

**Fabiana Giorgeti Gracioli**

Proteínas ósseas envolvidas na calcificação vascular de ratos urêmicos,  
paratireoidectomizados, alimentados com dieta rica e pobre em fósforo  
associada à infusão fixa de paratormônio

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

Área de concentração: Nefrologia  
Orientador: Prof. Dra. Irene de Lourdes  
Noronha

São Paulo  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Fabiana Giorgeti Gracioli**

Proteínas ósseas envolvidas na calcificação vascular de ratos urêmicos,  
paratireoidectomizados, alimentados com dieta rica e pobre em fósforo  
associada à infusão fixa de paratormônio

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

Área de concentração: Nefrologia  
Orientador: Prof. Dra. Irene de Lourdes  
Noronha

São Paulo  
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Graciolli, Fabiana Giorgeti

Proteínas ósseas envolvidas na calcificação vascular de ratos urêmicos, paratireoidectomizados, alimentados com dieta rica e pobre em fósforo associada à infusão fixa de paratormônio / Fabiana Giorgeti Graciolli. -- São Paulo, 2006.

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Nefrologia.

Orientadora: Irene de Lourdes Noronha.

Descritores: 1.Calcinose 2.Proteínas morfogenéticas ósseas 3.Uremia 4.Fósforo  
5.Hormônio paratireóideo 6.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-379/06

Quando surge o convite para o crescimento é hora de seguir adiante, de abrir caminho para o novo, de fazer o que for necessário para cruzar a fronteira entre o conhecido e o desconhecido, trazendo alegrias e riquezas sem preço...

**...ÀDÁYÉBÁ NI ÀDÁYÉ SE AXÉ!**

(que as coisas boas sejam sempre encontradas na Terra)

## **Dedico esse trabalho...**

**Aos meus queridos e amados pais Raul e Edina. Por todo amor, carinho, compreensão e incentivo. Sem vocês certamente seria impossível. Obrigada mãe e pai!**

**Aos meus lindos, amados e carinhosos irmãos Re e Rafa. É difícil encontrar palavras para agradecer todo o apoio que me dedicaram. Obrigada pelo incentivo e orgulho. Amo vocês!**

**Ao meu querido Vô João (*in memoriam*) pela companhia em muitas manhãs nas quais sempre me perguntava: “...mas Bi, você nunca acaba de estudar? Tá na hora de trabalhar...”. Saudades!**

**Aos meus zelosos tios Paulo, Clara, Cláudio e Rosana pelo ombro amigo, acolhedor e principalmente pelas palavras amorosas em tantos momentos ásperos. Valeu!**

**E à minha GRANDE família pelo incentivo, orgulho carinho, zelo e compreensão por todas as ausências. Obrigada a todos.**

**À Dra Vanda Jorgetti, responsável pelo laboratório de Osteodistrofia Renal do LIM 16. Pelo companheirismo, amizade, apoio incansável, dedicação, coragem e ensinamentos para a vida profissional e pessoal. Exemplo de honestidade, respeito e otimismo! Pela minha iniciação no “mundo da ciência”. Muito obrigada por tudo!**

**À Dra Luciene Machado dos Reis. Querida Lú! Pela paciência, incentivo, companhia, amizade e principalmente por acreditar no meu trabalho. Profissional exemplar, pesquisadora incansável e uma amiga maravilhosa. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela ajuda constante e pelas palavras dóceis e confortadoras em tantos momentos difíceis. A você com muito carinho.**



**Aos pequeninos animais que tornam possível a geração do conhecimento. Meu sincero e comovido agradecimento!**

*“...Meu bondoso protetor  
Oro a vós por meus irmãos  
Para que sua dor e tristeza  
Não sejam sofrimentos vãos...”*

## **Agradecimentos**

**À Profa. Dra Irene de Lourdes Noronha, por me receber oficialmente como sua orientanda e por abrir as portas do Laboratório de Imuno-histoquímica do LIM 16 para realização dos testes imuno-histoquímicos.**

**Ao programa de pós-graduação da Disciplina de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP, na pessoa do Dr Rui Toledo Barros, pelo apoio e suporte acadêmico.**

**Ao LIM 16 – Laboratório de Fisiopatologia Renal, particularmente ao Prof. Dr. Roberto Zatz, pelo apoio irrestrito.**

**Ao Laboratório Hipertensão Arterial na pessoa do Dr Joel C. Heimann por abrir as portas de seu laboratório e permitir a realização dos experimentos de biologia molecular. Especialmente à Dra Luzia Naoko Shinohara Furukawa por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e bom humor.**

**À Dra Rosa Maria Affonso Moysés e Dra Kátia Rodrigues Neves pelo auxílio incondicional, idéias, oportunidade de trabalharmos juntas e exemplos de seriedade e perseverança. Como não poderia esquecer, obrigada pelos necessários e maravilhosos momentos de descanso em Salvador. Estendo meu agradecimento às pessoas maravilhosas que lá conheci. Valeu Katinha e Rosinha!**

**À Rozidete A Bizerra Coelho e Rosimeire A Bizerra da Costa, pela amizade e colaboração. Sem sua paciência e dedicação na preparação técnica e histológica a realização deste trabalho seria impossível. Ro e Me obrigada pela força!**

**À Ivone Braga de Oliveira e à Sabrina Gomes de Oliveira pelos valiosos ensinamentos imuno-histoquímicos e tamanha paciência. Muito obrigada queridas amigas!**

**À Dra Renata Cristina Pereira pela valiosíssima ajuda, disponibilidade e ensinamentos ainda que de tão longe. Muito obrigada por todos as dicas do “mundo da biologia molecular”, pelas doações de materiais e de seu valioso tempo que mesmo durante suas férias dispensou para compartilhar sua experiência conosco. Como poderei agradecer TAMANHA ajuda?!**

**Ao Wagner Vasques Domingues, meu querido amigo. Obrigada por toda paciência durante esses anos. Sua ajuda e companhia até tarde e nos finais de semana de muito trabalho foram fundamentais. Muito obrigada, Wagnão!**

**Às Dras Andréa Olivares Magalhães, Daniella Guimarães Batista, Flávia Kfourri e Patrícia Malafronte as meninas super poderosas! Obrigada pelo incentivo e companheirismo, além das muitas risadas e momentos de descontração. Valeu meninas!**

**Às Dras Cristiane Bittencourt Dias e Cilene Pinheiro. Queridas Cris e Cállcio nem sei como agradecer tanto cuidado e companheirismo nas horas boas e nas mais difíceis, também. Nossa viagem estará sempre em meus pensamentos e a amizade em meu coração.**

**À Dra Melani Ribeiro Custódio de Uberlândia para o mundo! Uma pessoa querida, amável, dedicada e zelosa com todos no laboratório. Melzinha muito obrigada pelos cuidados e toda força.**

**Ao Dr Itamar Oliveira Vieira e Dra Carolina Lara Neves pelo incentivo e companheirismo. Querido Itamar que me deu a oportunidade de trabalharmos juntos no início de tudo, obrigada pelos ensinamentos. Carolzinha, mesmo de um pouquinho mais longe continua “arretada”, obrigada por tudo.**

**À Eliane A da Silva e Rita de Cássia Matin que contribuíram com muita paciência e tolerância. Obrigada, Rita e Lili.**

**À Valéria Falco Caparbo pela prontidão e gentileza. Vá muito obrigada por todas as ajudas nos experimentos de biologia molecular e principalmente pela paciência.**

**Aos colegas de pós-graduação que passaram pelo laboratório Dr José Edevanilson Gueiros, Dr André Falcão Pedrosa e Dr Leandro Rodrigues, aos que acabaram de chegar Dra Cristina Karol, Dr Rodrigo Bueno, Mariana Unger e Wagner da Silva Vicente e ao “adendo” Dra Samirah Gomes. Obrigada pelo incentivo e colaboração.**

**Às secretárias do LIM 16 Marineide Ribeiro e Denise Cristina Duarte pela assistência contínua na burocracia dessa instituição.**

**Às minhas queridas amigas e alunas de dança do ventre. Luzia, Dani, Karen, Sandrinha e Michella muito obrigada pela confiança, dedicação e momentos de descontração. *Shokran!!***

**Aos queridíssimos Walter Campestre e Janice Pião que sempre me acolheram com palavras carinhosas e que gentilmente cuidaram dos nossos animaizinhos com respeito e dedicação. Jan e Waltão muito obrigada por tudo!**

**À todo pessoal do LIM 16, que de uma forma ou de outra colaboraram na realização desse trabalho. Especialmente, ao colega Humberto Dellê pela paciência e orientação na realização dos experimentos de biologia molecular. Super obrigada a todos!**

**Às minhas amadas e preciosas amigas Rita de Cássia C. Pelegrino e Cláudia M. Prudente. Gostaria de exaltar a importância de vocês ao longo deste período. Prima obrigada, principalmente, por todos os ensinamentos pois incontestavelmente me ajudaram a ter mais coragem e perseverança. Miga obrigada pelo incentivo, compreensão e principalmente por ouvir todos os desabafos. Adoro vocês!**

**À TODOS os meus queridos amigos que compartilharam momentos de ansiedade e preocupação com muito carinho, compreensão e atenção. Obrigada pela torcida!**

**Às pessoas que esqueci de mencionar...**

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

---

---

## Sumário

Lista de Tabelas e Figuras

Resumo

Summary

1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	12
3. Materiais e Métodos .....	13
3.1 - Seleção de animais .....	13
3.2 - Paratireoidectomia (PTX) .....	13
3.3 - Nefrectomia 5/6(Nx) e implante de mini-bomba osmótica .....	13
3.4 - Dietas empregadas e grupos estudados .....	14
3.5 - Troca da mini-bomba osmótica .....	16
3.6 - Obtenção e processamento de amostras para avaliação bioquímica, histológica e gênica .....	16
3.6.1 – Bioquímica .....	16
3.6.2 – Histologia .....	16
3.6.2.1 – Preparo das amostras para avaliação histológica - Histoquímica com método Von Kossa .....	17
3.6.2.2 – Preparo e avaliação do tecido ósseo não descalcificado... 3.6.2.2.a – Preparo e emblocamento do tecido ósseo não descalcificado em resina .....	17
3.6.2.2.b – Histomorfometria óssea .....	18
3.6.2.3 – Preparo e avaliação por imuno-histoquímica do tecido ósseo não descalcificado, cardíaco e vascular .....	18
3.6.2.3.a – Preparo e microtomia .....	18
3.6.2.3.b – Imuno-histoquímica pelo método <i>HorseradishImunoperoxidase</i> .....	19
3.6.3 – Avaliação de Expressão Gênica .....	20
3.6.3.1 – Extração de RNA total .....	21
3.6.3.2 – Reação de transcriptase reversa (RT) .....	23
3.6.3.3 – Reação de Polimerase em cadeia (PCR) .....	24
4. Análise Estatística .....	26
5. Resultados .....	27
5.1 – Consumo da dieta .....	27
5.2 – Avaliação bioquímica .....	28
5.3 – Análise histológica .....	28

---

---

5.3.1 – Calcificação Cardiovascular .....	28
5.3.2 – Histomorfometria Óssea .....	29
5.3.3 – Imuno-histoquímica .....	33
5.4 – Avaliação da Expressão Gênica .....	41
6. Discussão .....	44
7. Conclusões .....	52
8. Referências Bibliográficas .....	54
Anexo	

---

---

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 .....	7
Figura 2 e 3 .....	29
Figura 4 .....	30
Figura 5 e 6 .....	31
Figura 7, 8 e 9 .....	35
Figura 10, 11, 12, 13 e 15.....	36
Figura 16, 17, 18, 19 e 20 .....	37
Figura 22, 23, 24, 25, 26 e 27 .....	38
Figura 28, 29, 30, 31, 32 e 33 .....	39
Figura 34, 35, 36 e 37 .....	40
Figura 38 .....	41
Figura 39 e 40 .....	42
Figura 41 e 42 .....	43
Tabela 1 .....	19
Tabela 2 .....	25
Tabela 3 .....	27
Tabela 4 .....	28
Tabela 5 .....	32
Tabela 6 .....	32
Tabela 7 .....	32
Tabela 8 .....	38

---

---

## Resumo

Alterações do tecido ósseo e calcificações vasculares (CV) são complicações freqüentes nos pacientes com doença renal crônica (DRC). A participação do fósforo (P) e do paratormônio (PTH) na CV ainda não está totalmente esclarecida. Estudos *in vitro* demonstraram que concentrações elevadas de P promovem transformações fenotípicas de células musculares lisas vasculares (CMLV) em osteoblastos-like, confirmada pela superexpressão de *Runx2* nestas células. Além disso, a expressão de *Runx2* foi demonstrada na camada média e íntima de artérias calcificadas em pacientes DRC, confirmando a transformação. Estudamos os efeitos do P e do PTH na remodelação óssea e na expressão de proteínas ósseas (*Runx2*, osteoprotegerina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e NFκB) em aorta e coração de animais nefrectomizados (Nx). Ratos Wistar foram submetidos à paratireoidectomia, nefrectomia e infusão contínua de PTH de rato fração 1-34, em concentrações fisiológicas ou 5 vezes maior que a fisiológica. A dieta foi idêntica, entretanto o conteúdo de P foi diferente, sendo denominado pobre (pP: 0,2%) ou rico (rP: 1,2%). Realizamos análises bioquímicas, histomorfométricas, imuno-histoquímicas e de RT-PCR. Ratos Nx desenvolveram doença renal moderada. A sobrecarga de P contribuiu para a perda de massa óssea, independente da insuficiência renal. Entretanto, nos animais urêmicos que receberam doses elevadas de PTH, essa perda foi menos intensa, provavelmente pela ação anabólica do PTH que se contrapôs aos efeitos tóxicos da sobrecarga de P. A calcificação vascular, só foi observada em animais Nx que receberam infusão de altas doses de PTH independente da carga de P que receberam. Porém, a sobrecarga de P nos animais que receberam infusão fisiológica de PTH induziu mudança fenotípica em CMLV comprovada pela superexpressão de *Runx2* na aorta destes animais. O P e o PTH em altas concentrações modificaram histologicamente a expressão de osteoprotegerina e colágeno tipo I nas áreas de calcificação da aorta e do coração. Nosso estudo não demonstrou qual o valor ideal de PTH, suficiente para manter a integridade óssea e impedir calcificação vascular, quando o animal é exposto a diferentes sobrecargas de P.



---

---

## Summary

Bone tissue alterations and vascular calcification (VC) are commonly found in patients with chronic renal failure (CKD). The importance of phosphorus (P) and parathyroid hormone (PTH) is not clear, yet. An in vitro study showed that inorganic phosphate was able to transform vascular smooth muscle cells (VSMC) into calcifying cells confirmed for up-expression of Runx2 in these cells. Besides, it has been demonstrated the in vivo expression of Runx2 in intimal and medial VSMC in calcified arteries of CKD patients. We evaluated the effect of phosphorus (P) and parathyroid hormone (PTH) on bone remodeling and on the expression of bone proteins (Runx2, Osteoprotegerin, type I Collagen, Osteocalcin, Osteopontin and NFκB) in aortic valve and heart in experimental uremia. Wistar rats were submitted to parathyroidectomy, nephrectomy (Nx) and continuous infusion of 1-34 rat PTH in physiologic or 5 times the normal values. The diet was identical, however the P content was low (LP: 0,2%) or high (HP: 1,2%). We performed biochemical, histomorphometric, imuno-histochemistry and RT-PCR analysis. Rats submitted to Nx developed renal failure. The P overload contributed to loss bone volume independent of uremia. Besides Nx animals that received high PTH doses bone loss was slight probably because of the anabolic effect of PTH, which was attenuated by the phosphorus overload toxic. VC was only observed in Nx animals that received high PTH doses independently of P overload. However, the P overload with physiologic PTH doses induced phenotypic changes in VSMC that was confirmed for the up-expression of Runx2 on aorta of these animals. The high concentrations of P and PTH promoted histological changes on expression of osteoprotegerin and type I Collagen in calcified arteries and heart. This study does not established ideal levels of PTH sufficient for the maintenance of the bone integrity and also to prevent VC when animal are submitted to different P overload.

## 1. Introdução

Desde o início da terapia dialítica criou-se a expectativa de que, com a uremia controlada, os pacientes com doença renal crônica (DRC) teriam uma sobrevida próxima do normal[1].

Entretanto, mesmo com a melhora da qualidade dos métodos dialíticos observada nas últimas décadas, a morbidade e mortalidade nesses pacientes permanecem elevadas. Dentre as causas de mortalidade, as cardiovasculares representam cerca de 50% dos óbitos[2, 3]

As principais complicações cardiovasculares são: hipertrofia ventricular esquerda (HVE), doença obstrutiva coronariana (DOC) e insuficiência cardíaca[4].

Cerca de 40% a 75% dos pacientes que iniciam o tratamento dialítico já apresentam manifestações de doenças cardiovasculares (DCV) e a mortalidade por essas complicações é 10 a 30 vezes maior que na população geral, mesmo quando corrigida para fatores como sexo, raça e presença de Diabetes Mellitus[5, 6].

Em 1974, Lindner *et al* já descreviam uma elevada frequência de doença cardíaca e de mortalidade de causa cardíaca, levantando a hipótese da existência de uma forma acelerada de aterosclerose nessa população. A favor dessas evidências, há outros trabalhos que destacavam a correlação inversa entre o enrijecimento vascular e a função renal[7, 8]

Atualmente sabe-se que a prevalência de ateroma nas artérias coronárias de pacientes com DRC é de aproximadamente 30% (achados de autópsia)[9]. Outra

evidência importante é que mesmo pacientes com discreta redução da função renal apresentam uma taxa acelerada de progressão do DOC[10, 11].

A elevada mortalidade por DCV nesses pacientes pode ser atribuída a fatores de risco populacionais, relacionados à terapia dialítica e à uremia.

Os fatores de risco observados na população em geral como, idade avançada, sexo masculino, histórico familiar de DOC, hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, Diabetes Mellitus, menopausa e sedentarismo[12], bem como os relacionados à terapia dialítica como as alterações inflamatórias[13] favorecem o desenvolvimento de DCV mas não explicam totalmente a elevada frequência desses eventos nesses pacientes.

Nos últimos anos os fatores relacionados à uremia tem sido muito estudados[14, 15]. Postula-se que o soro urêmico contenha substâncias tóxicas que afetam adversamente o sistema cardiovascular e o paratormônio (PTH) é uma destas toxinas[4, 16, 17]. Além disso, distúrbios do metabolismo mineral como alteração do cálcio e do fósforo são destacados[18].

Perdas de função renal da ordem de 50% são suficientes para aumentar a síntese de PTH levando ao hiperparatireoidismo secundário (HPT2).

A etiopatogenia do HPT2 é multifatorial, valendo destacar a retenção de fósforo conseqüente à queda de filtração glomerular e a diminuição dos níveis séricos de calcitriol secundária à redução da massa renal, dois fatores que favorecem a diminuição dos níveis de cálcio sérico. Além disso, esses pacientes apresentam resistência esquelética à ação calcêmica do PTH o que implica em um menor incremento do cálcio sérico frente a elevações desse hormônio, resultando também em hipocalcemia. Esses fatores se correlacionam profundamente, proporcionando

elevação da secreção de PTH[3]. Estima-se que cerca de 50% do pacientes com DRC em diálise desenvolvem HPT2[2].

O HPT2, a desmineralização do esqueleto e a perda da estabilidade estrutural dos ossos podem aumentar a fragilidade desse tecido e favorecer o aparecimento de fraturas. O excesso de PTH leva a um aumento na remodelação óssea (Osteíte Fibrosa) além de ser considerado um fator importante na gênese das calcificações extra-ósseas.

Entretanto, tratamento com doses elevadas de calcitriol ou cálcio podem diminuir os níveis de PTH e também prejudicar a remodelação óssea desses pacientes resultando em doença adinâmica.

As manifestações clínicas dessas doenças, tanto da Osteíte Fibrosa quanto da doença adinâmica são amplas, variando desde quadros assintomáticos até lesões graves e incapacitantes, tais como deformidades ósseas e fraturas[1, 19].

Atualmente preconiza-se que para manter uma remodelação óssea adequada nos pacientes com DRC os níveis de PTH devem ser mantidos entre 2 a 3 vezes o valor normal, ou seja, aproximadamente 200pg/mL<sup>5</sup>. Acredita-se que esses valores são suficientes para sobrepor a resistência óssea ao PTH e dessa forma manter a remodelação óssea próxima do normal, evitando os efeitos deletérios decorrentes da alta e baixa remodelação. Todavia para o sistema cardiovascular valores acima de 60pg/mL seriam maléficos desencadeando DCV

O controle do HPT2 é fundamental, não somente pelo dano em potencial para o esqueleto, como também pelos efeitos deletérios do excesso de PTH no organismo. Além das células renais e ósseas, tradicionalmente conhecidas como alvo do PTH,

outras células possuem receptores para esse hormônio como, por exemplo, as células do coração, baço, cérebro, pulmões, músculo esquelético e liso[4].

Os efeitos do HPT2 na função cardíaca já foram descritos por alguns pesquisadores[16, 17]. A calcificação extra-óssea observada em urêmicos é em parte resultante da combinação da disfunção da glândula paratireóide, do metabolismo alterado da vitamina D e distúrbios de íons divalentes.

Massry & Smogorzewskis, em 1994, demonstraram que o excesso crônico de PTH facilita a entrada de cálcio nas células, através de diferentes vias que contribuem para a diminuição da produção de ATP mitocondrial e conseqüentemente, impedem a ação de enzimas como a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase e  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$  ATPase. Uma alteração importante na membrana fosfolipídica, por mecanismos ainda pouco esclarecidos, também impede a atividade da  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$  ATPase e da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, contribuindo para a diminuição da extrusão de cálcio e entrada de sódio na célula. Esses fatores favorecem o aumento de sua concentração intracelular, inibição da função mitocondrial, diminuindo ainda mais a produção de ATP que, por sua vez, sustenta a elevação de cálcio dentro destas células. Conseqüentemente, esses eventos poderiam resultar em morte celular[4, 5].

Confirmando esses achados, Block *et al* demonstraram que valores de PTH acima de 600pg/mL se correlacionam positivamente com aumento da mortalidade por causas cardiovasculares[20].

Recentemente, Tsuchihashi *et al* demonstraram que o hipoparatiroidismo era um fator de risco independente no aparecimento de calcificações cardiovasculares. Dessa forma, devemos ressaltar que tanto o excesso de PTH, quanto sua redução são deletérios para os pacientes com DRC. Calcificações extra-ósseas se desenvolvem

em pacientes com hipoparatiroidismo sem elevação do produto Ca x P (cálcio x fósforo), com valores aceitáveis de fósforo e calcitriol plasmático, o que sugere que outros fatores estão envolvidos nas calcificações[7].

O controle do fósforo sérico (P) tem sido reconhecido há muitos anos como um fator essencial no tratamento de pacientes com DRC[21]. Na DRC avançada, a excreção de P é insuficiente e o tratamento dialítico corrige parcialmente seus níveis séricos, assim, a hiperfosfatemia é um achado freqüente nesses pacientes[8]. A importância do controle do P era atribuída ao seu papel na patogênese do HPT2, contudo, outros distúrbios secundários à sua retenção têm sido descritos[22].

A hiperfosforemia e elevação do produto Ca x P, foram estudadas por Block *et al* demonstrando que pacientes com DRC em tratamento dialítico e com níveis de fósforo sérico maiores que 5,5mg/dL apresentavam mortalidade significativamente mais elevada[8, 20]. Além disso, a hiperfosfatemia aumenta o risco de calcificação coronariana e, conseqüentemente, o risco de óbito[9].

Por muitas décadas a calcificação extra-óssea desses pacientes foi considerada um evento passivo. Entretanto, estudos recentes modificaram profundamente esses conceitos.

Atualmente, a calcificação vascular é descrita como um processo ativo e regulado por células que podem, mediante certos estímulos, diferenciarem-se, adquirindo fenótipo de osteoblastos capazes de sintetizar proteínas reguladoras da mineralização.

Sabe-se que o P participa deste processo de forma direta e indireta como descrito a seguir e exemplificado na figura 1.

O mecanismo de mineralização envolve o aumento do transporte de P devido ao estímulo do fator de crescimento PDGF que possibilita maior entrada deste na célula (ação direta)[23, 24]. O aumento do P intracelular ativa vias de sinalização que levam à expressão de *Runx2* e conseqüente produção de proteínas ósseas (ex. osteocalcina e osteopontina), redução da expressão de genes específicos da célula muscular lisa e estímulo da secreção de moléculas que funcionam como fatores de nucleação mineral favorecendo a calcificação vascular.

Uma outra via (ação indireta) cogitada para a indução da calcificação vascular secundária à hiperfosfatemia seria através da secreção excessiva do PTH que aumenta a remodelação óssea contribuindo para elevação do fósforo sérico[18, 19, 25, 26].

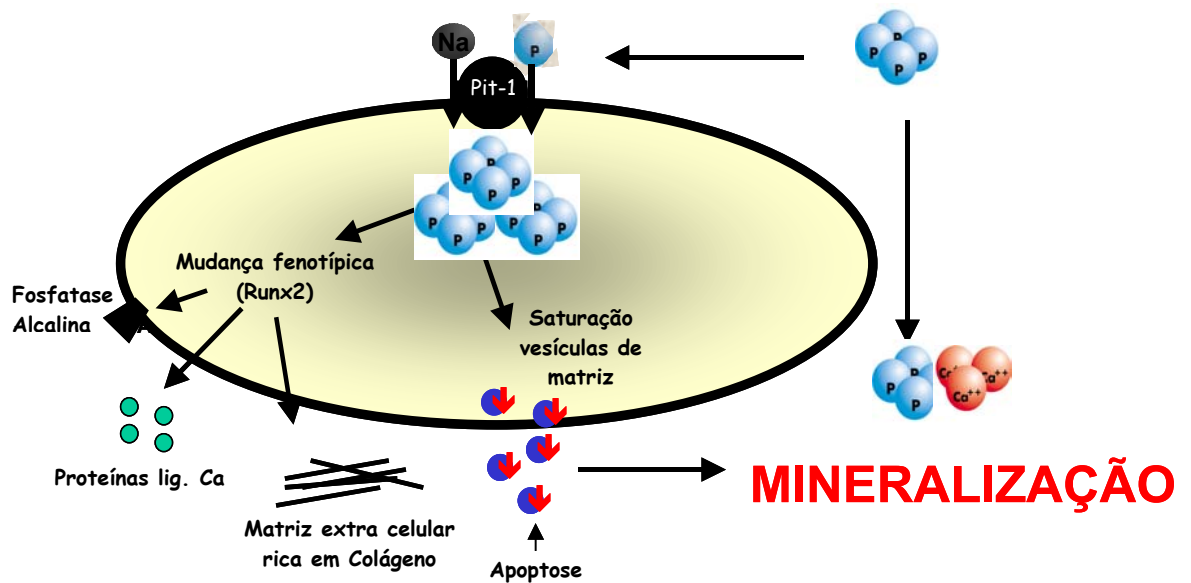


Figura 1. Mecanismo de ação: Mineralização da célula muscular lisa vascular via P  
 NOTA: Adaptado de: Giachelli *et al Am J Kidney Dis.* 2001;38 (Suppl 1):S34-37[24].

Recentemente, Moe *et al* demonstraram essa transformação fenotípica em artérias de pacientes com DRC. Nesses pacientes, artérias calcificadas apresentavam expressão evidente de proteínas da matriz óssea[27].

Como descrito anteriormente, o principal e mais precoce marcador de diferenciação osteoblástica é o *Runx2*[28]. Um fator transcricional que induz a expressão de proteínas típicas dos osteoblastos como a fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina[29, 30].

Essas proteínas são constitutivas do tecido ósseo e participam do processo de calcificação óssea. Suas principais funções são resumidas a seguir.



### ***Runx2***

O *Runx2* é o marcador mais precoce de diferenciação osteoblástica. Esse marcador apresenta altas taxas de expressão nos osteoblastos durante o desenvolvimento embrionário e mesmo depois do nascimento[31].

Esse fator foi identificado, em parte, por sua sensibilidade em controlar a osteocalcina, ou seja, a expressão do *Runx2* em células não osteoblásticas faz com que essas células expressem genes osteoblasto-específicos incluindo o da osteocalcina. A hiperexpressão do *Runx2* induz a produção de marcadores fenotípicos da linhagem osteoblástica como a fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina[32, 33].

### ***Osteoprotegerina***

A osteoprotegerina (OPG) pertence à superfamília de receptores de TNF (Tumoral Necrosis Factor) e é considerada uma inibidora da osteoclastogênese. Sua expressão é observada não somente no tecido ósseo como também em cartilagens e vasos. A OPG é um regulador fisiológico de remodelação óssea pois inibe a diferenciação osteoclástica. Estudo de Bucay *et al*, demonstrou que a deleção de OPG em ratos urêmicos leva a osteoporose[32, 34].

### ***Osteopontina***

A osteopontina (OPN) pertence à família das glicoproteínas fosforiladas que contêm sequências de ácido poliaspártico e glutâmico frequentemente encontrado em proteínas com alta afinidade mineral. A OPN participa da regulação do processo de mineralização, estimulando ou inibindo a formação de cristais de hidroxiapatita, de

acordo com sua concentração. Além disso, regula a proliferação celular e reabsorção óssea.

Esta sialoproteína foi a primeira proteína não colágena identificada na matriz óssea, bem como a primeira proteína induzida por transformação celular. No tecido ósseo é produzida pelos osteoblastos em diferentes estágios de sua maturação[35].

### ***Osteocalcina***

A osteocalcina (OCN) e a proteína Gla da matriz (MGP) pertencem a uma família de proteínas com alta afinidade pelo cálcio conhecida como proteínas Gla. São ativadas formando resíduos de glutamato que sofrem carboxilação na posição  $\gamma$  levando à formação do ácido carboxiglutâmico (Gla). Esse processo é dependente da vitamina K e os resíduos Gla são responsáveis pela fixação do cálcio nas proteínas. O papel da osteocalcina é altamente significativo e seu excesso ou deficiência pode causar alterações estruturais importantes na matriz óssea. Esta proteína participa da regulação da atividade dos osteoclastos, de seus precursores, e pode determinar o período entre a formação e reabsorção do tecido ósseo[35].

### ***Colágeno Tipo I***

A matriz extracelular óssea é constituída por uma fase orgânica e outra inorgânica. A fase orgânica é rica em colágeno tipo I (Col I) e proteínas não colágenas como a fibronectina, a osteocalcina, sialoproteínas, proteoglicanos e outros. Cerca de 90% da matriz orgânica é constituída de fibras colágenas exclusivamente do tipo I.

Várias substâncias como citocinas, hormônios, vitaminas e fatores de crescimento podem modificar a síntese do colágeno pelos osteoblastos e/ ou fibroblastos[35].

O colágeno é uma proteína estrutural que, dentre outras funções, serve de molde para deposição mineral. Em situações onde a produção de colágeno é deficiente, a deposição mineral é anormal, levando à diminuição da massa óssea e fraturas[36]. Traços de colágeno do tipo III, V, X e FACIT também estão presentes na matriz óssea podendo regular o diâmetro da fibra colágena[37].

Como citado anteriormente, fatores como a inflamação e a participação de proteínas, hormônios, citocinas que medeiam esse processo, tem sido extensamente investigados.

Recentemente Raines *et al*, estudando mecanismos inflamatórios sugeriram que esses processos estimulados principalmente, pela deposição de minerais no tecido vascular, ativa uma série de fatores e entre eles o fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). O NF $\kappa$ B é um fator transcricional que faz parte de um complexo de proteínas, ativadas pela inflamação e *stress* celular e participa da regulação de centenas de genes e diferentes programas transcricionais. Trabalhos *in vitro* e *in vivo* evidenciam sua importância na regulação da expressão de genes da célula muscular lisa e de funções celulares após determinadas lesões. Pouco se conhece sobre sua participação nas alterações vasculares da DRC[38].

Em virtude das associações entre HPT2, distúrbios dos íons divalentes e maior mortalidade por DCV, se postula mudanças na forma atual de tratar o HPT2[19, 39].

De um lado, sabe-se que os níveis de PTH elevados (ao redor de 200pg/mL) são necessários para manter a remodelação óssea dentro do normal e que níveis reduzidos desse hormônio favorecem o desenvolvimento de doença adinâmica. De outro, valores de PTH dentro da normalidade (60pg/mL) parecem ser mais adequados para o aparelho cardiovascular.

Até o momento, somente um trabalho avaliou a ação do fósforo simultaneamente na remodelação óssea e no tecido cardiovascular. Nele Neves *et al* demonstraram que os animais desenvolveram hiperfosfatemia marcante, sem calcificação vascular, porém com diminuição do volume ósseo e piora da função renal[40]. Numa segunda etapa, utilizando este mesmo modelo, porém com reposição de PTH em altas doses, demonstraram que animais tratados com dieta rica em fósforo apresentavam calcificação vascular severa na camada média da aorta, lembrando o modelo de calcificação de Monckberg[41].

Neste estudo pretendemos analisar, além da remodelação óssea, as alterações histológicas e gênicas do tecido cardiovascular de ratos nefrectomizados, mantidos com níveis fisiológicos ou elevados de PTH e alimentados com dieta rica e pobre em fósforo, buscando um paralelo adequado entre os valores séricos de fósforo e PTH para que se mantenha a remodelação óssea dentro de padrões adequados sem prejuízos para o sistema vascular.

## 2. Objetivo

Analisar o tecido ósseo e cardiovascular de ratos urêmicos paratireoidectomizados alimentados com dietas rica e pobre em fósforo e mantidos com diferentes níveis séricos de PTH.

Mais especificamente, os objetivos do presente estudo são:

1. Analisar a remodelação óssea através da histomorfometria;
2. Analisar a expressão de proteínas possivelmente envolvidas no processo de calcificação de tecidos extra-ósseos através de imunohistoquímica;
3. Investigar e quantificar a expressão gênica dessas proteínas no tecido cardiovascular através de *RT-PCR*;

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. - Seleção de Animais**

Utilizamos ratos Wistar machos adultos com peso entre 280 a 320g aclimatados durante uma semana no biotério e alojados em gaiolas individuais com livre acesso à água e dieta controle (Harlan-Teklad, Madison-WI, EUA). A composição da dieta foi de 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).

#### **3.2. - Paratireoidectomia (PTX)**

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (50mg/Kg de peso) por via intra peritoneal (ip), para realização da PTX. Foi feita 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 aplicado uma dose de penicilina benzatina (100.000Ui/Kg intra muscular). Os animais controle foram submetidos à anestesia com exposição da traquéia e tireóide e receberam a mesma dose de antibiótico.

#### **3.3. - Nefrectomia 5/6 (Nx) e Implante de Mini-bomba osmótica**

Os animais se recuperaram por uma semana e em seguida receberam dieta controle (15 a 20g/dia) com sistema *pair-feeding*.

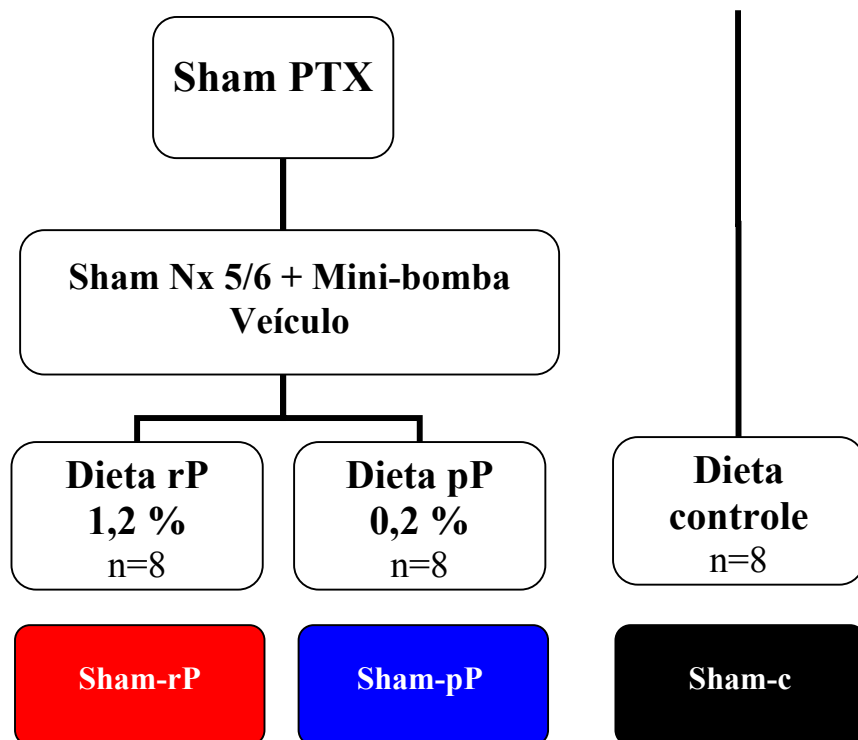
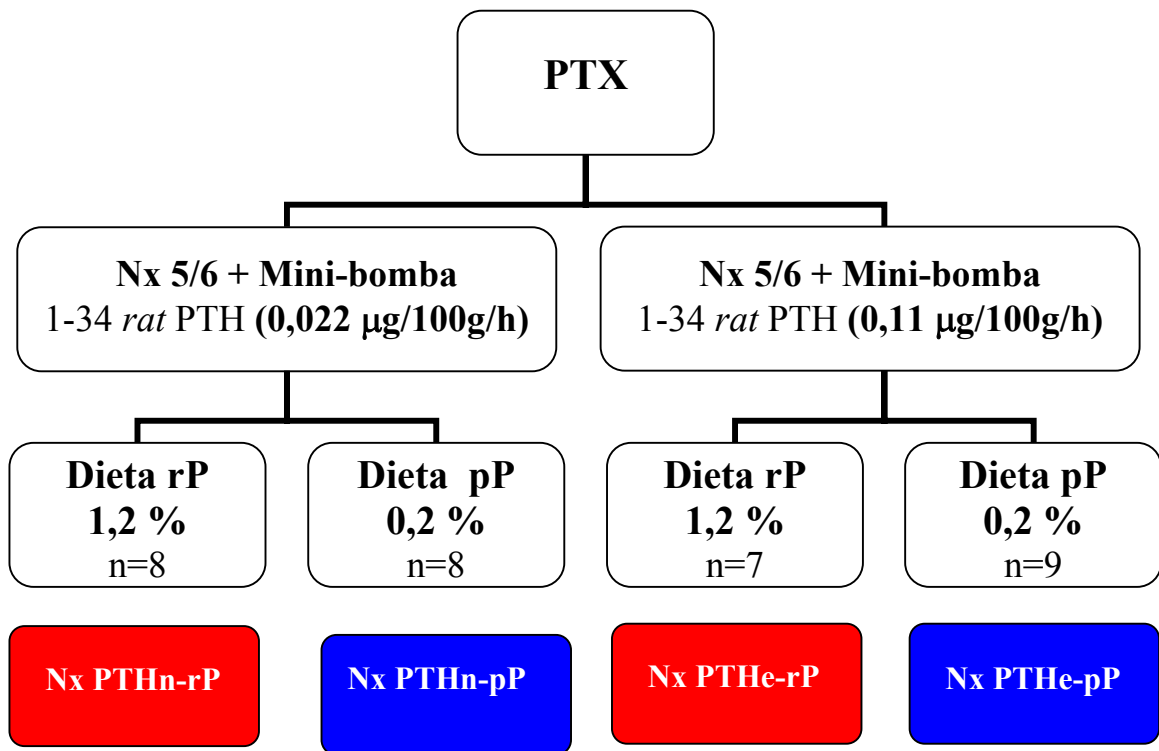
Para realização da nefrectomia os animais foram anestesiados com pentobarbital (50mg/Kg) ip. Foi efetuada coleta de sangue para determinação imediata do cálcio (Ca) a utilizando-se Analisador de eletrólitos AVL-9140. A eficácia da paratireoidectomia foi confirmada pelo valor de cálcio ( $\leq 7,5$  mg/dL). Estes animais foram mantidos no estudo e submetidos à ablação renal, com implante de mini bomba osmótica para infusão intermitente de PTH.

Para a ablação foi feita 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. Outra incisão foi feita na região interescapular para implante de mini-bomba osmótica (Alzet 2mL) que liberou continuamente PTH sintético de rato (fragmento 1-34). Essa incisão foi fechada com fio de algodão 4-0. Foi aplicada uma dose de penicilina benzatina (100.000Ui/Kg, i.m.). Os animais controle (Sham) foram submetidos a laparotomia com manipulação do hilo renal e implante de mini-bomba osmótica contendo veículo.

#### **3.4. – Dietas empregadas e grupos estudados**

Após o período de recuperação cirúrgica, foi oferecida dieta para os ratos com distintas concentrações de fósforo: dieta rica em fósforo [1,2%], dieta pobre em fósforo [0,2%] de acordo com o grupo estudado. Foi adotado sistema *pair feeding*.

A seguir descrevemos esquematicamente a distribuição dos sete grupos de animais estudados:





### **3.5. - Troca da mini-bomba osmótica**

A troca da mini bomba foi necessária, pois a durabilidade da mesma é de 28 dias. A mini-bomba foi substituída por outra capaz de manter a mesma taxa de infusão do PTH no 29<sup>o</sup> dia pós-implante. Para tanto o animal foi levemente anestesiado com éter.

### **3.6 - Obtenção e processamento de amostra para avaliação bioquímica, histológica e gênica**

Findo o período do experimento (8 semanas) os animais foram sacrificados após anestesia com pentobarbital (50mg/Kg) via ip.

#### **3.6.1 – Bioquímica**

Os animais foram submetidos à coleta de sangue através de punção aórtica. O material foi centrifugado e o soro aliqüotado e armazenado em *freezer* -20°C. A concentração de cálcio foi avaliada com Analisador de eletrólitos AVL-9140, o fósforo por método colorimétrico Labtest (Lagoa Santa, MG/BR), a Creatinina (Cr) com método colorimétrico Heinegard-Tiderstrom modificado e o PTH através de radioimunoensaio (rat PTH IRMA kit –Immutopics San Clemente, CA, EUA).

#### **3.6.2 - Histologia**

Fragmentos do coração, um pequeno segmento da aorta, os dois fêmures, uma tibia e segmentos do esterno foram coletadas e processadas.

### **3.6.2.1 – Preparo das amostras para avaliação histológica – Histoquímica com método de Von Kossa**

Os fragmentos de coração e aorta destinados à avaliação histológica foram fixados em formaldeído a 4% e embebidos em parafina. Cortes de fragmentos de espessura de 5 µm foram corados utilizando-se a Coloração de *Von Kossa* e analisados em microscópio de luz.

### **3.6.2.2 – Preparo e avaliação do tecido ósseo não descalcificado**

#### **3.6.2.2.a – Preparo e emblocamento do tecido ósseo não descalcificado em resina**

Efetuamos a marcação com tetraciclina na dose de 25 a 30mg/Kg via injeção ip nos dias 11<sup>o</sup>, 12<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, respectivamente, que antecederam a data do sacrifício dos animais. Foram separados os fêmures e o tecido foi avaliado sem descalcificação prévia, após inclusão conforme a técnica descrita abaixo.

Os fragmentos foram fixados em Etanol 70 % e processados conforme as seguintes etapas:

- a) permanência no Etanol a 70% por 7 dias.
- b) permanência no Etanol a 100% por 7 dias.
- c) permanência no Tolueno por 1 dia.
- d) permanência na solução A (metilmetacrilato 75% + dibutilftalato 25%) por 7 dias.
- e) permanência na solução A + peróxido de benzoíla a 1% por 7 dias.
- f) permanência na solução A + peróxido de benzoíla a 2.0% por 7 dias.
- g) transferência do fragmento, para um frasco molde em solução a 2%, para uma estufa à 37°C, por 24 horas, até a polimerização do metacrilato.

h) de cada bloco foram obtidos 12 cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  distribuídos em 6 lâminas com dois cortes em cada uma, corados com Azul de Toluidina 0,1% (pH 6.4) para análise histológica. Foram obtidos também 2 cortes histológicos de 10  $\mu\text{m}$ , distribuídos em 2 lâminas, com um corte em cada uma, não corados, para a análise das marcações pela tetraciclina, empregando-se uma fonte de luz ultravioleta. Todos os cortes foram obtidos em micrótomo de impacto Policut S (Leica, Alemanha) e com navalha de tungstênio tipo D.

#### **3.6.2.2.b – Histomorfometria óssea**

Na realização da histomorfometria óssea, utilizou-se microscópio (Nikon, Labophot-2A), cursor, placa digitalizadora e o *software Osteomeasure* (Osteometrics, Inc, Atlanta, EUA).

Os parâmetros histomorfométricos foram divididos em estáticos, estruturais e dinâmicos e seguiram a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research*, traduzida para o português, com exceção das abreviações[42].

#### **3.6.2.3 – Preparo e avaliação por imuno-histoquímica do tecido ósseo não descalcificado, cardíaco e vascular**

##### **3.6.2.3.a – Preparo e microtomia**

O esterno, coração e aorta foram divididos em segmentos menores ( $\cong 0,5\text{cm}^3$ ), imediatamente criopreservados em base de cortiça montados na orientação desejada com meio de congelamento *Tissue Tek* e imersos lentamente em nitrogênio líquido por 30 segundos. Em seguida foram acondicionados em *freezer*  $-80^\circ\text{C}$  onde permaneceram até o momento da obtenção dos cortes no criostato.

### 3.6.2.3.b – Imuno-histoquímica pelo método *HorseradishImunoperoxidase*

A detecção de proteínas que participam da mineralização óssea e que potencialmente estivessem presentes no tecido cardíaco e vascular se fez por imuno-histoquímica.

Optamos pela técnica de avidina/biotina HRP (*horseradish peroxidase complex*). Após a retirada dos cortes histológicos do freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , realizamos bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogênio e álcool metílico a 1% por 30 minutos. Em seguida, bloqueamos com avidina seguido pelo bloqueio da biotina por 15 minutos (*Kit Biotin Blocking System*, DAKO Corporation, CA, EUA). Após este procedimento, foi feito o bloqueio inespecífico com soro não imune de cavalo, na diluição 1:20 durante 30 minutos, em seguida empregamos os anticorpos primários.

A seguir os cortes foram incubados com o anticorpo primário, em câmara úmida a  $4^{\circ}\text{C}$ , por período e diluição determinados previamente (tabela 1).

**Tabela 1. Relação dos anticorpos, diluição e tempo de incubação utilizados na imuno-histoquímica**

Anticorpo	Diluição	Tempo de incubação
Anti-PEBP2 $\alpha$ A policlonal feito em cabra (Cbfa1 – S19, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:50	1 hora
Anti-Osteoprotegerina policlonal feito em cabra (OPG – N20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:20	<i>Overnight</i> (ON)
Anti-Osteopontina policlonal feito em cabra (OPN – P18, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:50	1 hora
Anti-Osteocalcina policlonal feito em cabra (OCN – V19, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:50	1 hora
Anti-Colágeno Tipo I policlonal feito em cabra (Col I – M19, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:50	1 hora
Anti-NF $\kappa$ B p65 (A) policlonal feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:50	ON

Após lavagem, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (anti-IgG de cabra biotilado, feito em cavalo, na diluição de 1:1000 para os anticorpos anti-OPG, Col I, Runx2, OCN, OPN e anti-IgG de coelho biotilado, feito em cavalo, para o anticorpo anti-NFκB) por 45 minutos. Como última etapa, as lâminas foram incubadas com o complexo avidina/biotina HRP (*StreptABCComplex/HRP*, DAKO Corporation, CA, EUA) por 30 minutos.

A revelação para os cortes foi efetuada com diaminobenzina – DAB (DAKO Corporation, CA, EUA) ou com 3 amino-9 ethyl-carbazol – AEC (Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA). As revelações por AEC e DAB foram acompanhadas ao microscópio e, em seguida, interrompidas com fosfato tamponado (PBS). As lavagens foram sempre realizadas com PBS.

Os cortes foram contracorados com Hemalumbre de Mayer por cerca de 1 minuto e as lâminas montadas com glicergel (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) e analisados em microscópio óptico.

### **3.6.3 - Avaliação de Expressão Gênica**

Para extração de RNA e posterior realização do transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) os fragmentos de coração e aorta foram lavados com PBS em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC - Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA), colocados em tubos de criogenia, mergulhados em nitrogênio líquido por 30 segundos e, imediatamente estocados em *freezer* –80°C.

### 3.6.3.1 - Extração de RNA total

A extração de RNA total dos tecidos se fez através do método de tiocianato de guanidina adaptado.

Para as soluções de extração de RNA utilizamos com água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Milli-Q Element A10 System, Massachusetts, EUA) e tratada com 0,1% DEPC (Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA). Essa solução permaneceu em temperatura ambiente ON, sendo autoclavada (121°C por 20 minutos) no dia seguinte.

Para a extração de RNA total utilizamos uma solução de extração composta de: 14,2g de tiocianato de guanidina (Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA) dissolvidos em água até o volume de 29mL. Acrescentamos 1mL de citrato de sódio 0,75 M (Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA) pH=7,0. Dez mililitros desta solução foram misturados com 10mL de fenol:água 3,75:1 (Gibco BRL, Rockville, EUA), mais 1mL de acetato de sódio 2M (Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA) pH=4,0, mais 151µL de β-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA).

Cada fragmento dos diferentes órgãos analisados foram retirados do *freezer* – 80°C e imediatamente imersos em 1,5mL de solução de extração. Os tecidos foram homogenizados com dispersador de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke & Kunkel, Alemanha). Ao homogenato adicionamos 150µL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (Merck, Darmstadt, Alemanha) seguido de agitação durante 10 segundos. O homogenato foi mantido em gelo por 30 minutos e centrifugado a 12.000g, 4°C por 20 minutos. A fase superior, contendo o RNA foi transferida para um tubo de 2mL com o mesmo volume de isopropanol gelado

(Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA). As amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período ON.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos e o precipitado de RNAm ressuspendido com 1mL de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Seguiu-se nova centrifugação a 12.000g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por mais uma vez e, por último, o RNAm foi eluído com 50 $\mu\text{L}$  de água DEPC.

A quantificação do RNA se fez em espectrofotômetro (HITACHI U-2000, Pleasanton, EUA), medindo-se a densidade óptica (DO) nos comprimentos de onda 260 e 280nm. A concentração de RNA foi expressa em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a partir da absorbância à 260nm. A leitura de 1 DO corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A leitura a 280nm foi utilizada para determinar se a contaminação das amostras por proteínas, uma vez que aminoácidos aromáticos, especialmente resíduos de triptofano absorvem (no máximo) luz a 280nm. A análise final foi obtida de razão entre as absorbâncias a 260 e 280nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0. A concentração de RNA foi calculada pela fórmula:

Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )=  $\text{DO}_{260}$  x diluição (quando houver) x 0,040  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (fator de conversão)

A integridade das moléculas de RNA foi conferida através de eletroforese em gel de agarose (Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA) 1,5%, em tampão MOPS 5% (ácido morfolino propano sulfônico 0,02M [Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA], acetato de sódio 5mM [Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA] e EDTA 0,5mM [Sigma Chemical Co, Sto Louis, EUA]) pH=7,0. As amostras foram consideradas

adequadas quando eram visualizadas, pelo menos, duas bandas distintas para cada amostra, referentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal.

### 3.6.3.2 - Reação de transcriptase reversa (RT)

A expressão gênica do Runx2 e da Osteocalcina na aorta e no coração foi realizada pelo método de RT-PCR conforme descrito por Katwa, *et al*[43]. Os diversos reagentes utilizados descritos a seguir foram adquiridos da empresa Labtrade, Brasil.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada através da reação de RT utilizando-se a enzima RT ImProm II (Promega, Brasil). O protocolo para a síntese de cDNA foi dividido em três fases; sendo a primeira, a fase de desnaturação, onde 1 µg de RNA total foi colocado em tubo livre de RNase e DNase. Adicionamos 1 µL de oligo deoxirribonucleotídeo T (oligo dT) 150 ηg/mL e completou-se o volume com água DEPC para 5 µL. Os tubos foram colocados em termociclador (PTC-200, MJ Research, Inc., EUA) e incubados a 70°C por 5 minutos.

Na segunda fase, conhecida como fase de anelamento, preparamos uma solução constituída por 4 µL de tampão de reação 5X; 1 µL de dNTP [2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato] (10 mM); 2,4 µL de cloreto de magnésio (25 mM); 6,6 µL de água Milli-Q autoclavada e 1 µL de Improm II. Essa solução foi adicionada às amostras e levadas ao termociclador utilizando um programa de 25°C por 5 minutos e depois 60 minutos a 42°C. Na última fase ocorre a inativação da transcriptase reversa por aquecimento a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.



### 3.6.3.3 - Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  de cDNA foi transferida para tubo livre de RNase e DNase onde realizamos a reação de PCR. Preparou-se uma solução de reação contendo em cada tubo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão PCR 10X [100 mM Tris HCl pH 8,5 e 500 mM KCl]; 0,75  $\mu\text{L}$  de cloreto de magnésio (50 mM); 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM); 3  $\mu\text{L}$  de *primer* sense (5  $\rho\text{Mol}/\mu\text{L}$  – Invitrogen Life Technologies, Brasil); 3  $\mu\text{L}$  de *primer* antisense (5  $\rho\text{Mol}/\mu\text{L}$  - Invitrogen Life Technologies, Brasil); 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase; 2,5  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) e 11,35  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. A solução foi homogeneizada em *vortex* e adicionada ao tubo contendo amostra de cDNA. Em seguida foram colocadas no termociclador.

Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio usando um DNA *ladder* de 100 pares de base (Invitrogen Life Technologies, Brasil). Rotineiramente fizemos um controle negativo omitindo apenas o cDNA da reação de PCR. As bandas foram semiquantificadas usando o software Alpha Imager<sup>TM</sup> 1220 version 5.5 (Alpha Innotech Corporation, EUA) e comparadas com a expressão gênica da  $\beta$ -actina, expressa como valor de densidade integrada (IDV/  $\beta$ -actina).

As quantidades de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos usados no PCR das amostras da aorta e do coração estão descritas na tabela 2. É importante ressaltar que a temperatura de anelamento é específica do gene (*primer*) e o número de ciclos é diferente para o mesmo gene, variando conforme o tecido.

**Tabela 2: Quantidade de cDNA, seqüência dos primers, tamanho da gene e temperatura de anelamento**

Gene	Seqüência dos primers	Tamanho (pb)	Temp. anelamento
$\beta$ -actina (3 $\mu$ g)	(as) 5' TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT – 3' (s) 5' TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG – 3'	331	57,2°C
Runx2 (3 $\mu$ g)	(as) 5' GTA GTG AGT GGT GGC GGA CAT – 3' (s) 5' CCT CAC TGA GAG CCG CTT CT – 3'	110	57°C
Osteocalcina (3 $\mu$ g)	(as) 5' GGA AGC CAA TGT GGT CCG CTA – 3' (s) 5' GGT GCA AAG CCC AGC GAC TCT – 3'	310	60°C

## **4. Análise Estatística**

A análise dos resultados foi obtida com o programa estatístico GraphPad Prism V.201. Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão (Média  $\pm$  EP) para as variáveis com distribuição normal e mediana (mínimo; máximo) para as demais variáveis. Consideram-se valores estatisticamente significativos de  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

Estudamos 53 ratos Wistar machos com peso inicial ao redor de 300g completando os grupos propostos no protocolo original. A duração média dos experimentos foi de 52 dias.

### 5.1. - Consumo da dieta

O peso dos animais no início do experimento foi semelhante. Houve ganho de peso no transcorrer do estudo, chamando atenção que, mesmo com o uso do *pair feeding*, os animais do grupo Nx PTHe-rP apresentaram menor ingestão de dieta e, portanto, peso menor que os demais (tabela 3).

**Tabela 3. Peso inicial, final e ingestão de dieta dos animais dos grupos estudados**

	Sham-rP (a)	Nx PTHn-rP (b)	Nx PTHe-rP (c)	Sham-pP (d)	Nx PTHn-pP (e)	Nx PTHe-pP (f)	Sham-c (g)
Peso início (g)	311,1 ± 13,2	322,0 ± 10,0	336,43 ± 8,46	310,3 ± 10,5	307,9 ± 11,8	307,44 ± 6,18	343,80 ± 6,31
Peso final (g)	397,9* ± 8,82	352,3 ± 16,82	340,1 ± 20,77	432,3 <sup>#</sup> ± 13,02	416,9 <sup>+</sup> ± 12,29	305,9 ± 7,26	415,20 <sup>§</sup> ± 3,02
Ingestão (g/d)	17,53 ± 0,40	15,77 ± 0,38	11,89 ± 0,86	17,59 ± 0,47	17,19 ± 0,54	12,28 ± 0,29	16,40 ± 0,15

p < 0,05: \* a vs f; <sup>#</sup> d vs b, c, f; <sup>+</sup> e vs b, f, c; <sup>§</sup> g vs c, f

## 5.2. - Avaliação bioquímica

Os animais dos grupos Nx PTHn-rP e Nx PTHe-rP apresentaram hipocalcemia e hiperfosfatemia significativas quando comparados aos demais grupos.

A creatinina sérica (Cr) foi maior nos grupos nefrectomizados, com exceção do grupo Nx PTHn-pP, que manteve os níveis de creatinina próximo de seu controle (Sham-pP).

A concentração sérica de PTH foi proporcional à concentração de PTH infundida. Com relação aos grupos sham, os animais alimentados com dieta rica em fósforo (Sham-rP) apresentaram níveis mais elevados de paratormônio (tabela 4).

**Tabela 4. Parâmetros bioquímicos**

	Sham-rP (a)	Nx PTHn-rP (b)	Nx PTHe-rP (c)	Sham-pP (d)	Nx PTHn-pP (e)	Nx PTHe-pP (f)	Sham-c (g)
Cai (mmol/L)	1,23 <sup>*</sup> ± 0,07	0,61 <sup>#</sup> ± 0,05	0,58 <sup>+</sup> ± 0,09	1,22 ± 0,05	1,19 ± 0,05	1,44 <sup>§</sup> ± 0,08	1,16 ± 0,02
P (mg/dL)	4,95 ± 0,33	15,71 <sup>£</sup> ± 2,56	13,56 <sup>¢</sup> ± 2,03	4,43 ± 0,39	5,59 ± 0,48	5,04 ± 0,58	6,0 ± 0,7
Cr (mg/dL)	0,46 ± 0,03	1,09 <sup>&amp;</sup> ± 0,15	1,08 <sup>ψ</sup> ± 0,25	0,32 ± 0,01	0,56 <sup>Ω</sup> ± 0,04	1,02 <sup>ω</sup> ± 0,11	0,37 ± 0,02
PTHi (pg/mL)	135,9 ± 28,6	86,8 ± 20,3	380,0 <sup>φ</sup> ± 66,6	10,5 ± 2,8	114,9 ± 28,1	249,64 <sup>π</sup> ± 45,2	54,7 ± 16,9

p < 0,05: <sup>\*</sup> a vs b, c; <sup>#</sup> b vs d, e, f, g; <sup>+</sup> c vs d, e, f, g; <sup>§</sup> f vs g; <sup>£</sup> b vs d, a; <sup>¢</sup> c vs a, d; <sup>&</sup> b vs a, d, e, g; <sup>ψ</sup> c vs a, d, g; <sup>Ω</sup> e vs d, g; <sup>ω</sup> f vs a, d, e, g; <sup>φ</sup> c vs a, b, d, e, g; <sup>π</sup> f vs b, d, g

## 5.3. - Análise Histológica

### 5.3.1. – Calcificação Cardiovascular

No momento do sacrifício os animais dos grupos Nx PTHe-pP e Nx PTHe-rP apresentaram ao exame macroscópico aorta endurecida, calcificada, com aspecto conhecido como “traquéia de passarinho”. Os cortes histológicos corados por *Von*

*Kossa* demonstraram calcificação da camada média dessas aortas (figura 2). Quanto ao tecido cardíaco detectamos, pela mesma coloração, calcificação em vasos de calibre médio (figura 3). Não detectamos calcificações em aorta ou tecido cardíaco dos animais dos demais grupos.

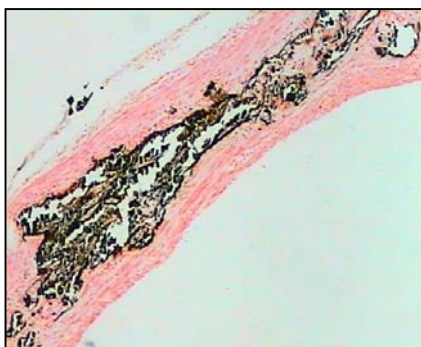


Figura 2. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Coloração Von Kossa (40x)

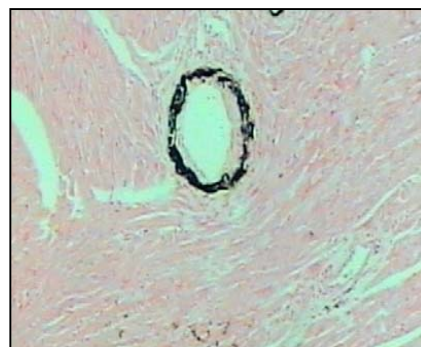


Figura 3. Fragmento de tecido cardíaco. Coloração Von Kossa (40x)

### 5.3.2. – Histomorfometria Óssea

As figuras 4, 5 e 6 demonstram os resultados dos parâmetros estruturais dos animais Sham e nefrectomizados.

Os animais que ingeriram dieta rica em fósforo, Sham-rP, Nx PTHn-rP e Nx PThe-rP, apresentaram redução do volume trabecular (BV/TV), menor espessura (Tb.Th) e menor número (Tb.N) de trabéculas que os animais alimentados com dieta pobre em fósforo.

Nas tabela 5 estão descritos os parâmetros de formação óssea. Os animais nefrectomizados que ingeriram dieta rica em fósforo e elevada infusão de PTH (Nx PThe-rP) apresentaram menor superfície osteóide (OS/BS) assim como menor número de osteoblastos por perímetro (N.Ob/B.Pm) que os animais do grupo Nx PThe-pP.

Os parâmetros de reabsorção estão descritos na tabela 6. Animais com PTH elevado apresentaram maior superfície de reabsorção (ES/BS) que os demais grupos.

Quanto aos parâmetros dinâmicos, a superfície mineralizante (MS/BS), a taxa de aposição mineral (MAR) e a taxa de formação óssea (BFR/BS) foram maiores nos animais nefrectomizados quando comparados com os grupos Sham (tabela 7).

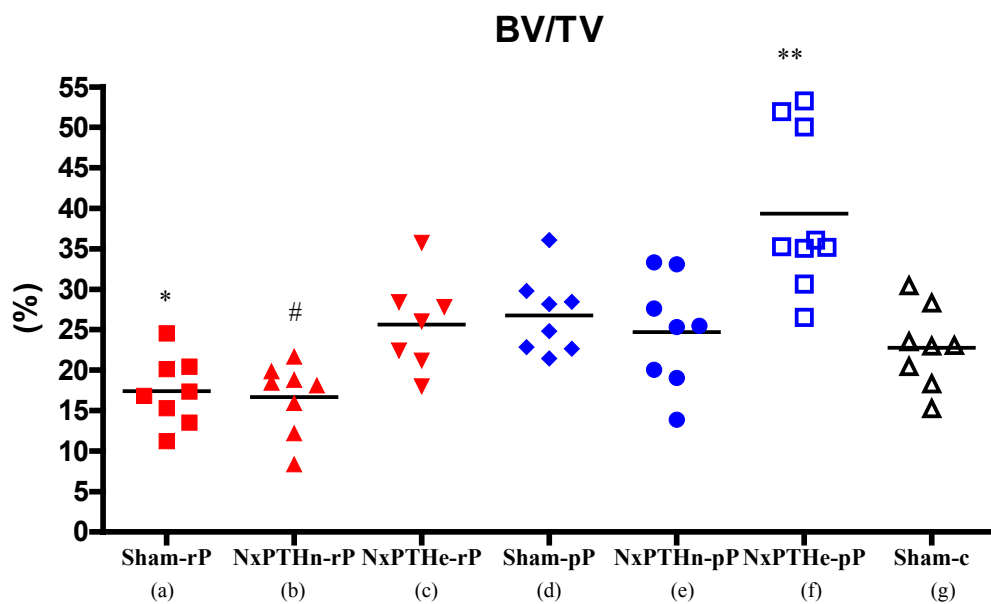


Figura 4. Volume trabecular (BV/TV) dos animais de todos os grupos  
 $p < 0,05$ : \*a vs d, g    \*\*f vs b, c, e    # b vs c, e

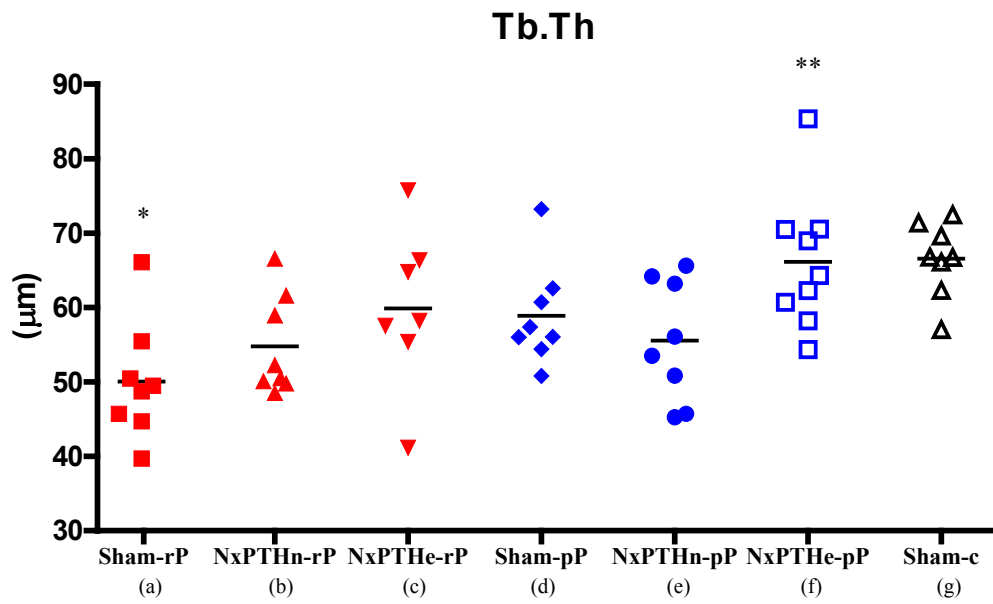


Figura 5. Espessura Trabecular (Tb.Th) dos animais de todos os grupos  $p < 0,05$ : \* a vs d, g \*\* f vs b, e

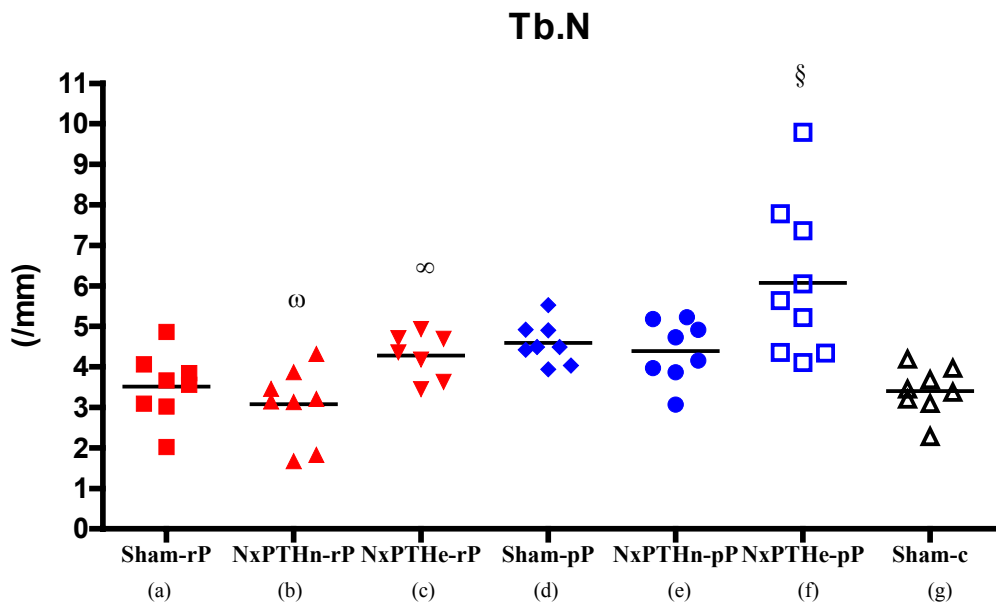


Figura 6. Número de trabéculas (Tb.N) dos animais de todos os grupos  $p < 0,05$ : § f vs b, c, e, ∞ c vs e, f ω b vs e



**Tabela 5: Análise histomorfométrica de parâmetros de formação (fêmur distal)**

	Sham-rP (a)	Nx PTHn-rP (b)	Nx PTHe-rP (c)	Sham-pP (d)	Nx PTHn-pP (e)	Nx PTHe-pP (f)	Sham-c (g)
<b>O.th</b> ( $\mu\text{m}$ )	2,15 <sup>o</sup> $\pm 0,09$	3,16 $\pm 0,68$	2,66 $\pm 0,34$	1,73 <sup>e</sup> $\pm 0,22$	2,11 $\pm 0,20$	3,40 $\pm 0,25$	1,63 <sup>o</sup> $\pm 0,21$
<b>OS/BS</b> (%)	6,70 $\pm 1,93$	16,97 $\pm 4,35$	29,86 <sup>#</sup> $\pm 4,49$	5,46 $\pm 1,37$	11,09 $\pm 1,66$	44,65* $\pm 2,08$	3,84 $\pm 0,67$
<b>N.Ob/B.P.</b> (/mm)	3,27 $\pm 1,20$	5,76 $\pm 1,87$	16,67 <sup>e</sup> $\pm 3,55$	2,85 $\pm 0,46$	4,58 $\pm 0,98$	29,8 <sup>s</sup> $\pm 1,7$	1,65 $\pm 0,29$

Oth: espessura osteóide; OS/BS: superfície osteóide; N.Ob/B.P.: densidade da superfície osteoblástica  
 $p < 0,05$ : <sup>o</sup>a vs c <sup>e</sup>d vs b, c, f <sup>o</sup>g vs b, c, e, f <sup>#</sup>c vs d, e; f \* f vs a, b, d, e; <sup>e</sup>c vs a, b, e;

<sup>s</sup>f vs a, b, c, e

**Tabela 6: Análise histomorfométrica de parâmetros de reabsorção (fêmur distal)**

	Sham-rP (a)	Nx PTHn-rP (b)	Nx PTHe-rP (c)	Sham-pP (d)	Nx PTHn-pP (e)	Nx PTHe-pP (f)	Sham-c (g)
<b>ES/BS</b> (%)	11,85 $\pm 2,20$	13,96 $\pm 1,95$	24,97 <sup>£</sup> $\pm 1,85$	10,37 $\pm 1,44$	13,96 $\pm 2,0$	22,81 <sup>£</sup> $\pm 12,48$	8,89 $\pm 4,71$
<b>N.Oc/B.P</b> (/mm)	1,40 $\pm 0,21$	1,19 $\pm 0,23$	2,63 <sup>£</sup> $\pm 0,21$	1,34 $\pm 0,24$	1,41 $\pm 0,28$	1,91 <sup>o</sup> $\pm 0,33$	1,04 $\pm 0,28$

ES/BS: superfície de reabsorção; N.Oc/B.Pm: densidade da superfície osteoclástica  
 $p < 0,05$ : <sup>£</sup>c vs a, b, d, e, g <sup>£</sup>f vs d, e, g <sup>o</sup>f vs d, e

**Tabela 7: Análise histomorfométrica de parâmetros dinâmicos (fêmur distal)**

	Sham-rP (a)	Nx PTHn-rP (b)	Nx PTHe-rP (c)	Sham-pP (d)	Nx PTHn-pP (e)	Nx PTHe-pP (f)	Sham-c (g)
<b>MS/BS</b> (%)	3,59 $\pm 0,66$	5,8 $\pm 1,19$	4,11 $\pm 0,84$	3,09 $\pm 0,56$	4,47 $\pm 0,34$	3,93 $\pm 0,58$	3,55 $\pm 0,43$
<b>MAR</b> (%)	0,76 $\pm 0,09$	1,16 $\pm 0,13$	1,15 $\pm 0,31$	0,78 $\pm 0,05$	1,17 $\pm 0,19$	0,91 $\pm 0,31$	0,78 $\pm 0,11$
<b>BFR/BS</b> $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$	0,025 $\pm 0,008$	0,07* $\pm 0,02$	0,05 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,005$	0,05 $\pm 0,006$	0,04 $\pm 0,01$	0,02 $\pm 0,002$
<b>MLT</b> (dias)	6,4 $\pm 1,17$	12,01 $\pm 5,10$	41,92 <sup>♦</sup> $\pm 19,49$	6,28 $\pm 1,82$	4,34 $\pm 0,59$	59,99 <sup>o</sup> $\pm 22,72$	2,53 $\pm 0,56$

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

$p < 0,05$ : \*b vs a, d, g <sup>♦</sup>c vs b, e; <sup>o</sup>f vs a, b, e

### 5.3.3. – Imuno-histoquímica

A tabela 8 resume os resultados da análise qualitativa da expressão das proteínas Col I, OPG, Runx2, OCN, OPN e NFκB na aorta e coração dos diferentes grupos estudados.

**Tabela 8. Expressão das proteínas Col I, OPG, Runx2, OCN, OPN e NFκB no coração e aorta**

	Sham-rP (a)	Nx PTHn-rP (b)	Nx PTHe-rP (c)	Sham-pP (d)	Nx PTHn-pP (e)	Nx PTHe-pP (f)	Sham-c (g)
<b>ColI</b>	-a/+c	-a/+c	+a/+c	-a/+c	-a/+c	+a/+c	+a/+c
<b>OPG</b>	-a/+c	-a/+c	+a/+c	-a/+c	-a/+c	+a/+c	+a/-c
<b>Runx2</b>	-a/-c	+a/-c	+a/-c	-a/-c	-a/-c	+a/-c	-a/-c
<b>OCN</b>	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c
<b>OPN</b>	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c	-a/-c
<b>NFκB</b>	-a/-c	-a/-c	+a/+c	-a/-c	-a/-c	+a/+c	-a/-c

+ = marcação positiva, - = marcação negativa; a=aorta, c=coração

As figuras (7, 8 e 9) são controles negativos das reações de imuno-histoquímicas.

As proteínas Col I, OPG, Runx2, OCN, OPN são constitutivas do tecido ósseo e foram utilizadas como controle positivo do método (figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Na aorta o Col I foi detectado na camada adventícia de todos os grupos. Porém, nos grupos Nx PTHe-rP e Nx PTHe-pP que cursaram com intensa calcificação, a expressão dessa proteína foi também evidenciada na camada média (figuras 16, 17, 18 e 19).

O Col I expressou-se esparsamente em regiões próximas a vasos de diferentes calibres no coração dos animais de todos os grupos. Porém, nos animais dos grupos Nx PTHe-rP e Nx PTHe-pP, essa proteína foi evidenciada em vasos de médio calibre e em áreas com fibrose (figuras 20, 21, 22 e 23).

A OPG foi detectada em células da camada adventícia de aorta em todos os grupos. Também encontramos OPG em células endoteliais de vasos do tecido cardíaco de todos os grupos, exceto o Sham-c (figuras 24, 25 e 26). Nos animais dos grupos Nx PTHe-rP e Nx PTHe-pP, que cursaram com calcificação da aorta, essa proteína também foi encontrada na camada média (figuras 27, 28 e 29).

A expressão do Runx2 foi observada em células da limitante elástica interna e na camada média do vaso nos animais do grupo Nx PTHn-rP (figuras 30, 31 e 32). Nos animais com calcificação da aorta, ou seja, Nx PTHe-pP e Nx PTHe-rP, a expressão dessa proteína foi intensa nessas áreas (figuras 33, 34 e 35).

A expressão de NFκB foi positiva na aorta (camada média e adventícia) e no coração (células perivasculares) unicamente nos animais que cursaram com calcificação (figuras 36 e 37).

As expressões de osteocalcina e de osteopontina foram negativas tanto na aorta como no coração de todos os animais.

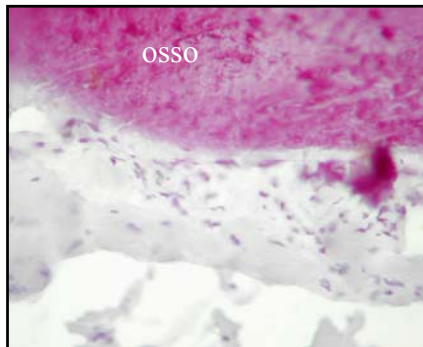


Figura 7. Fragmento de tecido ósseo não descalcificado (esterno). Controle negativo para o método imuno-histoquímico (400x)

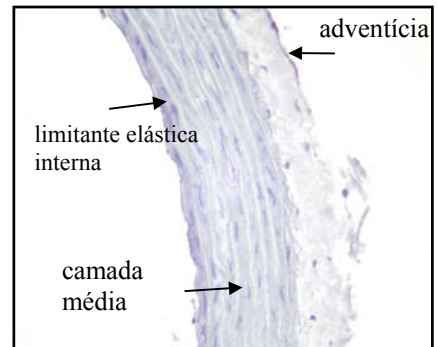


Figura 8. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Controle negativo do método imuno-histoquímico (400x)

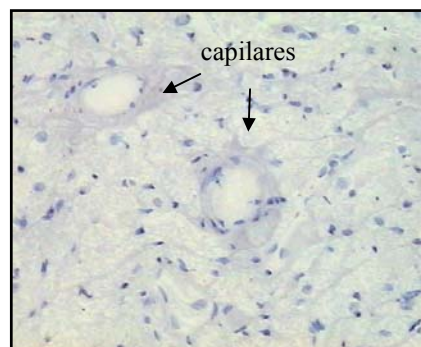


Figura 9. Fragmento de tecido cardíaco. Controle negativo do método imuno-histoquímico (400x)



Figura 10. Fragmento de tecido ósseo (esterno) não descalcificado. Expressão de Colágeno Tipo I, indicada pela seta, no osteóide (400x) - AEC



Figura 11. Fragmento de tecido ósseo (esterno) não descalcificado. Expressão de Colágeno Tipo I, indicada pelas setas na matriz osteóide (400x) - AEC

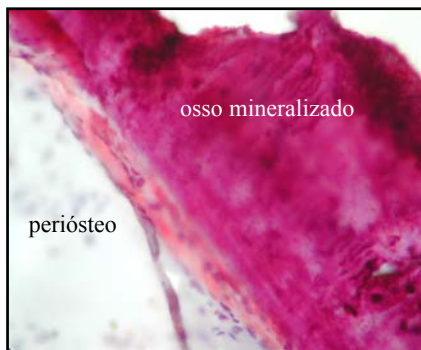


Figura 12. Fragmento de tecido ósseo não descalcificado (esterno). Expressão de OPG indicada pela seta no periosteio (400x) - AEC

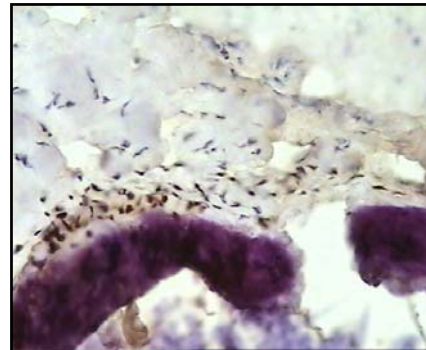


Figura 13. Fragmento de tecido ósseo não descalcificado (esterno). Expressão de Runx2 no periosteio (400x) - DAB

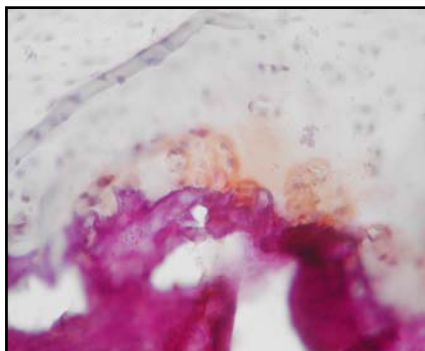


Figura 14. Fragmento de tecido ósseo não descalcificado (esterno). Expressão de OCN no periosteio (400x) - DAB

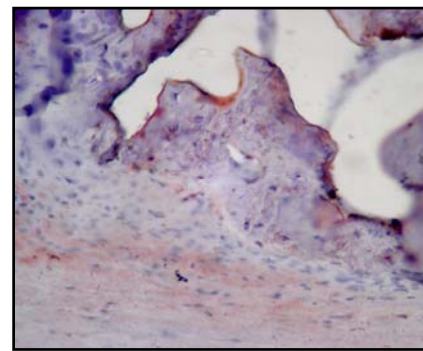


Figura 15. Fragmento de tecido ósseo não descalcificado (esterno). Expressão de OPN no periosteio (400x) - AEC

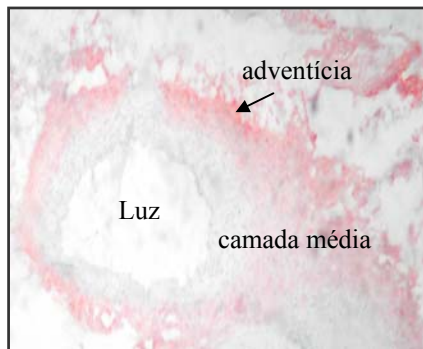


Figura 16. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Colágeno Tipo I, indicada pela seta, na camada adventícia (40x) - AEC

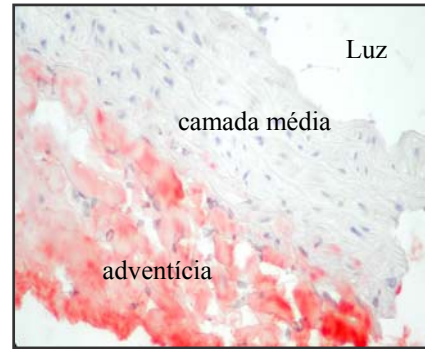


Figura 17. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Colágeno Tipo I na camada média (400x) - AEC

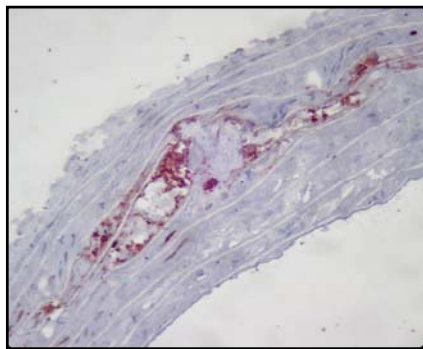


Figura 18. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Colágeno Tipo I, indicada pela seta, na camada média (200x) - AEC

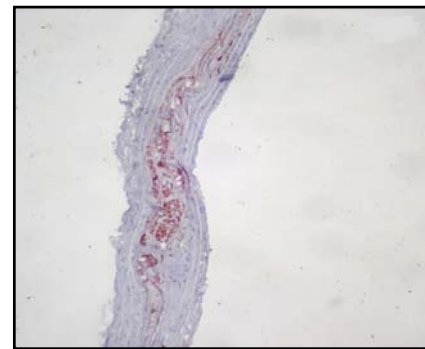


Figura 19. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Colágeno Tipo I, indicada pela seta, na camada média (400x) - AEC

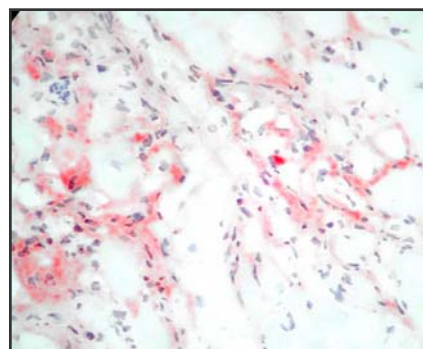


Figura 20. Fragmento de tecido cardíaco. Expressão de Colágeno Tipo I indicada pelas setas, na matriz extracelular (400x) - AEC

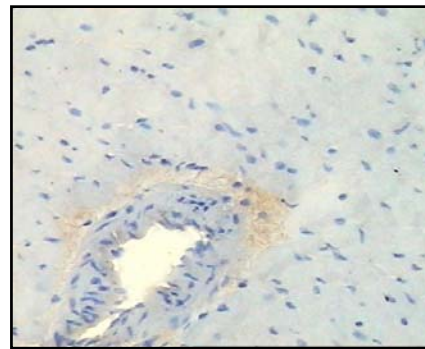


Figura 21. Fragmento de tecido cardíaco. Expressão de Colágeno Tipo I em células perivasculares (400x) - DAB

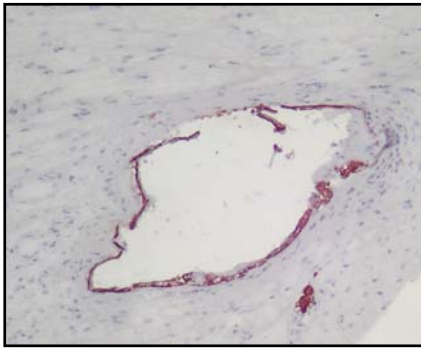


Figura 22. Fragmento de tecido cardíaco. Expressão de Colágeno Tipo I indicada pela seta, em vaso (200x) - AEC

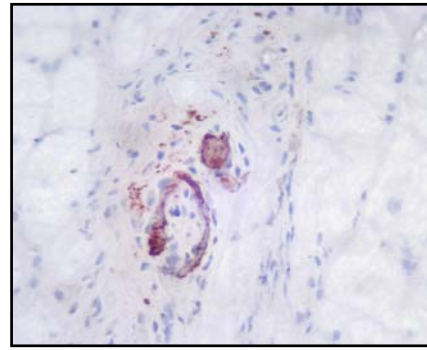


Figura 23. Fragmento de tecido cardíaco. Expressão de Colágeno Tipo I indicada pela seta, em vaso e regiões de fibrose (400x) - AEC

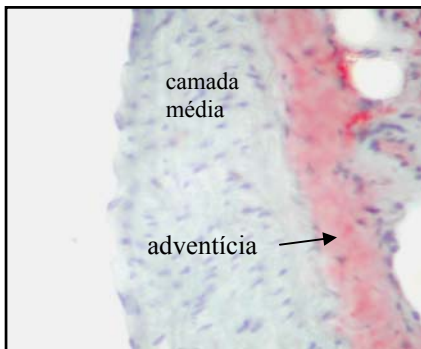


Figura 24. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de OPG indicada pela seta na camada adventícia (400x) - AEC

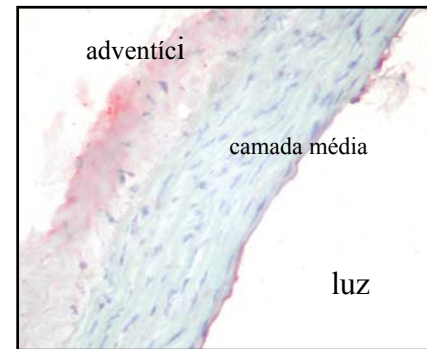


Figura 25. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de OPG na camada adventícia (400x) - AEC

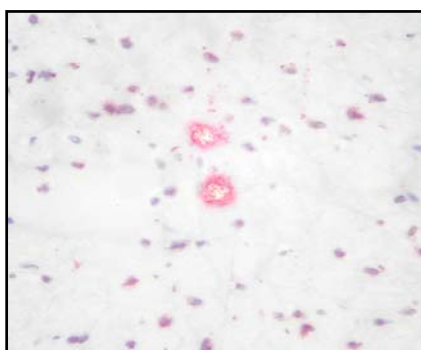


Figura 26. Fragmento de tecido cardíaco. Expressão de OPG, indicada pelas setas na parede de capilares (400x) - AEC

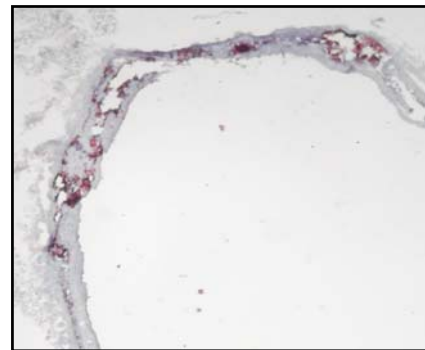


Figura 27. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de OPG na camada média em região calcificada (100x) - AEC



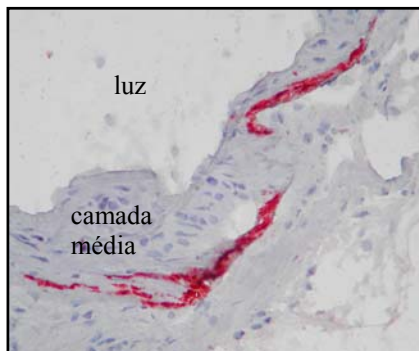


Figura 28. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de OPG na camada média (400x) - AEC

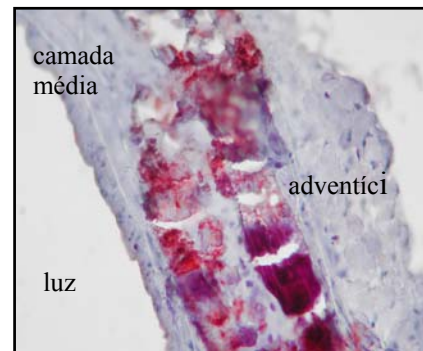


Figura 29. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de OPG na camada média em região calcificada (400x) - AEC

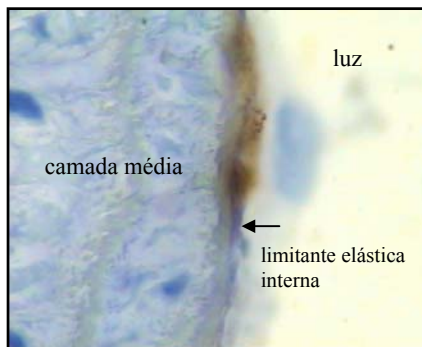


Figura 30. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Runx2 em células da limitante elástica interna (1000x) - DAB

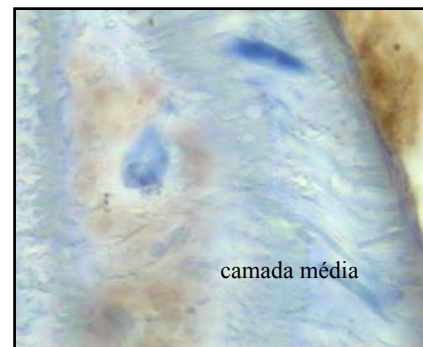


Figura 31. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Runx2 em células da camada média (1000x) - DAB

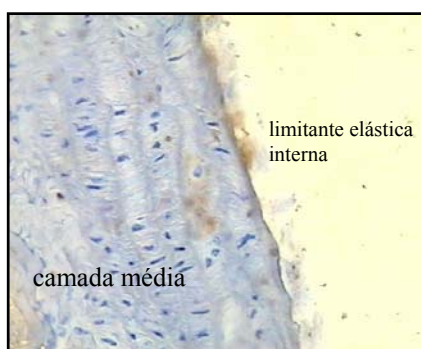


Figura 32. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Runx2 em células da camada média e limitante elástica interna (200x) - DAB

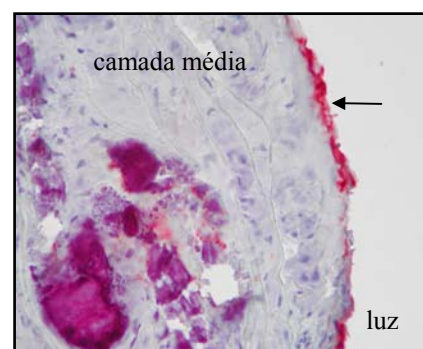


Figura 33. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Runx2 na camada média em região calcificada e limitante elástica interna (400x) - AEC



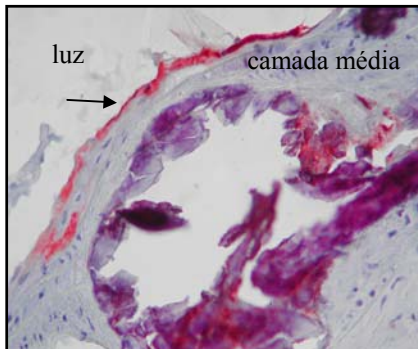


Figura 34. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Runx2 na camada média em região calcificada e limitante elástica interna (400x) - AEC

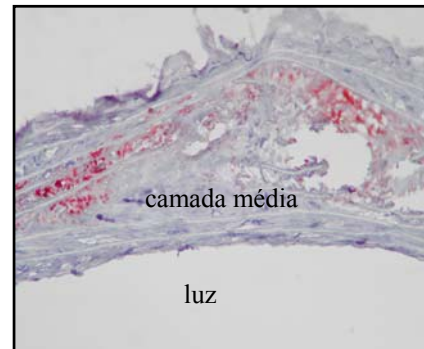


Figura 35. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de Runx2 em células da camada média (200x) - AEC

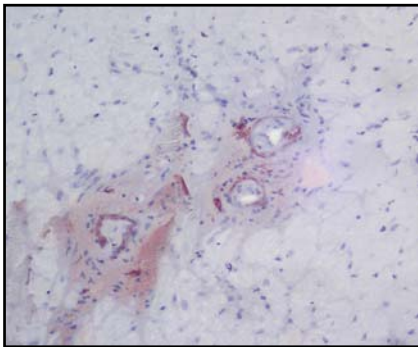


Figura 36. Fragmento de tecido cardíaco. Expressão de NFκB em vasos (400x) - AEC

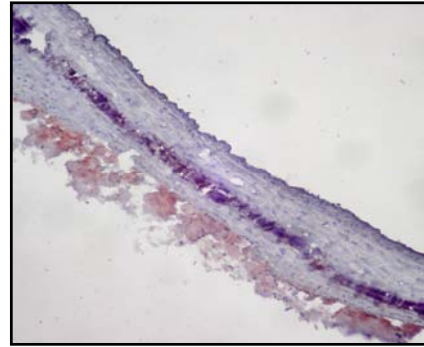
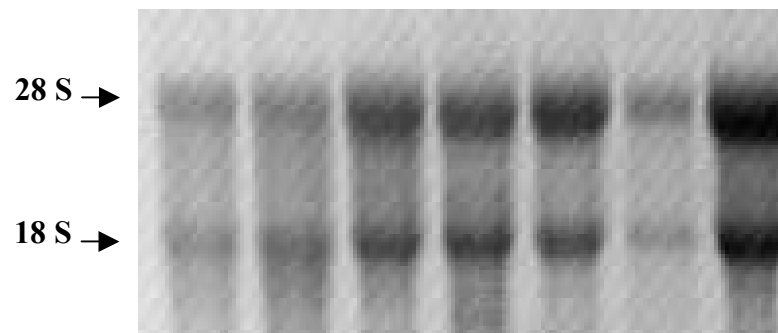


Figura 37. Fragmento de tecido vascular (artéria aorta). Expressão de NFκB na camada adventícia (200x) - AEC

#### 5.4. Avaliação de Expressão Gênica

O RNA total (RNAt) foi obtido de fragmentos de aorta e coração dos animais de todos os grupos.

A figura 38 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose revelando que o RNAt das amostras estava íntegro e pudemos visualizar pelo menos, duas bandas individualizadas de cada amostra, referentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal.



**Figura 38.** Eletroforese em gel de agarose do RNA total extraído das amostras testadas.

Na figura 39 observamos o aumento da expressão de Runx2 e OCN nas aortas de animais que apresentaram calcificação. Os gráficos abaixo representam a semiquantificação de RNAm para cada uma das proteínas estudadas (figura 40 e 41) e a correlação positiva entre elas (figura 42).

	Sham-rP	NxPTHn-rP	NxPThE-rP	Sham-pP	NxPTHn-pP	NxPThE-pP	Sham-c
Runx2							
OCN							
$\beta$ -actina							

Figura 39. Expressão gênica de Runx2 e OCN por RT-PCR

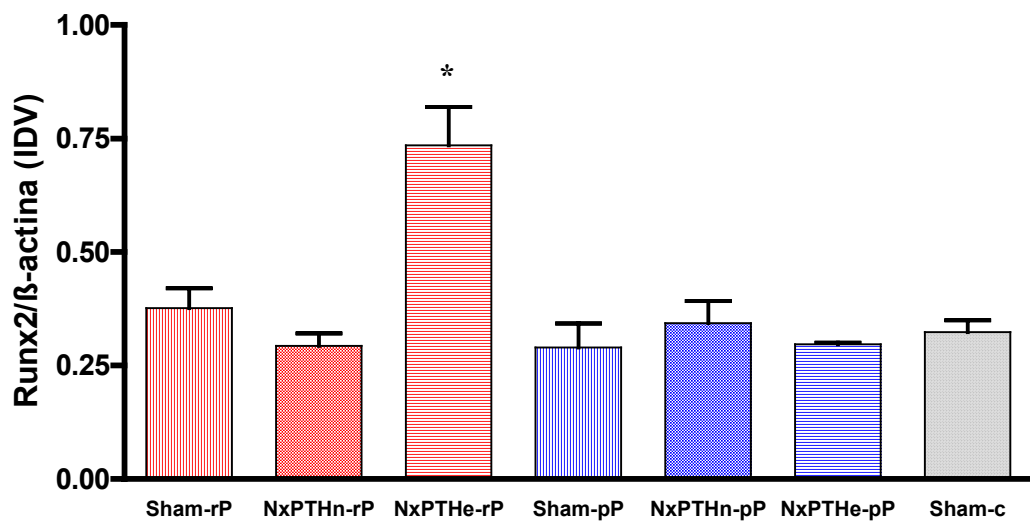


Figura 40. Valor de densidade integrada de Runx2 corrigido pela  $\beta$ -actina  
 \*  $p < 0,05$ : NxPThE-rP vs todos os outros

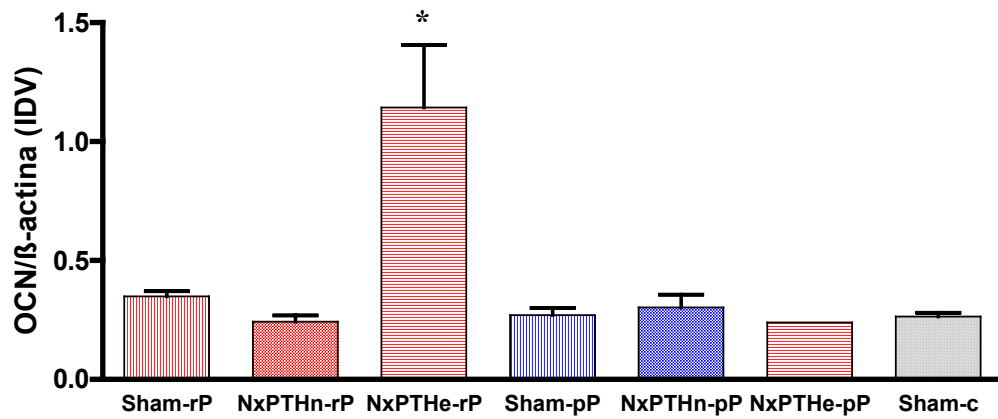


Figura 41. Valor de densidade integrada de OCN corrigido pela β-actina  
 \* p<0,05: NxPThE-rP vs todos os outros

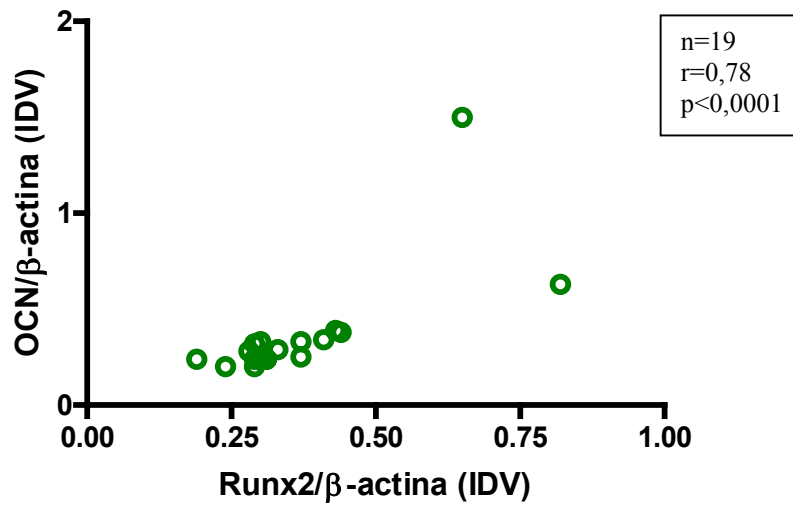


Figura 42. Correlação entre o valor de densidade integrada de Runx2 vs OCN corrigido pela β-actina

## 6. Discussão

O presente estudo analisou a remodelação óssea e o tecido cardiovascular de ratos urêmicos alimentados com diferentes concentrações de fósforo e mantidos com diferentes níveis séricos de PTH.

Os níveis séricos de creatinina dos animais nefrectomizados foram compatíveis com doença renal crônica moderada. Em nosso modelo a PTX foi eficaz, pois os animais desenvolveram hipoparatiroidismo evidenciado pela hipocalcemia, com a vantagem de ter a tireóide preservada evitando a interferência do hormônio tireoideano no modelo proposto. A infusão de diferentes concentrações de PTH foi efetiva e comprovada pela dosagem sérica desse hormônio no final dos experimentos. Embora não significativa, a concentração de PTH no grupo Sham-rP foi maior que nos demais controles e isso se deve provavelmente ao estímulo direto do fósforo na secreção de PTH.

Os animais nefrectomizados que ingeriram dieta rica em fósforo apresentaram elevação do fósforo sérico quando comparados aos seus controles assim como menores níveis de cálcio provavelmente devido a formação de complexos insolúveis de cálcio e fósforo na luz intestinal[44].

Nos animais controles a concentração de fósforo na dieta não interferiu nos seus valores séricos, pois sabe-se que em condições normais, quanto maior a concentração de fósforo da dieta maior a produção de PTH[45] e o excesso desse hormônio promove fosfatúria e normaliza o fósforo sérico, como observado em nosso estudo.

A sobrecarga de fósforo contribuiu para a perda de massa óssea (diminuição do volume trabecular) e alterações na microarquitetura (maior separação e diminuição do número de traves ósseas) independente da insuficiência renal. Estudo de Huttunen *et al* descreveu uma diminuição da densidade mineral óssea em animais normais alimentados com 1,2% de fósforo durante 8 semanas e como no nosso estudo também relatou elevação do PTH sérico. Assim a diminuição do volume trabecular observada nos animais Sham que receberam elevada concentração de fósforo provavelmente se deu pelo aumento do PTH e, portanto, da reabsorção óssea.

A associação sobrecarga de fósforo e reposição fisiológica de PTH foi a que mais prejudicou o volume e a microarquitetura óssea nos animais nefrectomizados. Esses resultados demonstram de maneira contundente que na uremia, para manter uma remodelação óssea mais próxima do normal são necessários valores mais elevados de PTH. Diversos mecanismos têm sido implicados nessa resistência óssea ao PTH, ou seja, a diminuição de receptores de PTH nos osteoblastos, acúmulo de fragmentos de PTH 7-84 e de osteoprotegerina[46]. Neste grupo os níveis de fósforo sérico foram mais elevados que nos demais e a hiperfosfatemia, por si, agrava a resistência óssea ao PTH[47].

Neves *et al*, utilizando modelo experimental de uremia, paratireoidectomia total com infusão de PTH contínua em concentração fisiológica e dieta e pobre em fósforo, demonstraram que a hiperfosfatemia é deletéria para o tecido ósseo promovendo lesões semelhantes à osteoporose[40].

Já nos animais nefrectomizados com reposição elevada de PTH o volume e a microarquitetura óssea foram preservados. Entretanto, neste caso a sobrecarga de fósforo também diminuiu o volume trabecular quando comparados aos animais que

receberam menos fósforo. Vale ressaltar que estes grupos apresentaram defeito na mineralização óssea, revelado pelo acúmulo de matriz osteóide e aumento do MLT mais acentuado nos animais com baixa ingestão de fósforo.

A sobrecarga de fósforo diminuiu a superfície osteóide e o número de osteoblastos dos animais Nx, o que também contribuiu para a diminuição do volume trabecular. Corroborando nossos achados, há estudos *in vitro* que demonstraram que concentrações elevadas de fósforo favorecem apoptose de osteoblastos[48].

Estes dados confirmam a necessidade de um controle adequado do fósforo sérico juntamente com o ajuste do PTH para que se mantenha a integridade óssea.

Outro objetivo desse estudo foi avaliar no modelo proposto a presença de calcificação cardiovascular. Nos pacientes com DRC, quando desenvolvem calcificação, a mesma pode ser encontrada tanto na camada íntima como na média ou em ambas. Normalmente a calcificação da camada íntima representa um estágio avançado do processo de aterosclerose e associa-se com o desenvolvimento de placas e lesões oclusivas. Já a calcificação da camada média afeta principalmente as funções hemodinâmicas dos vasos, aumentando sua rigidez e diminuindo a complacência o que resulta no aumento da pressão de pulso[49, 50].

Os mecanismos fisiopatológicos propostos são: (1) diminuição ou ausência de inibidores da calcificação expressos constitutivamente na parede dos vasos o que contribuiria para deposição de fosfato de cálcio seguido de calcificação, (2) indução de formação óssea a partir da transição fenotípica de CMLV em células *osteoblasts-like* que passam a formar tecido ósseo, (3) presença de complexos nucleados, compostos por cristais de hidroxiapatita, gerados pela atividade reabsortiva no tecido ósseo que ganham a circulação e se depositam em tecidos moles podendo induzir a

mineralização do mesmo e (4) morte celular, onde corpos apoptóticos e/ou necróticos, da parede dos vasos, atuam como locais de nucleação especialmente em tecidos danificados[51]. Nos últimos anos, o fósforo tem sido apontado como um fator estimulador de calcificação vascular seja ele proveniente da maior oferta na dieta ou da reabsorção óssea.

Giachelli *et al* demonstraram *in vitro*, calcificação de células vasculares em meio rico em fosfato inorgânico e a expressão de Runx2 por essas células, ou seja, o fósforo induziu mudanças fenotípicas nas mesmas que adquiriram características de osteoblastos e portanto capacidade de mineralização[24, 52]. O *Runx2* é considerado o marcador mais precoce de diferenciação osteoblástica induzindo a produção de marcadores distintos com o colágeno tipo I, a fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina, conforme seu estágio de maturação[28, 30]. Sendo esse fator transcricional específico, sua presença em outro tecido que não o ósseo sugere que o mesmo promoveu transformação fenotípica das células em questão.

Moe *et al* em 2003 demonstraram em pacientes dialíticos a expressão de *Runx2*, em células musculares lisas vasculares (CMLV) da camada íntima e média de artérias calcificadas além da expressão de proteínas osteogênicas, como colágeno I e osteopontina. Esses mesmos autores demonstraram que CMLV em meio de cultura enriquecido com soro de pacientes com DRC apresentaram marcação positiva para *Runx2*[53].

Nossos resultados confirmam esses achados. Os animais que receberam concentrações fisiológicas de PTH e dieta rica em fósforo, não apresentaram calcificação em aorta e coração, entretanto, detectamos através de imuno-



histoquímica forte expressão do *Runx2* nas CMLV da aorta desses animais. Esse fato também ocorreu nos animais que calcificaram.

Embora haja uma expressão mínima de *Runx2* nos vasos dos animais de todos os grupos, os nefrectomizados, alimentados com dieta rica em fósforo apresentaram expressão de *Runx2* significativamente maior que os demais, demonstrando novamente a participação do fósforo e do PTH na mudança fenotípica de CMLV.

Recentemente, Bronckers *et al* descreveram que no desenvolvimento orofacial normal, as células envolvidas na angiogênese expressavam *Runx2*. Esse achado é muito importante pois até então esse fator associava-se unicamente ao fenótipo osteoblástico. O *Runx2* está presente em células musculares lisas e endoteliais de vasos, durante o desenvolvimento de tecidos no período neonatal e embrionários tanto de humanos como de roedores[54].

Nesse mesmo estudo os autores observaram que artérias de adultos saudáveis apresentavam pequena expressão de *Runx2*. Porém, quando analisaram vasos de indivíduos com aterosclerose o mesmo foi detectado na área de calcificação[54].

Durante angiogênese normal a expressão desse marcador em CMLV é transitória. Após a formação completa dos vasos, a expressão diminui drasticamente e voltaria a aumentar se houver calcificação vascular. Aparentemente, também em outros tecidos, mecanismos celulares específicos da fase embrionária voltam a ser ativados nos indivíduos adultos. Um exemplo é o que ocorre na reparação de fraturas, onde etapas da formação óssea observadas na fase embrionária voltam a ser ativadas[54].

Esse mesmo fenômeno parece ocorrer na calcificação dos vasos, ou seja, na tentativa de reparar lesões de paredes de vaso, CMLV adultas voltam a expressar

Runx2 o que só ocorria na fase embrionária. Dessa forma, as células que contêm o Runx2 tornam-se osteogênicas dependendo da presença de estímulos como produtos inflamatórios, citocinas, fatores de crescimento entre outros[54].

Estes fatores, incluindo o fósforo e o PTH poderiam guiar a reexpressão de Runx2 nas CMLV fazendo com que estas, que já possuem RNAm para codificação dessa proteína, voltem a expressá-la e passem a funcionar como se fossem células ósseas.

Hipoteticamente, o processo de calcificação nas artérias de pacientes com DRC poderia ocorrer da seguinte forma: as células musculares lisas estimuladas por vários fatores, entre eles o fósforo, PTH, citocinas e outros se transformam em *osteoblast-like* e passam a produzir matriz óssea composta de colágeno tipo I e proteínas não colágenas. Essa matriz é mineralizada por processo passivo (físico-químicos) ou ativo regulado pelas células *osteoblast-like*. Essa etapa final poderia ser acelerada pela elevação do produto Ca x P, assim como, pelo excesso de cálcio freqüentemente observado nesses pacientes[53].

No presente estudo, os animais que desenvolveram calcificação receberam elevadas concentrações de PTH e neles além da presença de *Runx2*, encontramos intensa expressão de Col I, OPG e NFκB. Vale ressaltar que a detecção do Col I e OPG se deu exclusivamente na camada média da aorta e parede de vasos do coração. Já nos animais que não calcificaram a marcação dessas proteínas se deu na camada adventícia onde são encontradas em condições fisiológicas.

Inúmeros trabalhos analisam a atuação da OPG na calcificação vascular. Estudo com animais *knockout* para OPG desenvolveram calcificação arterial, sugerindo que essa proteína é um importante inibidor de calcificação vascular. Moe

*et al* demonstraram que níveis séricos elevados de OPG estão associados com calcificação da aorta de pacientes com DRC[23, 55].

No nosso estudo não podemos concluir se a presença de OPG na camada média da aorta de animais calcificados ocorreu devido à super produção por células endoteliais na tentativa de frear a calcificação ou se as células “osteoblastos-like” passaram a produzir essa proteína[56].

A produção de Col I é regulada por diversos fatores de crescimento e citocinas capazes de modular a proliferação de fibroblastos. Na DRC a inflamação é um achado freqüente e está associada a hiperfosfatemia e altos níveis de PTH, fatores que aparentemente favorecem a proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno tipo I, em locais onde esse fato normalmente não ocorre. Corroborando esse achado vale destacar que modelos de aterosclerose apontam o Col I como principal componente extracelular em lesões da camada íntima dos vasos[57].

Nossos achados são interessantes e contrastam com os apresentados por Moe *et al*, quanto ao fato de não detectarmos a osteocalcina e a osteopontina na parede das aortas. Essas proteínas são marcadoras de células osteoblásticas diferenciadas e a ausência dessas marcações no coração e aorta dos nossos animais calcificados sugere que as células musculares lisas vasculares que sofreram transdiferenciação não estavam em fase avançada de diferenciação e portanto não expressaram essas proteínas[27, 58]. No mesmo estudo os resultados obtidos no RT-PCR demonstram que há uma expressão significativamente aumentada de RNAm para osteocalcina, na aorta dos animais que receberam sobrecarga de fósforo e elevadas concentrações de PTH. Pretendemos analisar a expressão de RNAm, por RT-PCR para osteocalcina e *Runx2* nas aortas dos animais de todos os grupos.

---

Raines *et al* demonstraram que o efeito da superexpressão da forma ativa do NFκB, em lesões vasculares, também pode favorecer mudanças fenotípicas de CMLV. No nosso estudo a presença desse fator, no coração e aorta dos animais que calcificaram, pode ser decorrente da sobrecarga de fósforo e PTH, que ativaram o complexo e dessa forma por uma ou outra via influenciaram a mudança fenotípica das CMLV[38].

## 7. Conclusões

Em conclusão, a sobrecarga de fósforo contribuiu para a perda de massa óssea, independente da insuficiência renal. Entretanto nos animais urêmicos que receberam doses elevadas de PTH essa perda foi menos intensa, provavelmente pela ação anabólica do PTH que se contrapôs aos efeitos tóxicos da sobrecarga de fósforo.

A calcificação vascular, propriamente dita, só foi observada em animais nefrectomizados submetidos a altas doses de PTH independente da carga de fósforo que receberam, destacando o papel do PTH na instalação deste evento. Porém, a sobrecarga de fósforo com infusão fisiológica de PTH induziu mudança fenotípica em CMLV comprovada pela superexpressão de *Runx2* na aorta destes animais, o que nos permite inferir que se o tempo estudo fosse maior provavelmente esses animais desenvolveriam calcificação vascular.

O fósforo e o PTH em altas concentrações modificaram a localização histológica da expressão de OPG e Col I nas áreas de calcificação da aorta e do coração.

Não houve expressão das proteínas OPN e OCN em regiões calcificadas da aorta e do coração. A ausência dessas proteínas pode ser explicada pelo estágio de diferenciação das células *osteoblast-like*. Ainda que não tenha ocorrido a expressão dessas proteínas, o aumento do RNAm para OCN na aorta de animais que calcificaram sugerem que se o tempo de estudo fosse maior, possivelmente, essa proteína poderia expressar-se.

A presença de NFκB no coração e aorta de animais que calcificaram, sugere a participação desse fator transcricional na mudança fenotípica detectada nas CMLV.

Nosso estudo não demonstrou um valor ideal de PTH suficiente para manter a integridade óssea e impedir calcificação vascular, quando o animal é exposto a diferentes sobrecargas de fósforo.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Sherrard DJ, Baylink D, Wergedal JE, Maloney NA. *Quantitative histological studies on the pathogenesis of uremic bone disease*. J Clin Endocrinol Metab, 1974. **39**(1): p. 119-35.
2. Araujo SHA, Dos Reis LM, Mota RS, Campos HH, Jorgetti V. *Novo perfil da osteodistrofia renal em amostras de pacientes de diferentes regiões do Brasil*. In: Cruz J, Barros RT, Cruz HMM editores. *Atualidades em Nefrologia 6*. 2000, São Paulo: Sarvier. p.283-295.
3. Araujo SM, A.P., Lobao RR, Caorsi H, Moyses RMA, Barreto FC, Olaizola I, Cruz EA, Petraglia A, Dos Reis LM, Duarte ME, Jorgetti V, Carvalho AB. *The renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: an overview*. Kidney Int Suppl, 2003(85): p. S54-6.
4. Massry SG, Smogorzewski M. *Mechanisms through which parathyroid hormone mediates its deleterious effects on organ function in uremia*. Semin Nephrol, 1994. **14**(3): p. 219-31.
5. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. *Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis*. N Engl J Med, 1974. **290**(13): p. 697-701.
6. Barenbrock M, Hausberg M, Kosch M, Kisters K, Hoeks AP, Rahn KH. *Effect of hyperparathyroidism on arterial distensibility in renal transplant recipients*. Kidney Int, 1998. **54**(1): p. 210-5.
7. Tsuchihashi K, Takysawa H, Torii T, Ikeda R, Nakahara N, Yuda S, Kobayashi N, Nakata T, Ura N, Shimamoto K. *Hypoparathyroidism potentiates cardiovascular complications through disturbed calcium metabolism: possible risk of vitamin D(3) analog administration in dialysis patients with end-stage renal disease*. Nephron, 2000. **84**(1): p. 13-20.
8. Block GA, Hulbert-Shearon T, Levin NW, Port FK. *Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study*. Am J Kidney Dis, 1998. **31**(4): p. 607-17.
9. Levin NW, Hulbrt-Shearon T, Strawderman RL, Port FK. *Which causes of death are related to hyperphosphatemia in haemodialysis (HD) patients? [abstract]*. Am Soc Nephrol, 1998. **9**: p. 603.
10. Bloembergen WE. *Cardiac disease in chronic uremia: epidemiology*. Adv Ren Replace Ther, 1997. **4**(3): p. 185-93.

11. US Renal Data System: Annual Data Report. *National Institute of Health. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*. 1998. Available from <http://www.med.umich.edu/usrds>
12. Kasiske BL. *Hyperlipidemia in patients with chronic renal disease*. Am J Kidney Dis, 1998. **32**(5 Suppl 3): p. S142-56.
13. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T. *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure*. Kidney Int, 1999. **55**(5): p. 1899-911.
14. Parfrey PS. *Cardiac disease in chronic uremia: uremia related risk factors*. Semin Nephrol, 1999. **12**: p. 1-132.
15. Meyer KB, Levey AS. *Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: report from the National Kidney Foundation Task Force on cardiovascular disease*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(12 Suppl): p. S31-42.
16. Seyle J. *The pluricausal cardiopathies*. Springfield, 1961.
17. Lehr D, Krukowski M, Colon R. *Correlation of myocardial and renal necrosis with tissue electrolyte changes*. Jama, 1966. **197**(2): p. 105-12.
18. 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**(6): p. 1226-37.
19. *K/DOQI clinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patients*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(4 Suppl 3): p. S1-153.
20. Block GA, Klassen P, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. *Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 2208-18.
21. Delmez JA, Slatopolsky E. *Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease*. Am J Kidney Dis, 1992. **19**(4): p. 303-17.
22. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A. *Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism*. Kidney Int Suppl, 1999. **73**: p. S14-9.
23. Jono S, Iksri Y, Shioi A, Mori K, Miki T, Hara K, Nishizawa Y. *Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease*. Circulation, 2002. **106**(10): p. 1192-4.
24. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. *Vascular calcification and inorganic phosphate*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(4 Suppl 1): p. S34-7.



25. Amann K, Gross M, Ritz E. *Pathophysiology underlying accelerated atherogenesis in renal disease: closing in on the target*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(6): p. 1664-6.
26. 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): p. 1814-9.
27. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen N, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K., *Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins*. Kidney Int, 2002. **61**(2): p. 638-47.
28. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. *Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1*. Endocr Rev, 2000. **21**(4): p. 393-411.
29. Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, Hiebert SW, Stein JL, Stein GS, Lian JB. *Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex*. J Cell Biochem, 1997. **66**(1): p. 1-8.
30. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell, 1997. **89**(5): p. 747-54.
31. Clyne N, Lins L, Pehrsson SK. *Occurrence and significance of heart disease in uraemia. An autopsy study*. Scand J Urol Nephrol, 1986. **20**(4): p. 307-11.
32. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. *Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification*. Genes Dev, 1998. **12**(9): p. 1260-8.
33. Noda M, Denhardt D. *Osteopontin*. In: Bilezikian L.G, Rodan DA, editores. Principles of Bone Biology, 2º ed., San Diego: Academic Press. 2000; Vol. 1: p.239-50.
34. Robey TD. *Bone matrix proteins and the mineralization process*. In: Favus JM, editor. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 3º ed., New York: Lippincott-Ravin Publishes. 1996; p.24-28.
35. Barsh GS, David K, Byers PH. *Type I osteogenesis imperfecta: a nonfunctional allele for pro alpha 1 (I) chains of type I procollagen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(12): p.3838-42.

36. Lian JB, S.G, Canalis E, Robey PG, Boskey AL. *Bone formation: Osteoblast Lineage Cells, Growth Factors, Matrix Proteins and Mineralization Process*. In: Favus JM, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 4<sup>o</sup> ed., New York: Lippincott-Ravin Publishes.1999; p. 4-29.
37. Manabe I, Shindo T, Nagai R. *Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy*. *Circ Res*, 2002. **91**(12): p. 1103-13.
38. Raines EW, Garton KJ, Ferri N. *Beyond the endothelium: NF-kappaB regulation of smooth muscle function*. *Circ Res*, 2004. **94**(6): p. 706-8.
39. AndressDL. *New therapies raise new issues for lowering parathyroid hormone levels in uremic patients*. *Semin Nephrol*, 1999. **12**: p. 282-284.
40. 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. **66**(6): p. 2237-44.
41. Lacey DL, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy, E., et al. *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 165-76.
42. Parfitt AM, Drezner M, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee*. *J Bone Miner Res*, 1987. **2**(6): p. 595-610.
43. Katwa LC, Tyagi SC, Lee SJ, Cicila GT, Weber KT. *Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo*. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. **29**(5): p. 1375-86.
44. Brautbar N, Levine BS, Walling MW, Coburn JW. *Intestinal absorption of calcium: role of dietary phosphate and vitamin D*. *Am J Physiol*, 1981. **241**(1): p. G49-53.
45. Berndt T. *Renal regulation of phosphate excretion*. In: Seldin DW, Giebisch G. editors. *The Kidney: physiology and pathophysiology*. New York: Raven Press. 1992; p.2511-2532.
46. Iwasaki Y, Yamato H, Nii-Kono T, Fujieda A, Uchida M, Hosokawa A, Motojima, M, Fukagawa M. *Insufficiency of PTH action on bone in uremia*. *Kidney Int Suppl*, 2006(102): p. S34-6.
47. Bover J, Jara A, Trinidad P, Rodriguez M, Felsenfeld AJ. *Dynamics of skeletal resistance to parathyroid hormone in the rat: effect of renal failure and dietary phosphorus*. *Bone*, 1999. **25**(3): p. 279-85.

48. Meleti Z, Shapiro I, Adams CS. *Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture*. Bone, 2000. **27**(3): p. 359-66.
49. Collin-Osdoby P. *Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin*. Circ Res, 2004. **95**(11): p. 1046-57.
50. Narang R, Ridout D, Nonis C, Kooner JS. *Serum calcium, phosphorus and albumin levels in relation to the angiographic severity of coronary artery disease*. Int J Cardiol, 1997. **60**(1): p. 73-9.
51. Speer MY, Giachelli C. *Regulation of cardiovascular calcification*. Cardiovasc Pathol, 2004. **13**(2): p. 63-70.
52. Giachelli CM. *Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(9 Suppl 4): p. S300-4.
53. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. *Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels*. Kidney Int, 2003. **63**(3): p. 1003-11.
54. Bronckers AL, Sasaguri K, Cavender AC, D'Souza RN, Engelse MA. *Expression of Runx2/Cbfa1/Pebp2alphaA during angiogenesis in postnatal rodent and fetal human orofacial tissues*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(3): p. 428-37.
55. Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, O'Neill KD, Duan D, Koczman J, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Chen NX. *Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD)*. Kidney Int, 2005. **67**(6): p. 2295-304.
56. Hofbauer LC, Schoppet M. *Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases*. Jama, 2004. **292**(4): p. 490-5.
57. Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. *Extra-cellular matrix in vascular networks*. Cell Prolif, 2004. **37**(3): p. 207-20.
58. Aubin JE, Liu F. *The osteoblast lineage*. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press. 1996; p. 51-67.





HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CAIXA POSTAL, 8091 - SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

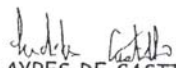
## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/02/03, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 931/02, intitulado: "Estudo de proteínas envolvidas no processo de calcificação extra-óssea em ratos urêmicos paratireoidectomizados, submetidos a dieta rica e pobre em fósforo, associado à infusão de paratormônio" apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Pesquisador(a) Responsável: PROFA. DRA. IRENE DE LOURDES NORONHA

Pesquisador(a) Executante: SRA. FABIANA GIORGETI GRACIOLLI

CAPPesq, 19 de Fevereiro de 2003.

  
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)