência da diminuição da oferta oral de fósforo). Esse fato sugere que a hipercalcemia, assim como o PTH, é capaz de promover uma ativação endotelial, contribuindo para a HA [68].

Com relação ao peso do coração maior nos animais com PTH elevado, sabe-se que o PTH favorece a HVE por efeito direto nos cardiomiócitos, independente do Ca sérico e da PA [30,70f]. Estudos anteriores revelaram uma associação entre HVE e níveis de PTH na população geral [30], entre HVE e pacientes portadores de HPT1 [69], assim como redução de HVE após PTX em pacientes portadores de HPT2 [70].

Nos animais que receberam infusão elevada de PTH não pudemos observar o papel isolado da sobrecarga de P no processo de HVE. Nesse caso, a elevada concentração de PTH foi o determinante da hipertrofia cardíaca, provavelmente encobrendo a participação do P. Um fato importante é que a sobrecarga de P foi avaliada pela fosfatemia, uma vez que não dosamos o P tecidual, e como se sabe, a fosfatemia *per si* não é um bom marcador da sobrecarga de P intracelular.

Quando analisamos os animais que receberam PTH em concentrações fisiológicas e dieta pobre em P, vimos que, mesmo urêmicos, apresentavam alterações de HVE e fibrose miocárdica discretas, se assemelhando mais aos animais controles do que dos outros animais Nx. Esses achados foram semelhantes aos observados por Ritz e cols [7], demonstrando que a baixa ingestão de P foi benéfica para o tecido cardíaco. Entretanto, no modelo dele não era possível distinguir qual efeito se devia ao P ou ao PTH, o que foi possível no nosso, especialmente nos animais que receberam concentração fisiológica de PTH. E ainda evidenciamos o oposto, em que os animais submetidos a sobrecarga de P apresentaram resultados de HVE e fibrose miocárdica próximos as dos grupos com PTH elevado,

exceto com relação às lesões vasculares [7,22,23] . Desta forma, quando comparamos os dois grupos que receberam PTH fisiológico, observamos a influência isolada do P na HVE assim como na fibrose do miocárdio.

Este é o primeiro estudo que analisou a influência do PTH e P nos processos de hipertrofia e fibrose, através da medida do diâmetro de miócitos e quantificação do volume do colágeno.

A hipertrofia miocárdica foi mais acentuada no G6 em relação aos G3 e G5 (infusões de PTH distintas e a mesma dieta pobre em P). Esses resultados revelam que além do PTH, a hiperfosfatemia também contribuiu para o desenvolvimento da HVE justificando o fato do G6 não ser diferente do G4. Estudos clínicos mostram a associação de hiperfosfatemia e HVE, inclusive obtendo redução da hipertrofia com melhor controle da hiperfosfatemia [62,71]. Outros fatores também influenciaram a HVE, sendo de forma positiva a pressão arterial e negativa, o hematócrito.

Quando analisamos a fibrose miocárdica, vimos que a mesma ocorria principalmente na região do subendocárdio, quando comparada ao septo e parede livre (dados não mostrados), e era mais intensa nos animais que receberam PTH elevado e sobrecarga de P. Estes resultados são concordantes com outros em que, independentemente da agressão cardíaca, a região subendocárdica é a mais lesada. Isto ocorre principalmente em situações onde se observa uma diferença no gradiente de pressão, com diminuição da pressão arterial sistêmica e aumento da pressão diastólica final do VE, prejudicando a perfusão coronariana e que afeta principalmente o subendocárdio [72,73]. Não podemos afirmar, em

nosso estudo, que este mecanismo contribui para uma maior lesão em subendocárdio, pois não avaliamos estas medidas hemodinâmicas. Nossos animais, com hipertensão arterial severa, desenvolveram hipertrofia do miocárdio, com participação importante do processo de fibrose, resultado do aumento da síntese de colágeno e provável diminuição de sua degradação [51]. Sabe-se que, além da sobrecarga de pressão, outros fatores contribuem para a fibrose, principalmente a angiotensina II e a aldosterona. Nossos resultados mostraram a influência da creatinina sérica, ou seja, a uremia *per se* contribuiu para seu desenvolvimento. Além disto, confirmamos a participação do PTHrP no desenvolvimento da fibrose. Este hormônio age como ativador dos fibroblastos e regulador de fatores pró-fibróticos como a aldosterona [74,75]. Assim, novamente podemos constatar, no nosso modelo, a participação do P, indicando que além do PTH e da PAC, a hiperfosfatemia contribuiu para o processo de fibrose, especialmente no G6 onde o volume de colágeno foi maior. Estes achados coincidem com os de Ritz e cols que mostraram o papel indireto da hiperfosfatemia na fibrose intersticial, promovendo hipocalcemia, aumentando a síntese de PTH e o processo de fibrose [7].

Nos animais com função renal preservada, a sobrecarga de P na dieta não teve efeitos deletérios no miocárdio e vasos. Essa sobrecarga elevou os níveis de PTH, e provavelmente da fosfatonina FGF23 que, por sua vez, promoveu fosfatúria, normalizando os níveis de P [27].

Por outro lado, se questionava os efeitos de concentrações elevadas de PTH na ausência de uremia, se promoveria alterações em artérias e

interstício do miocárdio [7]. Recentemente, estudo desenvolvido em nosso laboratório mostrou calcificações em artérias de animais controles e nefrectomizados, ambos submetidos a concentrações elevadas de PTH [32].

A expressão do TGF- β , considerada molécula chave nos processos de fibrose tecidual, produzido pelos fibroblastos e mediador da ação inflamatória da angiotensina II, foi determinante nos processos de hipertrofia, fibrose e lesão dos vasos. E a quantificação da expressão do TGF- β se mostrou mais intensa nos animais mais hipertensos que receberam concentrações elevadas de PTH. Kai e cols mostraram que a hipertensão arterial promove alterações inflamatórias na parede das artérias coronarianas. Com a infiltração de macrófagos, há produção de citocinas e TGF- β , ativando a cascata da fibrose miocárdica [52]. Nossos achados são concordantes, e agrupando os resultados, observamos que a diferença entre G5 e G6 (PTH alto e hipertensos) foi a fibrose, reafirmando o papel da hiperfosfatemia.

Quanto à expressão da angiotensina II, a mesma foi significativa na hipertrofia miocárdica e na lesão dos vasos. Com relação à fibrose, a angio II não foi uma determinante. Achemos que este resultado se deve ao fato de que a angiotensina II atua principalmente em fases mais precoces da inflamação e, na fase de fibrose, sua expressão já estaria diminuída. A PAC e o PTH foram os fatores que mais influenciaram a expressão da angiotensina II e isto justificou sua intensidade nos grupos G5 e G6 com relação aos demais grupos. Novamente chamamos atenção para a ação permissiva do PTH em relação a esta proteína. Dentre os vários estudos

apontando a angiotensina II como um dos principais mediadores da lesão CV, destacamos o de Tokuda e cols que mostraram a sua importância, induzindo a inflamação e fibrose [55].

Na morfometria dos vasos coronarianos, avaliamos a espessura e densidade celular da camada média para analisar a hipertrofia e, apesar de observar um aumento nos grupos que receberam infusão elevada de PTH, não conseguimos demonstrar diferença estatística entre os grupos. Uma hipótese para justificar nossos resultados seria o pequeno número de animais estudados, lembrando ainda que nas situações de agressão, o contingente de vasos no miocárdio está diminuído [7]. São vários os fatores que contribuem para o espessamento da parede vascular, mas, considerando a uremia e a hipertensão dos animais NX, destacamos apenas o papel do fósforo e PTH. Como já descrevemos, as células musculares lisas dos vasos tem receptores para PTH/PTHrP e, principalmente na uremia, o PTH é um fator facilitador do espessamento da parede das artérias e do desenvolvimento de fibrose miocárdica [75]. Quando avaliamos particularmente os animais com PTH elevado, além do reduzido número de artérias, muitas delas apresentavam calcificações, prejudicando a quantificação da camada média.

As lesões das artérias coronarianas, que variaram desde uma descontinuidade da lâmina elástica até a calcificação da camada média, foram analisadas por método semiquantitativo e vimos que o PTH foi o maior determinante dessas lesões. Acredita-se que as alterações nas paredes dos vasos, produzidas pelo PTH e já citadas anteriormente, precedem a

aterosclerose. Realmente, os grupos que apresentaram escores maiores foram os que receberam PTH elevado, inclusive mostrando artérias muito calcificadas em ambos os grupos, independente da concentração de P da dieta. Os animais que receberam PTH em concentração fisiológica e dieta rica em P não apresentaram calcificações vasculares. Os mesmos resultados foram encontrados em outro estudo, destacando a importância do PTH [32]. Entretanto, vale lembrar que a sobrecarga de P favorece a calcificação alterando a expressão fenotípica da célula muscular lisa e sendo um fator de risco independente para CV [21,23,37,39].

Sabe-se que fisiopatologia das lesões arteriais é complexa e envolve muitos fatores, dentre eles: hipertensão arterial, uremia, PTH, inflamação e fibrose.

Com relação à expressão da α -actina nas artérias, esta se relacionou negativamente com os processos de hipertrofia e fibrose miocárdicas e principalmente com a lesão dos vasos. À medida que a célula muscular lisa dos vasos sofre uma mudança fenotípica, como ocorre nas situações de hiperfosfatemia, vai expressando menos a α -actina [37]. Desta forma, a α -actina apresentou uma expressão significativamente menor nos grupos G5 e G6, mas não se mostrou diferente com relação à sobrecarga de P, como era de se esperar. Talvez a razão seja que, sob concentrações elevadas de PTH, o papel do P fica menos evidente e difícil de ser avaliado. Recentemente, demonstrou-se que a dieta pobre em fósforo não protegeu os vasos de calcificações em vigência de concentrações elevadas de PTH [32].

Neste estudo nós não avaliamos a apoptose das células miocárdicas, mas, sabemos que a disfunção cardíaca se deve, em parte, a morte celular. Por outro lado, é conhecido o fato de que o aumento do P intracelular desencadeia perda do potencial de membrana da mitocôndria, o que pode ativar a morte celular. Estudos em cultura de células “osteoblasto-like” mostraram que o P induz apoptose [58,62]. Poderíamos então conjecturar que este seria um outro mecanismo pelo qual a hiperfosfatemia estaria contribuindo para a hipertrofia miocárdica.

Um ponto a ser ressaltado é que no nosso estudo, infelizmente não dosamos os metabólitos de vitamina D. Recentemente, tem se demonstrado que a vitamina D exerce um efeito protetor na HVE [47,48].

Outros estudos mostrando a importância do estresse oxidativo nestes processos de hipertrofia e fibrose miocárdica, assim como em lesões coronarianas, são necessários e vão ser realizados posteriormente.

Este estudo nos chama atenção para aspectos importantes e práticos com relação a P e PTH, inclusive levando a reflexões de mudanças na conduta clínica.

O conceito de sobrecarga de fósforo na dieta, por exemplo, talvez deva ser revisto, uma vez que a associação fósforo-mortalidade tem sido mostrada até em pacientes com função renal normal. Vários estudos têm sido publicados evidenciando a relação entre P e lesões coronarianas [76, 77}. Atualmente, cada vez mais os alimentos têm uma concentração maior de P em função de aditivos, e, na maioria das vezes, avaliamos nosso paciente com uma dosagem de P sérico, que não reflete esta sobrecarga ao

longo dos anos. Sugerimos que dentro do conceito de uma dieta saudável, um dos objetivos seja diminuir a ingestão de P, prevenindo a DCV.

Com relação ao PTH, questionamos a recomendação do guia de práticas clínicas para prevenção e tratamento dos distúrbios do metabolismo mineral e ósseo (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative - K/DOQI) sugerir valores de PTH-intacto entre 150-300 pg/mL. Este nível de PTH seria ideal para a manutenção da remodelação óssea normal; entretanto é deletério para o tecido cardiovascular.

6. Conclusão

Em resumo, nossos dados confirmam que, além dos fatores clássicos já descritos na uremia, os distúrbios do metabolismo mineral, ou seja, sobrecarga de fósforo e hiperparatireoidismo desempenham papel fundamental nos processos de hipertrofia, fibrose miocárdica e lesão dos vasos. Portanto, o controle destas variáveis pode contribuir para a diminuição da elevada morbi-mortalidade encontrada nos pacientes com doença renal crônica.

7. Referências Bibliográficas

- 1- Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med.* 1974 Mar 28;290(13):697-701.
- 2- Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2034-2047.
- 3- Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 2000 May 18;342(20):1478-83.
- 4 - Zoccali C. Cardiorenal risk as a new frontier of nephrology: research needs and areas for intervention. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 ;17 [Suppl11]:50-54.
- 5- Bongartz LG, Cramer MJ, Doevendans PA, Joles JA, Braam B. The severe cardiorenal syndrome: "Guyton revisited". *European Heart Journal.* 2005; 26: 11-27.
- 6- Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. The clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998; 32 (3 Suppl): S112-S119.

- 7- Amann K, Törnig J, Kugel B, Gross M-L, Tyralla K, El-Shakmak A, Szaro A, and Ritz E. Hyperphosphatemia aggravates cardiac fibrosis and microvascular disease in experimental uremia. *Kidney Int.* 2003; 63: 1296-1301.
- 8- Amann K, Ritz E. Microvascular disease- the Cinderella of uraemic heart disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15:1493-1503.
- 9- Yao Q, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. *Scand J Urol Nephrol.* 2004; 38: 405-416.
- 10- Libetta C, De Nicola L, Rampino T, De Simone W, Memoli B: Inflammatory effects of peritoneal dialysis: Evidence of systemic monocyte activation. *Kidney Int.* 1996; 49: 506-511.
- 11- Foley R N, Parfrey P S, Harnett J D, Kent G M, Murray D C, Barre P E: The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1996; 28: 53-61.
- 12- Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients *Am J Kidney Dis.* 2003 Jun;41(6):1212-8
- 13- London GM. Cardiovascular disease in chronic renal failure: pathophysiologic aspects. *Seminars in Dialysis.* 2003; 16(2): 85-94.

- 14- Martola L, Barany P, Stenvinkel. Why do dialysis patients develop a heart of stone and bone of china? *Blood Purif.* 2005;23: 203-210.
- 15- Locatelli F, Canaud B, Eckardt K-U, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:1272-1280.
- 16- Handelman GJ. Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif.* 2000; 18:343-349.
17. Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T, Aydin A, Eyileten T, Ozcan O, Acikel C, Tasar M, Genctoy G, Erbil K, Vural A, Zoccali C. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47(5):924-5.
- 18- Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M. IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005 Apr;67(4):1216-33.
- 19- Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation.* 2007;116: 85-97.
- 20- Block GA, Friedrich K. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:1226-1237.

- 21- Reslerova M, Moe SM. Vascular Calcification in Dialysis Patients: Pathogenesis and Consequences. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(S1):S96-99.
- 22- Neves KR, Graciolli FG, dos Reis LM, Pasqualucci CA, Moyses RM, Jorgetti V. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. *Kidney Int.* 2004 Dec;66(6):2237-44.
- 23- Nishizawa Y, Jono S, Ishimura E, Shioi A. Hyperphosphatemia and vascular calcification in end-stage renal disease. *Journal of Renal Nutrition*, 2005; 1:178-182.
- 24- Naveh-Many T, Rahamimov R, Livini N, Silver J: Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats: The effects of calcium, phosphate and vitamin D. *J Clin Invest* 1995; 96: 1786-1793.
- 25- Kuzela DC, Huffer WE, Conger J D, Winter SW, Hammond WS. Soft tissue calcification in chronic dialysis patients. *Am J Pathol.* 1977; 86:403-424.
- 26- Ribeiro S, Ramos A, Brandão A, Rebelo JR, Guerra A, Resina C et al. Cardiac valve calcification in haemodialysis patients: role of Ca phosphate metabolism. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13: 2037-2040.
- 27- Fukagawa M, Kasama JJ. With or without the kidney: the role of FGF23 in CKD. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20: 1295-1298

- 28- Braun J, Oldendorf M, Moshage W, Heidler R, Zeitler E, Luft F C. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1996; 27:394-401.
- 29- Tyralla K, Amann K. Morphology of the heart and arteries in renal failure. *Kidney Int.* 2003; 63(suppl 84): S80-S83.
- 30- Saleh FN, Schirmer H, Sundsfjord J, Jorde R. Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. *European Heart Journal.* 2003;24:2054-2060.
- 31- McCarty M F. Nutritional modulation of parathyroid hormone secretion may influence risk for ventricular hypertrophy. *Medical Hypotheses.* 2005; 64: 1015-1021.
- 32- Neves KR, Gracioli FG, dos Reis LM, Gracioli RG, Neves CL, Magalhães AO, Custódio MR, Batista DG, V Jorgetti, Moyses RM. Vascular calcification: Contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int.* 2007; Jun;71(12):1262-70.
- 33- K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease for Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* 2003; 42 (3 Suppl) S1-S170.
- 34- Block G A, Klassen P S, Lazarus J M, Ofsthun N, Lowrie E G, Chertow G M. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(8): 2208-2018.

- 35- Delmez JA, Slatopolsky E: Hyperphosphatemia: Its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1992; 19:303-317.
- 36- Slatopolsky E, Brown A, Dusso A: Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 1999; 56 (73Suppl):S14-S19.
- 37- Giachelli CM, Speer M Y, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcifications. Roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res.* 2005; 96:717-722.
- 38- Jono S, McKee M, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000; 87: e10-e17.
- 39- Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2006; 14;98 (7): 905-912.
- 40- Ketteler M, Gross M-L, Ritz E. Calcifications and cardiovascular problems in renal failure. *Kidney Int.* 2005; 67, Suppl 94: S120-S127.
- 41- Goodman WG, London G, Block GA, Giachelli C, Hruska k, Ketteler M, Levin A, Massy Z, McCarron DA, Raggi P, Shanahan CM and Yorioka N. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis,* 2004; vol 43, 3: 572-579.
- 42- Moe SM. Vascular calcification and renal osteodystrophy relationship in chronic kidney disease. *European Journal of Clinical Investigation.* 2006;36 (Suppl.2): 51-62.

- 43- Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al. The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 325-349.
- 44- Levin A, Li YC. Vitamin D and its analogues: Do they protect against cardiovascular Disease in patients with kidney disease?. *Kidney Int.* 2005; 68: 1973-1981.
- 45- Li YC. Vitamin D regulation of the rennin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 2003; 88: 327-331.
- 46- Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a Negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest .* 2002;110:229–238.
- 47- Achinger SG, Ayus JC. The role of vitamin D in left ventricular hypertrophy and cardiac function. *Kidney Int.* 2005; 67, Suppl 95: S37-S42.
- 48- Weishaar, Kim SN, Saunders D, Simpson RU. Involvement of vitamin D3 with cardiovascular function III. Effects on physical and morphological properties. *Am J Physiol* 1990; 258:E134-E 142.
- 49- Cohn JN. Cardiac remodeling: basic aspects. Up To Date. [on-line] 2007 [citado 18 set 2007]. Disponível em: http://www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do?topicKey=hrt_fail/18875&selectedTitle=2~59&source=search_result.

- 50- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - Concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 569-582.
- 51- Díez J, Gonzalez A, Lopez B, Querejeta R. Mechanisms of disease: Pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nature.* 2005; 2(4): 209-216.
- 52- Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizume T. Diastolic Dysfunction in hypertensive hearts: Roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. *Hypertens Res.* 2005; 28(6): 483-490.
- 53- Brilla CG, Funck RC, Rupp H. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation.* 2000; 102: 1388-1393.
- 54- Díez J, Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation.* 2002; 105: 2512-2517.
- 55- Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Yasukawa H, Tahara N, Kudo H, Takemiya K, Koga M, Yamamoto T, Imaizumi T. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension.* 2004; 43: 499-503.
- 56- Sun Y, Zhang J, Lu I, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart. Role of oxidative stress. *American Journal of Pathology.* 2002; 161, 5: 1773-1781.

- 57- Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med.* 1992; 120: 893-901.
- 58- Van Empel VPM, Bertrand ATA, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovascular Research.* 2005; 67: 21-29.
- 59- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow).* 2005; 70: 231-239
- 60- Tsutsui H. Novel pathophysiological insight and treatment strategies for heart failure - Lessons from mice and patients. *Circ J.* 2004; 68: 1095-1103.
- 61- Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR. Matrix Metalloproteinases/ Tissue inhibitors of metalloproteinases: Relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation.* 2006;113:2089-2096.
- 62- Meleti Z, Shapiro M, Adams CS. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone*,2000; 27(3):359-366.
- 63- Achinger SG, Ayus JC. Left ventricular hypertrophy: Is hyperphosphatemia among dialysis patients a risk factor? *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: S255-S261.

- 64- Schleiffer R, Bergmann C, Pernot F et al. Parathyroid hormone acute vascular effect is mediated by decreased Ca uptake and enhanced cAMP level. 1989. *Mol Cell Endocrinol*; 67:63-71.
- 65- Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates the endothelial nitric oxide synthase through protein kinase A and C pathways. *Nephrol Dial Transplant*. 2007. 22(10):2831-2837. [Epub ahead of print].
- 66- Jolma P, Kööbi P, Kalliovama J, Saha H, Fan M, Jokihaara J, Moilanen E, Tikkanen I, Pörsti I. Treatment of secondary hyperparathyroidism by high calcium diet is associated with enhanced resistance artery relation in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 2560-2569.
- 67- Azar B, Hamid N. Correlation of Serum Parathormone with Hypertension in Chronic Renal Failure Patients Treated with Hemodialysis. *Saudi J Kidney Dis Transplant*. 2005; 16(3):288-292
- 68- Fallo F, Cella G, Casonato A, Ermani M, Vettor R, Zanella S, Lumachi F. Biochemical Markers of Endothelial activation in Primary Hyperparathyroidism. *Horm Metab Res*. 2006; 38: 125-129.
- 69- Anderson P, Rydberg E, Willenheimer. Primary hyperparathyroidism and heart disease- a review. *European Heart Journal*. 2004; 25:1776-1787.

- 70- Sato S, Ohta M, Kawaguchi Y, Okada H, Ono M, Saito H. Effects of parathyroidectomy on left ventricular mass in patients with hyperparathyroidism. *Mine Electrolyte Metab.* 1995; 21: 67-71.
- 71- Ritz E, Gross M-L, Dikow R. Role of calcium-phosphorous disorders in the progression of renal failure. *Kidney Int.* 2005; 68, S 99: S66-S70.
- 72- Toyota E, Ogasawara Y, Hiramatsu O. *et a.* Dynamics of flow velocities in endocardial and epicardial coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; H1598-H1603.
- 73- Koike MK, Frimm CC, Curi M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction. *Int J Exp Path.* 2007; 88(4):279-290.
- 74- Amann K, Ritz E, Wiest G, Klaus G, Mall G. A role of parathyroid hormone for the activation of cardiac fibroblasts in uremia. *J Am Soc Nephrol.* 1994 ;4(10):1814-9.
- 75- Amann K, Torning J, Flechtenmacher Ch, Nabokov A, Mall G, Ritz E. Blood-pressure-independent wall thickening of intramyocardial arterioles in experimental uraemia: evidence for a permissive action of PTH. *Nephrol Dial Transp.* 1995; 10:2043-2048.
- 76- Narang r, Ridout D, Nonis C, Kooner J S. Serum calcium, phosphorus and albumin levels in relation to the angiographic severity of coronary artery disease. *International Journal of Cardiology.* 1997; 60:73-79.

- 77- Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G. Relation Between Serum Phosphate Level and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease. *Circulation*. 2005;112:2627-2633.