

Daniella Guimarães Batista

REPOSIÇÃO ELEVADA DE PARATORMÔNIO
AMENIZA O EFEITO OSTEOPÊNICO DO FÓSFORO
NO TECIDO ÓSSEO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Dr^a. Vanda Jorgetti

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

Batista, Daniella Guimarães

Reposição elevada de paratormônio ameniza o efeito osteopênico do fósforo no tecido ósseo / Daniella Guimarães Batista. -- São Paulo, 2006.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Nefrologia.

Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.Remodelação óssea 2.Hormônio paratireóideo 3.Fósforo 4.Uremia
5.Osteopatias metabólicas 6.Paratireoidectomia 7.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-372/06

DEDICATÓRIA

Para meus queridos pais (Netinha e Antônio Carlos), sempre me apoiando
em tudo na minha vida.

Aos meus grandes amigos: minha orientadora Dr. Vanda Jorgetti e ao
Dr. André Falcão.

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais. Admiro a união de vocês. Estarei sempre ao lado de vocês.

A Dr. Vanda pela paciência, compreensão e amizade dedicada. É admirável sua disponibilidade constante dispensada para nós seus alunos. Obrigada por tudo.

Ao Dr. André Falcão Pedrosa da Costa, meu grande incentivador desde a época da faculdade. Você tem uma grande contribuição por tudo isto.

À Kátia e a Rosa sempre dispostas a ajudar. Vocês foram indispensáveis para realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo.

Aos meus irmãos Cristiano e Alexandra, obrigado pela admiração.

À toda minha família: vó, tios, tias e primos.

Ao André Morrone, que entrou na minha vida em uma época difícil, e soube entender o momento. Você é admirável. Obrigado por fazer parte da minha vida.

A Fabiana e a Luciene, obrigada pela grande ajuda e por toda paciência.

As grandes amigas que conquistei neste laboratório e em seus arredores: Carol, Andréa, Melani, Cris, Cilene e Flávia Kfourri. Vocês foram importantes em todos os momentos deste trabalho. Amigas de todas as horas. Adoro todas vocês.

À Faculdade de Medicina, em especial ao Dr. Roberto Zatz e Dr. Rui Toledo Barros.

Ao Wagner V. Dominguez, pela contribuição com a estatística sempre disponível e disposto a ensinar. Obrigado pela paciência.

À todos do Laboratório Lim 16, e em especial ao Valter Campestre e a Rosimeire A. Bizerra.

Aos ratos utilizados neste estudo, sem eles nada teria sido possível.

Normalização Adotada

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

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Histomorfometria óssea dos animais: Volume trabecular para os diferentes grupos.....	27
Figura 2 - Histomorfometria óssea dos animais: Separação das Traves para os diferentes grupos.....	27
Figura 3 - Histomorfometria óssea dos animais: Número de traves para os diferentes grupos.....	28
Figura 4 - Histomorfometria óssea dos animais: Superfície osteóide para os diferentes grupos.....	28
Figura 5 - Histomorfometria óssea dos animais. Superfície de Reabsorção para os diferentes grupos.....	29
Figura 6 - Histomorfometria óssea dos animais. Taxa de Formação óssea para os diferentes grupos.....	29
Figura 7 - Representação Histológica do tecido ósseo dos animais do Grupo Sham rP.....	30
Figura 8 - Representação Histológica do tecido ósseo dos animais do Grupo Sham pP.....	30
Figura 9 - Representação Histológica do tecido ósseo dos animais do Grupo NxPTHn-rP.....	30
Figura 10 - Representação Histológica do tecido ósseo dos animais do Grupo NxPTHn-pP.....	30
Figura 11 - Representação Histológica do tecido ósseo dos animais do Grupo NxPTHe-rP.....	31
Figura 12 - Representação Histológica do tecido ósseo dos animais do Grupo NxPTHe-pP.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros bioquímicos dos diferentes grupos	20
Tabela 2- Parâmetros estruturais do fêmur distal para os diferentes grupos.....	23
Tabela 3- Parâmetros estáticos de formação óssea do fêmur distal para os diferentes grupos.....	24
Tabela 4- Parâmetros estáticos de reabsorção óssea do fêmur distal para os diferentes grupos.....	25
Tabela 5- Parâmetros dinâmicos do fêmur distal para os diferentes grupos.....	26

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Metabolismo do Cálcio, Fósforo, Paratormônio e Calcitriol	3
a) Cálcio	3
b) Fósforo	5
c) Paratormônio.....	7
d) Calcitriol	8
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL e MÉTODOS	12
3.1. Modelo Experimental	12
3.2. Avaliação Bioquímica	15
3.3. Avaliação Histológica do Tecido ósseo	15
3.4. Comissão de Ética	17
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Avaliação Bioquímica	19
5.2. Avaliação Histológica do tecido ósseo	21
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÕES	38
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

As doenças renais crônicas (DRC) evoluem com distúrbios na homeostase do cálcio e do fósforo, diminuição na produção de vitamina D e aumento na secreção de PTH. Osteodistrofia renal (OR) é o termo usado para definir as alterações ósseas dos pacientes com DRC e classifica-se em doença de alta remodelação representada pela osteíte fibrosa (OF) e doença mista (DM); e de baixa remodelação representada pela osteomalácia (OM) e pela doença adinâmica (DOA). Pacientes com DRC apresentam elevada incidência de fraturas e recentemente demonstrou-se que a hiperfosfatemia leva a diminuição do volume ósseo. Estudamos o efeito isolado do fósforo no tecido ósseo de animais com insuficiência renal mantidos com infusão fixa de PTH variando o conteúdo de fósforo na dieta. Cinquenta e cinco ratos Wistar foram submetidos à paratireoidectomia (PTX) e nefrectomia (Nx) com reposição de PTH em diferentes concentrações ou foram sham operados e recebiam infusão de veículo. Todos os animais receberam a mesma dieta variando apenas a concentração de P (pobre em P (pP): 0,2% e rico em P (rP):1,2%). Dividimos os grupos em: Sham (N=8); Sham-pP (N=8); Sham-rP (N=7); NxPTHn-pP (N=8); NxPTHn-rP (N=8); NxPTHe-pP (N=9); NxPTHe-rP (N=7). Após 2 meses, realizamos análises bioquímicas e histomorfometria do fêmur proximal. Os animais que ingeriram dieta rica em fósforo apresentaram hiperfosfatemia assim como menor valor de cálcio sérico. A reposição de PTH foi efetiva e proporcional às concentrações infundidas. A histomorfometria óssea mostrou que os ratos que ingeriram dieta rica em fósforo independente da uremia tinham diminuição do volume ósseo (BV/TV), e que este efeito foi amenizado pela reposição do PTH em concentrações elevadas. Nossos resultados demonstram que o fósforo é deletério para o tecido ósseo e que na uremia são necessários níveis mais elevados de PTH para manter a integridade óssea.

SUMMARY

Chronic kidney disease (CKD) involves disturbances in calcium and phosphorus metabolism, reduced vitamin D production and increased parathormone (PTH) secretion. Renal osteodystrophy (RO) is a term used to define bone disease complications of patients with CKD, and is classified in high turnover disease represented by osteitis fibrosa (OF) and mixed bone disease; and low turnover disease represented by osteomalacia (OM) and adynamic bone disease (ABD).

It is already known that patients with CKD have high incidence of bone fractures, and it has been demonstrated that hyperphosphatemia results in to decreased trabecular bone volume (BV/TV). We evaluated the effect of phosphorus (P) in rats' bone tissue submitted to experimental uremia that received continuous infusion of 1-34 rat PTH in physiologic or five times the normal values. Fifty five Wistar rats were submitted to parathyroidectomy (PTX), nephrectomy (Nx) and received PTH in different concentrations or some were PTX and NX controls (Sham) that received only vehicle. Rats received identical diets, excepted for the P content which was different according to the group [Low P (LP): 0,2% and high P (HP): 1,2%]. Groups were divided as follow: Sham (N=8), Sham LP (N=8), Sham-HP (N=7), NxPTHn-LP (N=8), NxPTHn-HP (N=8), NxPTHh-LP (N=9), NxPTHh-HP (N=7). After two months, animals were sacrificed and biochemical and bone histomorphometry were performed. Rats who received high P diet developed hyperphosphatemia and hypocalcemia. PTH replacement was effective and in accordance with infusion concentration. Bone histomorphometric analysis showed that HP rats presented low trabecular bone volume (BV/TV) independently of the uremia. BV/TV decreased slightly in the group where PTH continuous infusion was five times the physiologic values. Our results demonstrated that P has a deleterious action on bone tissue and in uremia it is necessary high levels of PTH to maintain bone integrity.

1. INTRODUÇÃO

A prevalência da doença renal crônica (DRC) vem aumentando nos últimos anos. Distúrbios do metabolismo mineral e doenças ósseas são complicações freqüentes aumentando a morbidade e diminuindo a qualidade de vida destes pacientes. Recentemente, demonstrou-se que estes distúrbios, especialmente a hiperfosfatemia aumentam a mortalidade ao favorecer o desenvolvimento de calcificações vasculares ¹. Cerca de 70% dos indivíduos em diálise permanecem com elevação do fósforo (P) sérico a despeito do uso de quelantes de fósforo ².

Osteodistrofia renal (OR) era o termo empregado para descrever as manifestações clínicas, as alterações laboratoriais e as doenças ósseas decorrentes desses distúrbios. Atualmente, é usado somente para definir as doenças ósseas ³. Nos últimos anos, sua prevalência vem crescendo devido ao aumento da sobrevida dos pacientes com DRC devido a melhoria das técnicas de diálise ⁴.

As manifestações clínicas da OR variam desde quadros assintomáticos até lesões graves e incapacitantes, tais como deformidades ósseas e fraturas.

O diagnóstico da OR obriga a realização da biópsia óssea, e sua interpretação deve conter informações referentes a remodelação, mineralização e volume ósseo. A taxa de formação óssea, parâmetro obtido

da análise histomorfométrica, permite classificar a OR em doença de alta e baixa remodelação^{5,6}.

A doença de alta remodelação é representada pelo hiperparatireoidismo secundário (HPTH) cuja manifestação óssea é conhecida como osteíte fibrosa (OF); e a de baixa remodelação pela osteomalácia (OM) e a doença adinâmica (DOA). Um terceiro tipo, a doença mista, apresenta características de OF e OM. Atualmente, é classificada como doença de alta remodelação³.

No HPTH o tecido ósseo apresenta um aumento do número de osteoblastos e osteoclastos, fibrose na medula e taxas elevadas de formação e reabsorção óssea. Este quadro histológico é conhecido com osteíte fibrosa (OF). Estima-se que 50% dos pacientes com DRC em diálise desenvolvem HPTH⁷. Sua etiopatogenia é multifatorial, valendo destacar a retenção de fósforo conseqüente à queda da 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 paratormônio (PTH) o que implica em um menor incremento do cálcio sérico frente a elevações do PTH, resultando também em hipocalcemia. Esses fatores se correlacionam profundamente, proporcionando elevação da secreção de PTH⁸.

A doença de baixa remodelação, defini-se histologicamente por taxas de formação óssea reduzidas, associada à diminuição dos números de osteoblastos e osteoclastos e ausência de fibrose na medula óssea.

A prevalência de OM é variável, ficando abaixo de 10% nos países desenvolvidos ⁹. No nosso meio representa cerca de 12% dos casos de OR ¹⁰. A patogênese da OM não está totalmente esclarecida. Vários fatores, como o déficit de calcitriol, a hipofosfatemia, a acidose metabólica, a retenção de fatores inibitórios da mineralização e a intoxicação pelo alumínio e estrôncio, podem estar implicados no desenvolvimento dessa doença ^{11,12}.

Já a prevalência da DOA, varia na literatura de 15% a 60% ¹². Em nosso meio representa cerca de 20% ¹⁰. Alguns fatores contribuem para seu desenvolvimento, como a idade avançada, a presença de *diabetes melito*, a terapia dialítica com diálise peritoneal contínua (CAPD), a sobrecarga de cálcio e de vitamina D, a desnutrição e a intoxicação alumínica ¹¹.

1.1. Metabolismo do Cálcio, Fósforo, Paratormônio e Calcitriol

a) Cálcio

Um adulto contem cerca de 1 kg de cálcio no seu organismo, dos quais 99% se localizam no tecido ósseo e 1% no meio extracelular. Em condições normais, a concentração de cálcio no meio extracelular e o conteúdo de cálcio corporal se mantêm constantes ¹³.

A absorção de cálcio na dieta se dá por dois mecanismos: passivo e ativo. A absorção passiva, depende do gradiente de concentração entre lúmen intestinal e sangue e ocorre principalmente quando a concentração luminal excede 600 a 800mg. Já a absorção ativa é influenciada pela 1,25(OH)₂D (calcitriol), que atua principalmente no duodeno e jejuno ^{14,15}.

A concentração deste íon no fluido extracelular é regulada pelo PTH através do receptor de cálcio (CaR). Este receptor presente principalmente nas células paratireoidianas, é composto por 135 aminoácidos e faz parte da superfamília das proteínas G. Essa molécula possui três regiões distintas: extracelular, membranosa e intracitoplasmática. O cálcio, ao se ligar a este receptor, induz alterações citoplasmáticas, que ocasionam aumento dos níveis deste íon, sendo este efeito mediado pela via da proteína-kinase C. Este receptor é capaz de detectar pequenas alterações na concentração de cálcio iônico, modificar a secreção de PTH e restaurar a calcemia ¹⁶. Druke e cols, estudando a expressão do RNAm do CaR em tecido paratireoideano de indivíduos normais e com hiperparatireoidismo primário e secundário, demonstraram diminuição do número de receptores nas duas formas de hiperparatireoidismo. Este fato está envolvido na secreção anormal de PTH. A diminuição destes receptores poderia explicar a relação alterada entre o cálcio e o PTH na uremia ¹⁷.

Na DRC, a hipocalcemia é decorrente da menor absorção do cálcio que por sua vez é secundária a menor ingestão e a diminuição da síntese do calcitriol. A elevada ingestão de fósforo diminui a absorção intestinal de cálcio, provavelmente pela formação de complexos insolúveis de cálcio e fósforo na luz intestinal ¹⁸. Um outro fator envolvido é a resistência óssea ao PTH. Tal resistência é decorrente de vários fatores entre eles a deficiência de calcitriol, a hiperfosfatemia, a acidose metabólica, as toxinas urêmicas, a alcalose respiratória, a diminuição de receptores de PTH nos osteoblastos, o acúmulo de fragmentos de PTH 7-84 e de osteoprotegerina ¹⁹.

b) Fósforo

A maior parte do fósforo corporal (85%) faz parte da matriz extracelular mineralizada. O fósforo é predominantemente um ânion intracelular com uma concentração aproximadamente 100 mM, a grande maioria ligada a proteínas ou lipídios. A concentração de fósforo sérico varia com a idade, hora do dia, jejum e estações do ano, e é maior em crianças do que em adultos. Os níveis de fósforo sofrem variação diurna com maior nível ao redor do meio dia. A concentração de fósforo sérica é regulada pela dieta, por hormônios sistêmicos e fatores físico-químicos como o pH ²⁰.

A absorção intestinal de fósforo assim como a de cálcio é dependente de um processo passivo, diretamente relacionado com a ingestão de fósforo, e de um processo ativo que é estimulada pelo calcitriol principalmente no jejuno ¹⁵.

Na DRC, a perda progressiva da massa renal levaria a uma hiperfosforemia transitória principalmente no período pós-prandial, o que acarretaria queda dos níveis de cálcio, estimulando a secreção de PTH. Este por sua vez, inibiria a reabsorção de fósforo, aumentando a fosfatúria, normalizando as concentrações plasmáticas de Ca e P, porém às custas de níveis mais elevados de PTH ²¹.

Na DRC fase 2 e 3, sabemos que o fósforo sérico geralmente está normal ou até mesmo diminuído. Isto se deve ao fato que nestas fases ocorre hiperfiltração nos néfrons residuais e aumento da atividade do PTH, diminuindo a reabsorção de fósforo. Entretanto, apesar da concentração

normal de fósforo sérico a sua restrição dietética reduz de modo significativo os níveis de PTH. Isto sugere que o fósforo por si estimula a secreção de PTH^{22,23}.

Com a evolução da DRC, a taxa de excreção de fósforo diminui progressivamente, ocasionando hiperfosforemia, observada principalmente quando o clearance de creatinina está abaixo de 20ml/min. A hiperfosforemia favorece a precipitação físico-química de sais de fosfato de cálcio (CaHPO_4), acarretando hipocalcemia e conseqüente estímulo à secreção de PTH. Além disso, a hiperfosforemia inibe a atividade da 1- α -hidroxilase, enzima responsável pela conversão da 25-OH-D₃ (calcifediol) em calcitriol diminuindo suas concentrações e conseqüentemente a absorção intestinal de cálcio²⁴.

A hiperfosforemia também interfere na relação dinâmica entre o cálcio e o PTH. Estudos de Francisco e cols. mostraram que o grau de supressão do PTH pelo cálcio era menor, na presença de níveis mais elevados de fósforo²⁵.

Estudos experimentais em ratos, submetidos à dieta rica em fósforo, mostraram uma ação direta do fósforo na secreção do PTH, independente do cálcio e do calcitriol. Os animais tratados com dieta rica em fósforo, apresentavam aumento das paratireóides e dos níveis do paratormônio, não sendo observadas estas alterações nos animais que receberam dieta pobre em fósforo²¹.

Hernandez e cols., em 1996, demonstraram que ratos com função renal normal submetidos a dieta rica em fósforo, apresentavam aumento da expressão gênica do PTH, hiperplasia da glândula paratireóide e elevação do PTH independente dos níveis de cálcio sérico ou calcitriol ²⁶. Resultados semelhantes foram observados por Canalejo e col ²⁷.

O mecanismo através do qual o fósforo altera a síntese do paratormônio parece ser pós transcricional ²², porém seu mecanismo molecular ainda não está bem esclarecido. O co-transportador Na-P parece desempenhar um papel nessa fisiopatologia, mas a real inter-relação necessita ser melhor compreendida. Recentemente outra substância chamada fosfatonina foi postulada com reguladora do fósforo por mecanismos distintos do PTH. A fosfatonina aumenta a perda renal de fósforo e inibe a síntese da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, e em excesso resulta em hipofosfatemia e osteomalácia ⁸.

c) PTH

O paratormônio (PTH) é sintetizado a partir de uma grande molécula precursora, o pré-pró-PTH. A porção sinalizadora "pré" é clivada no retículo endoplasmático rugoso. O pró-PTH é transportado para o aparelho de Golgi, onde a sequência "pró" ou aminoterminal é removida, gerando a molécula final ou intacta. Esta molécula, composta por 84 aminoácidos, é a fração com maior atividade biológica permanecendo armazenada em vesículas secretórias, que diante da queda do cálcio iônico, se fundem com a membrana plasmática e liberam o hormônio para o compartimento

extracelular. O cálcio sérico e os metabólitos da vitamina D, especificamente a 1,25 (OH)₂ D, são reconhecidos como fatores determinantes na regulação do PTH. Cada um destes fatores pode modificar a transcrição gênica e a síntese do PTH, num período que varia de minutos a horas ²⁹.

O cálcio sérico é o principal fator regulador da secreção de PTH. Baixos níveis de Ca sérico diminuem a ativação do CaR na superfície das células da paratireóide e rapidamente promovem secreção e síntese do PTH. Já a hipercalcemia, ao contrário, ativa os receptores de Ca, e rapidamente suprime a secreção de PTH ³⁰.

Diante de hipocalcemia, o aumento do PTH mobiliza Ca do osso promovendo reabsorção óssea. Inicialmente este hormônio ativa os osteoblastos que liberam mediadores locais responsáveis pela ativação dos osteoclastos. Essas células promoverão reabsorção óssea, com liberação de cálcio e restabelecimento da calcemia e bloqueio da secreção de PTH. Nos rins, o PTH ocasiona aumento da reabsorção tubular de cálcio e aumento da excreção de P ³¹.

d) Calcitriol

A vitamina D pode ser obtida da dieta ou através da ativação de seus precursores pelos raios ultravioletas na pele. A vitamina D3 (colecalfiferol) é produzida na pele através da exposição aos raios ultravioletas e a vitamina D2 (ergocalciferol) pode ser ingerida da dieta ou através de suplementos de reposição ³².

Uma vez a vitamina D feita na pele ou ingerida pela dieta se liga à proteína ligante da vitamina D (DBP) e é transportada ao fígado onde é metabolizada a 25(OH)D. A 25(OH)D é liberada do fígado e se liga mais uma vez a DBP. O complexo DBP/ 25(OH)D é reconhecido pela megalina na membrana tubular renal onde ocorre a 2^o ativação, formando a 1,25 dihydroxivitamina D (1,25(OH)₂ D). Esta ativação ocorre nos rins na presença da enzima 1- α -hidroxilase. Uma vez formada, a 1,25(OH)₂ D entra na circulação ligada a DBP para exercer suas funções endócrinas necessárias para a manutenção da homeostase do Ca. A atividade desta enzima é regulada pelo cálcio, fósforo e PTH ³³.

La Clair e cols. mostraram que com o declínio da função renal diminuí os níveis da 25(OH)D (calcifediol). Em torno de 20 à 30% dos pacientes com DRC estágio 3 e 4 apresentam diminuição da 25(OH)D a níveis menor que 30ng/mL³⁴.

O calcitriol participa diretamente da homeostase do cálcio, promovendo sua absorção intestinal. Assim, a hipocalcemia por déficit absorptivo é um dos principais fatores que aumentam secreção de PTH diante da deficiência de calcitriol ³⁵.

A concentração sérica do fósforo parece atuar na síntese do calcitriol, inibindo a hidroxilação renal ³³. Outros fatores estão envolvidos na produção de calcitriol, como hormônio de crescimento e estrógeno³⁶. Porém a importância destes fatores isoladamente ou em conjunto necessita ser mais bem compreendida.

As alterações no metabolismo do cálcio, fósforo, PTH e calcitriol ocorrem já nas primeiras fases da doença renal crônica, independente da etiologia da doença e levam alterações na função da glândula paratireóide. Essas alterações podem afetar o tecido ósseo, interferindo tanto na formação quanto na reabsorção óssea, comprometendo desta maneira a integridade óssea.

Mesmo em indivíduos normais ingestões inadequadas desses elementos podem comprometer o pico de massa óssea, com conseqüências para o esqueleto.

Nos últimos 10 anos, a compreensão dos mecanismos envolvidos nos distúrbios minerais e na doença óssea dos pacientes com DRC evoluiu significativamente. Entretanto, avaliar isoladamente os efeitos sistêmicos de um determinado distúrbio mineral decorrente da perda de função renal é difícil, uma vez que mudanças mínimas nas concentrações séricas de determinados fatores como o Ca e/ou o P desencadeiam rapidamente mecanismos compensatórios que restabelecem suas concentrações normais às custas, por exemplo da elevação de PTH.

2. OBJETIVO

Avaliar o papel isolado do fósforo no tecido ósseo de animais com insuficiência renal moderada, mantidos com infusão fixa de PTH, variando o conteúdo de fósforo na dieta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo Experimental

Foram utilizados 55 ratos machos da raça Wistar, obtidos do Biotério da FMUSP com peso inicial entre 280 a 330g. Esses animais foram colocados em gaiolas individuais no biotério do LIM-16, com controle de iluminação (12 horas de luz e 12 horas de escuro), temperatura (25°C) e umidade (25%). Foi oferecida dieta controle (Harlan-Teklad, Madison-WI/EUA), que continha 0,7% de fósforo, 0,7% de cálcio e 24% de proteína na quantidade de 15 a 20 g/dia. O acesso à água foi *ad libitum*.

Os animais foram divididos em **sete** grupos, descritos a seguir:

- **G1:** SHAM - Dieta Controle (**N=8**)
- **G2:** SHAM-pP - Dieta pobre em fósforo (**N=8**)
- **G3:** SHAM-rP - Dieta rica em fósforo (**N=7**)
- **G4:** NxPTHn-pP - Ratos nefrectomizados (Nx) e paratireoidectomizados (PTX) com dieta pobre em fósforo; recebendo infusão de PTH em concentração fisiológica (0,022/100g/h) (PTHn) (**N=8**)
- **G5:** NxPTHn-rP - Ratos nefrectomizados (Nx) e paratireoidectomizados (PTX) com dieta rica em fósforo; recebendo infusão de PTH em concentração fisiológica (0,022/100g/h) (PTHn) (**N=8**)

- **G6:** NxPThe-pP - Ratos nefrectomizados (Nx) e paratireoidectomizados (PTX) com dieta pobre em fósforo; recebendo infusão de PTH em concentração 5 vezes maior que a fisiológica (0,11/100g/h) (PThe) (**N=9**)
- **G7:** NxPThe-rP - Ratos nefrectomizados (Nx) e paratireoidectomizados (PTX) com dieta rica em fósforo; recebendo infusão de PTH em concentração 5 vezes maior que a fisiológica (0,11/100g/h) (PThe) (**N=7**)

Os animais dos grupos 4 a 7 foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg) por via intraperitoneal (ip) e submetidos à PTX utilizando-se técnica de micro cirurgia (lupa cirúrgica para eletro cauterização). Após a PTX, os animais foram deixados em recuperação por uma semana e receberam dieta controle adotando-se o protocolo de *pair-feeding* (15 a 20 g/dia), onde a quantidade de ração oferecida a cada par de animais era determinada pelo animal do par que ingeriu menos ração.

Após esse período, os animais foram novamente anestesiados, e imediatamente antes da realização da nefrectomia 5/6 (Nx), colhemos amostra de sangue total através de punção retro-orbital, para a determinação imediata do cálcio iônico (Analisador de eletrólitos AVL-9140). Quando o cálcio sérico estava abaixo de 7,2 mg/dL, os animais eram considerados adequadamente paratireoidectomizados, sendo então submetidos à nefrectomia 5/6 (Nx). Essa etapa consistia na nefrectomia do rim direito seguida da ligadura de 2 a 3 ramos da artéria renal esquerda.

Simultaneamente à Nx, a atividade do PTH era restaurada através do implante de uma minibomba osmótica (Alzet modelo: 2mL₄, Alza Corp. Palo Alto, CA, EUA) colocada na região subcutânea inter-escapular, que liberava PTH sintético de rato, fragmento 1-34, na dose de 0,022/100g/h para grupos com PTH fisiológico (Grupo:4 e 5) e 0,11/100g/h para grupos com PTH 5 vezes a dose fisiológica (Grupo 6 e 7).

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

Os animais dos Grupos 1 a 3 foram submetidos à SHAM PTX e à SHAM Nx (controles sham) incluindo o implante de mini bomba osmótica contendo veículo (cisteína à 2% em solução salina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Imediatamente após a Nx os animais foram alimentados com dietas (Harlan-Teklad, Madison - WI/ EUA) idênticas em composição, com exceção do conteúdo de fósforo. Dieta com reduzido teor de fósforo (pP), ou seja, 0,2% e dieta com elevado teor de fósforo (rP), ou seja, 1,2%. O conteúdo calórico, assim como de vitamina D, Cálcio (Ca=0,7%) e proteína (24%) foram semelhantes. Foi adotado o protocolo de *pair-feeding* (15 a 20g/dia), com a monitorização da ingestão da ração três vezes por semana, procurando-se manter a oferta de dieta entre 15 e 20 g/dia/rato para todos os grupos. Foi também determinado semanalmente o peso dos animais. Findo o período do experimento (8 semanas), os animais foram

anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg intraperitoneal) e sacrificados por punção aórtica. O sangue foi utilizado para dosagens bioquímicas.

3.2. Avaliação Bioquímica

Foi colhido sangue para determinação Ca iônico (Auto Analyzer AVL), fósforo (método colorimétrico Labtest-Lagoa Santa, MG/BR), Creatinina (Cr, método colorimétrico Heinegard-Tiderstrom modificado) e PTH (*rat* PTH IRMA *kit* –Immutopics San Clemente, CA/EUA).

Os níveis séricos de T₄ (tiroxina) foram avaliados em um grupo piloto através de um kit de imunoradiométrico – DPC (Los Angeles, Califórnia). Os resultados revelaram que esse hormônio encontrava-se dentro de concentrações normais. Os resultados não são apresentados neste estudo.

3.3. Avaliação Histológica do Tecido Ósseo

Retiramos os fêmures esquerdos e direitos, que foram fixados em álcool a 70% e processados conforme protocolo descrito³⁷. Utilizando-se um micrótomo Polycut S (Leika, Alemanha), obtivemos cortes de 5 µm e 10 µm de espessura da porção distal dos fêmures. As secções de 5 µm foram coradas com azul de toluidina a 0,1% (pH=6,4), sendo que no mínimo 2 cortes não consecutivos foram examinados para cada amostra.

Os parâmetros estáticos, estruturais e dinâmicos de formação e reabsorção óssea foram analisados na metáfise distal (aumento 250x), a 195 µm da cartilagem de crescimento. Um total de 30 campos foi quantificado,

utilizando-se um software semi-automático de análise de imagens (Osteomeasure, Osteometrics, Inc., Atlanta, GA, EUA).

Os índices histomorfométricos estáticos incluíram o volume ósseo trabecular (BV/TV) expressos em percentagem, assim como a espessura osteóide (O.Th), em μm . A percentagem de superfície trabecular total foi usada para expressar as áreas de superfície de reabsorção (ES/BS) e da superfície osteóide (OS/BS). O número de osteoblastos e osteoclastos por perímetro (N.Ob/B.Pm; N.Oc/B.Pm) foram expressos em /mm. A espessura trabecular (Tb.Th) e a separação trabecular (Tb.Sp) foram expressos em μm . O número de trabéculas (Tb.N) foi expresso em número por milímetros.

A taxa de aposição mineral (MAR) foi determinada a partir da distância entre duas marcações de tetraciclina, dividida pelo intervalo de tempo entre as duas administrações expresso em $\mu\text{m}/\text{d}$. O intervalo de mineralização (Mlt) foi expresso em dias. A percentagem de superfície com duplas marcações de tetraciclina do total da superfície trabecular (MS/BS) e a taxa de formação óssea (BFR/BS) completaram a análise dinâmica. Os índices histomorfométricos foram apresentados segundo a nomenclatura recomendada pela *American Society of Bone and Mineral Research* - ASBMR³⁸.

3.4. Comissão de Ética

O projeto foi desenvolvido em acordo com as normas éticas da FMUSP e previamente autorizado pela comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPESQ) sob N° de protocolo: 1136/05.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (Média \pm EP). A comparação entre os grupos foi feita usando teste-t de Student com correção de Welch's quando necessário. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Utilizamos o software Prism versão 4 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Análise Bioquímica

A tabela 1 descreve os resultados da análise bioquímica. Como esperado, todos os animais submetidos à Nx (G4, G5, G6 e G7) apresentaram elevação da creatinina. No entanto, aqueles que foram submetidos à dieta pobre em P e infusão fisiológica de PTH (G4), tinham creatinina menor do que seus controles (G5).

A ingestão elevada de P nos animais Nx (G5 e G7) elevou significativamente os níveis séricos desse elemento quando comparados aos animais Nx com baixa ingestão de P (G4 e G6), além de reduzir significativamente os níveis séricos de Ca iônico. Nos grupos Sham (G2 e G3) os níveis de P séricos foram semelhantes, independente da ingestão de P, o mesmo ocorrendo com o Ca iônico.

A reposição de PTH 1-34 foi efetiva, e o nível sérico do hormônio proporcional às concentrações infundidas. Animais Sham submetidos à dieta pobre em P (G2) evoluíram com PTH suprimido, enquanto o grupo Sham submetido à dieta rica em P (G3) desenvolveu elevação de PTH.

Tabela 1. Parâmetros Bioquímicos

	SHAM ^a	SHAM-pP ^b	SHAM-rP ^c	NxPTHn-pP ^d	NxPTHn-rP ^e	NxPThE-pP ^f	NxPThE-rP ^g
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Cr (mg/dL)	0,37±0,02 [*]	0,32±0,01 [#]	0,45±0,03 ⁺	0,56±0,03 [≠]	1,09±0,14 [£]	1,02±0,09	0,95±0,15
P (mg/dL)	6,0±0,69 ^μ	4,43±0,39 [¥]	4,9±0,32 [€]	5,6±0,05 [×]	14,7±2,4 ^λ	5,0±0,5 ^ψ	13,0±1,5
Cai (mmol/L)	1,16±0,02 ^μ	1,21±0,05 [#]	1,18±0,03 ⁺	1,18±0,05 ^α	0,61±0,05 ^β	1,44±0,06 ^ψ	0,64±0,09
PTH (pg/mL)	54,7±16,86 ^κ	10,52±2,88 ^θ	131±28,56 [‡]	114,9±30,12 ^Ω	86,76±20,3 ^Φ	249,6±45,25	380,0±66,68

Cai: Cálcio iônico; P: Fósforo sérico; Cr: Creatinina sérica; PTH: Paratormônio sérico. p<0,05: ^{*}a vs d, e, f, g; ^μa vs f, g, e; ^κa vs c, f, g; [#]b vs e, f, g; [¥]b vs e, g; ^θb vs c, d, e, f, g; ⁺c vs e, f, g; [€]c vs e, g; [‡]c vs g; [≠]d vs e, f; [×]d vs e, g; ^αd vs e, f, g; ^Ωd vs f, g; [£]e vs g; ^λe vs f; ^βe vs a, b, c, d, f; ^Φe vs f, g; ^ψf vs g.

5.2. Avaliação Histológica do Tecido Ósseo

A Tabela 2 e as figuras 1, 2 e 3 demonstram os resultados dos parâmetros estruturais da análise histomorfométrica do tecido ósseo.

A ingestão elevada de P (G3, G5 e G7) diminuiu o volume ósseo (BV/TV), a espessura (Tb.Th) e o número (Tb.N) de trabéculas quando comparados aos animais alimentados com dieta pobre em P (G2, G4 e G6).

Estas alterações foram observadas independentemente da presença de uremia.

A ingestão de fósforo não modificou os parâmetros de formação nos animais Sham (G2, G3), aumentando discretamente, porém não de maneira significativa os parâmetros de reabsorção, naqueles com ingestão elevada de fósforo (Tabelas 3 e 4).

Nos animais Nx com PTH elevado e ingestão elevada de P (G7) encontramos menor formação óssea do que nos seus controles, representada pela menor superfície osteóide e número de osteoblastos por perímetro (Tabela 3 e figura 4). Quanto aos parâmetros de reabsorção, houve aumento nos animais com PTH elevado, porém sem diferenças entre aqueles que receberam mais ou menos fósforo (Tabela 4 e figura 5).

Com relação aos índices dinâmicos de mineralização óssea, notamos que os grupos Nx que receberam PTH elevado, independente da ingestão de fósforo, apresentaram aumento do MLT (Tabela 5 e figura 6). Também

notamos que apenas estes animais apresentaram fibrose na medula óssea (G6: $2,34 \pm 0,83$ %; e G7: $1,36 \pm 0,62$ %).

As imagens histológicas do tecido ósseo do fêmur distal dos ratos estudados estão representadas nas figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

Tabela 2 – Parâmetros estruturais do fêmur distal dos animais controles e nefrectomizados

	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Tb.Sp (μm)	Tb.N (/mm)
SHAM^a G1	22,77 \pm 1,75 [±]	66,55 \pm 1,77 [¥]	236,2 \pm 22,43 [£]	3,40 \pm 0,20 ^Ω
SHAM-pP^b G2	26,77 \pm 1,71 ^λ	58,91 \pm 2,41 ^δ	161,8 \pm 9,34 ^κ	4,58 \pm 0,18 [Ⓛ]
SHAM-rP^c G3	16,99 \pm 1,65 ^χ	47,76 \pm 1,88 [Ⓜ]	250,6 \pm 34,7 [Ⓜ]	3,57 \pm 0,33 ^κ
NxPTHn-pP^d G4	24,72 \pm 2,40 [≠]	55,56 \pm 2,88 [€]	178,7 \pm 17,88 ^η	4,39 \pm 0,26 [€]
NxPTHn-rP^e G5	16,67 \pm 1,55 ^φ	54,79 \pm 2,36 ^ρ	303,6 \pm 47,17 ^φ	3,08 \pm 0,32 ^φ
NxPThE-pP^f G6	39,34 \pm 3,27 ^{&}	66,15 \pm 3,03	111,9 \pm 15,04 ^{&}	6,07 \pm 0,63 ^{&}
NxPThE-rP^g G7	25,64 \pm 2,19	59,89 \pm 4,07	177,2 \pm 12,94	4,27 \pm 0,21

BV/TV (%) - Volume trabecular; Tb.Th (μm) - Espessura trabecular; Tb.Sp (μm) - Separação das travess; Tb.N (/mm) - Número de travess. $p < 0,05$: [±] a vs c, e, f, g; ^λ b vs c,e,f,g; ^χ c vs d, f, g; [≠] d vs e,f; ^φ e vs f, g; [&] f vs g; [¥] a vs b, c, d, e; ^δ b vs c, f; [Ⓜ] c vs d,e,f,g; [€] d vs f; ^ρ e vs f; [£] a vs b,f,g; ^κ b vs c,e; ^η d vs e; ^Ω a vs b,d,f,g, [Ⓛ] b vs f; ^κ c vs f.

Tabela 3 - Parâmetros estáticos de formação óssea do fêmur distal dos animais controles e nefrectomizados

	O.Th (μm)	OS/BS (%)	N.Ob./B.Pm (/mm)
SHAM^a G1	1.63 \pm 0.21 [*]	3.84 \pm 0.67 ^{β}	1.65 \pm 0.29 ^{β}
SHAM-pP^b G2	1.73 \pm 0.22 [#]	5.46 \pm 1.37 ^{Ψ}	2.85 \pm 0.46 ^{θ}
SHAM-rP^c G3	2.15 \pm 0.09 ^{\ddagger}	6.70 \pm 1.93 ^{Σ}	3.27 \pm 1.20 ^{\exists}
NxPTHn-pP^d G4	2.11 \pm 0.20 ^{ϵ}	11.09 \pm 1.66 ^{Ω}	4.58 \pm 0.98 ^{Ω}
NxPTHn-rP^e G5	3.16 \pm 0.68	16.97 \pm 4.35 ^{π}	5.76 \pm 1.87 ^{Γ}
NxPTh-e-pP^f G6	3.40 \pm 0.25	44.65 \pm 2.08 ^{$\&$}	29.8 \pm 1.7 ^{$\&$}
NxPTh-e-rP^g G7	2.66 \pm 0.34	29.86 \pm 4.49	16.67 \pm 3.55

O.th (μm) - espessura ostóide; OS/BS (%) - superfície osteóide; N.Ob./B.Pm (/mm) - número de osteoblastos por perímetro. $p < 0,05$: ^{*}a vs e,f,g; [#]b vs e,f,g; ^{\ddagger} c vs f; ^{ϵ} d vs f; ^{β} a vs d, e, f,g; ^{Ψ} b vs d,e, f,g; ^{Σ} c vs f, g; ^{Ω} d vs f, g; ^{π} e vs f; ^{$\&$} f vs g; ^{θ} b vs f,g; ^{\exists} c vs f,g; ^{Γ} e vs f,g.

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

	ES/BS (%)	N.Oc/B.Pm (/mm)
SHAM^a G1	8.89 ± 4.71 ^Π	1.04 ± 0.28 ^α
SHAM-pP^b G2	10.37 ± 1.44 ^Ψ	1.34 ± 0.24 ^Λ
SHAM-rP^c G3	11.85 ± 2.20 ^Σ	1.40 ± 0.21 ^β
NxPTHn-pP^d G4	13.96 ± 2.0 ^Ω	1.41 ± 0.28 ^κ
NxPTHn-rP^e G5	13.96 ± 1.95 ^μ	1.19 ± 0.23 ^π
NxPTHe-pP^f G6	24.97 ± 1.85	2.63 ± 0.21
NxPTHe-rP^g G7	22.81 ± 12.48	1.91 ± 0.33

ES/BS (%) - superfície de reabsorção; N.Oc/B.Pm (/mm) - número de osteoclastos por perímetro. p < 0,05: ^Π a vs f,g; ^Ψ b vs f,g; ^Σ c vs f; ^Ω d vs f; ^μ e vs f; ^α a vs f; ^Λ b vs f; ^β c vs f; ^κ d vs f.

Tabela 5 - Parâmetros dinâmicos do fêmur distal dos animais controles e nefrectomizados

	MS/BS (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$)	BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$)	Mlt (dias)
SHAM^a G1	3.55 ± 0.43	0.78 ± 0.11	0.02 ± 0.002 ^³	2.53 ± 0.56 ^Π
SHAM-pP^b G2	3.09 ± 0.56	0.78 ± 0.05	0.02 ± 0.005 ^χ	6.28 ± 1.82 ^Λ
SHAM-rP^c G3	3.59 ± 0.66	0.76 ± 0.09	0.025 ± 0.008 ^δ	6.4 ± 1.17 ^Σ
NxPTHn-pP^d G4	4.47 ± 0.34	1.17 ± 0.19	0.05 ± 0.006	4.34 ± 0.59 ^Ω
NxPTHn-rP^e G5	5.8 ± 1.19	1.16 ± 0.13	0.07 ± 0.02	12.01 ± 5.10 ^ΰ
NxPThE-pP^f G6	3.93 ± 0.58	0.91 ± 0.31	0.04 ± 0.01	59.99 ± 22.72
NxPThE-rP^g G7	4.11 ± 0.84	1.15 ± 0.31	0.05 ± 0.01	41.92 ± 19.49

MS/BS (%) - superfície mineralizante; MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$) - taxa de aposição mineral; BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$)-Taxa de formação óssea; Mlt (dias)- intervalo de tempo para mineralização. p < 0,05: ^³ a vs d, e, f, g; ^χ b vs d, e, f,g; ^δ c vs d, e, f, g; ^Λ b vs f; ^Σ c vs f; ^Ω d vs f, g; ^ΰ e vs f; ^Π a vs f.

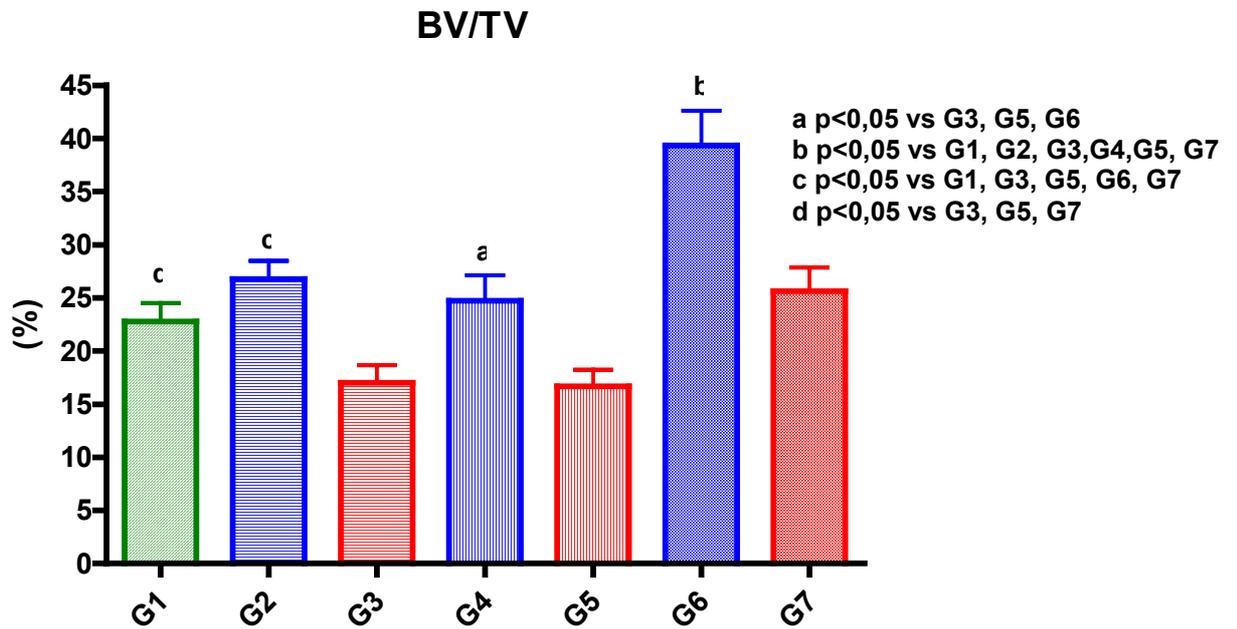


Figura 1. Valores médios do volume trabecular do fêmur distal dos diferentes grupos.

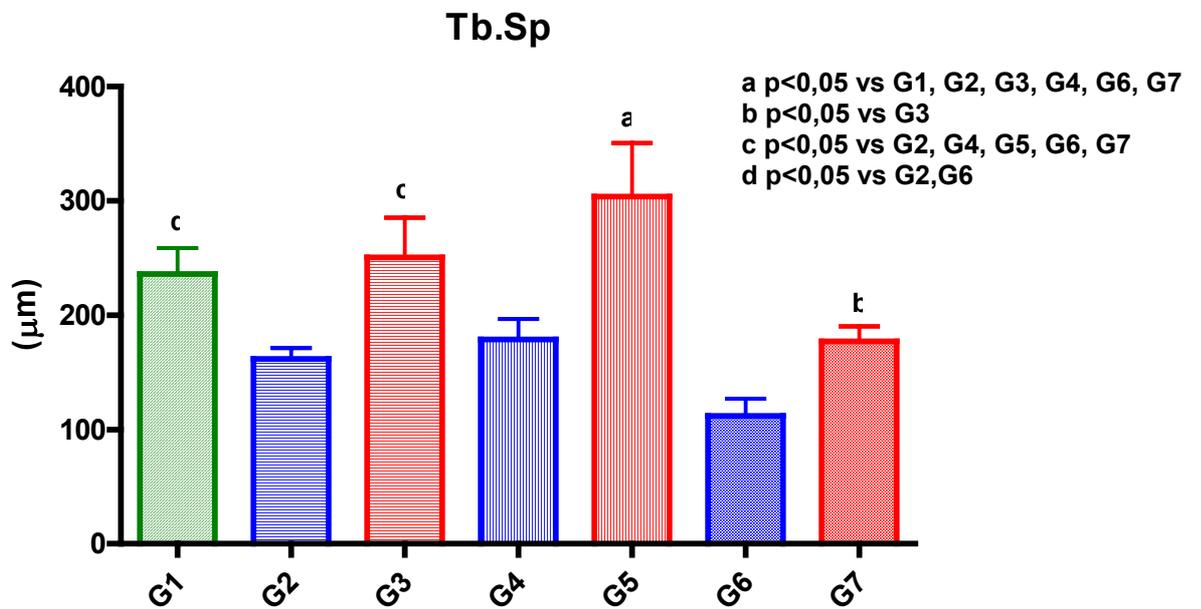


Figura 2. Valores médios da separação das traves do fêmur distal dos diferentes grupos.

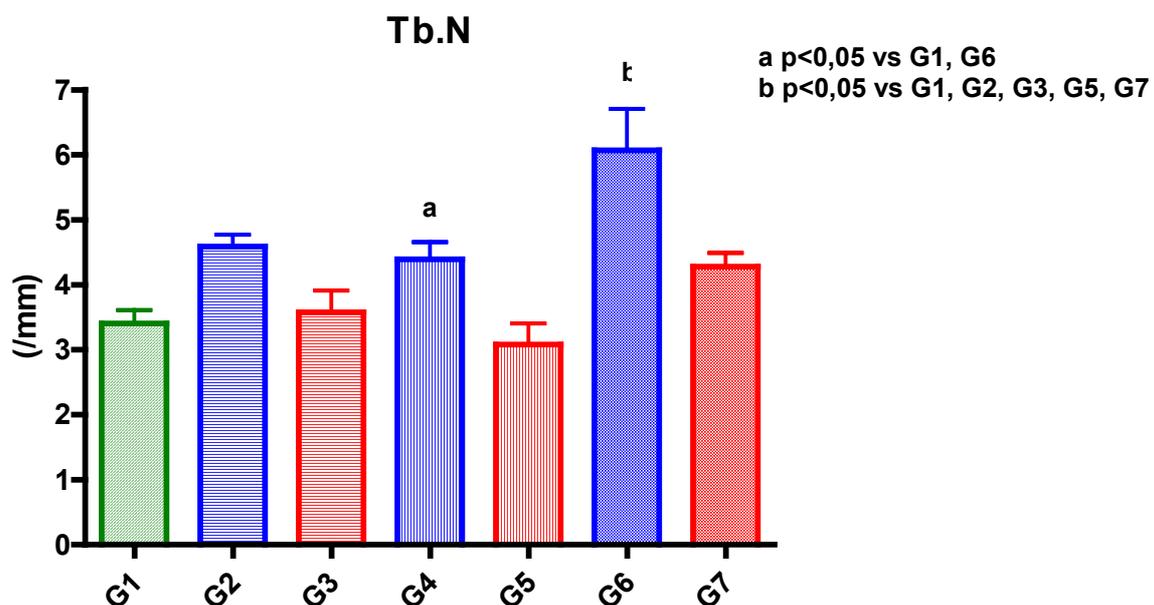


Figura 3. Valores médios do número de traves do fêmur distal dos diferentes grupos.

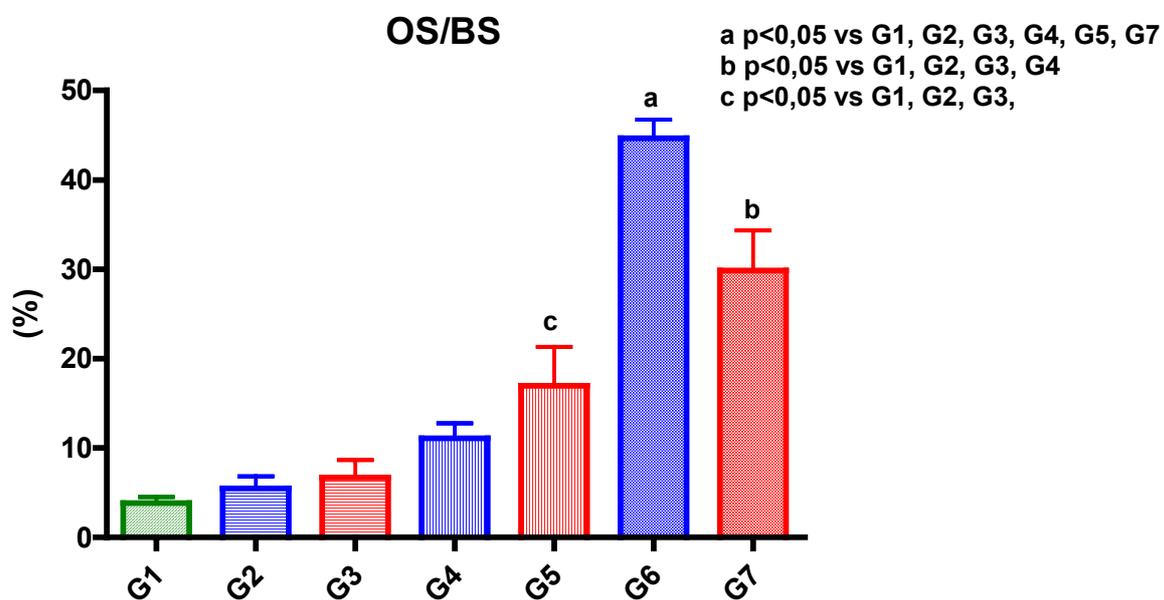


Figura 4. Valores médios da superfície osteóide do fêmur distal dos diferentes grupos.

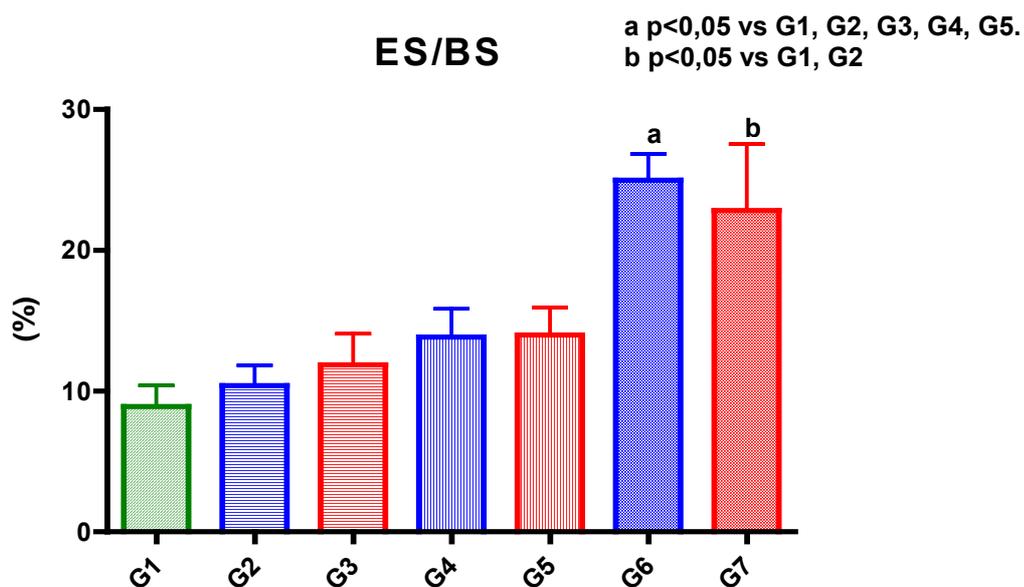


Figura 5. Valores médios da superfície de reabsorção do fêmur distal dos diferentes grupos.

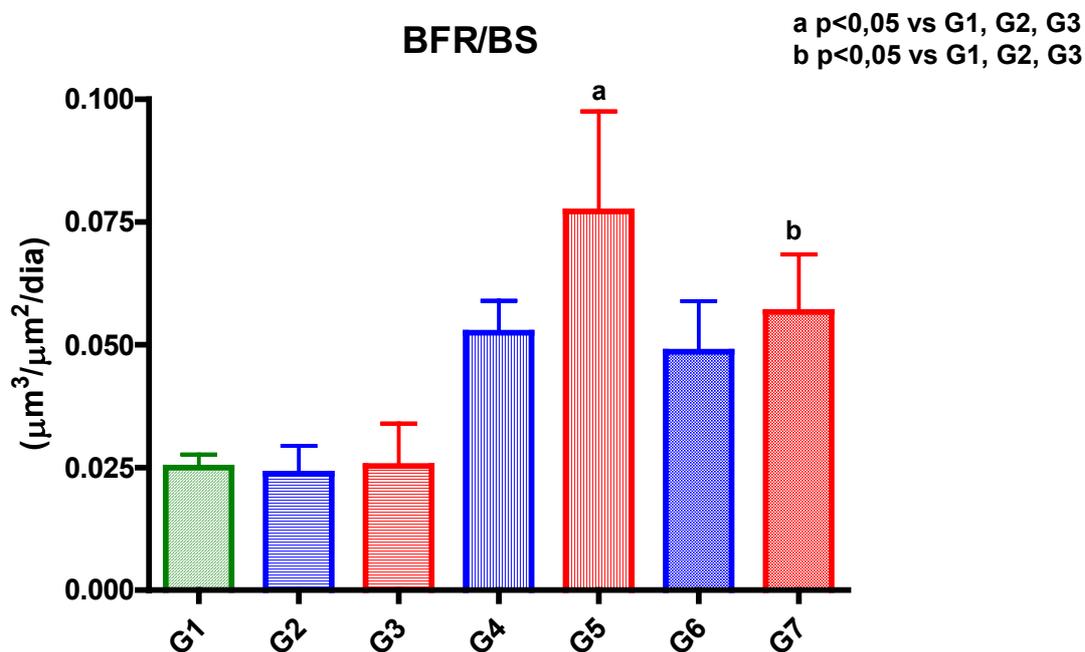


Figura 6. Valores médios da taxa deformação óssea do fêmur distal dos diferentes grupos.

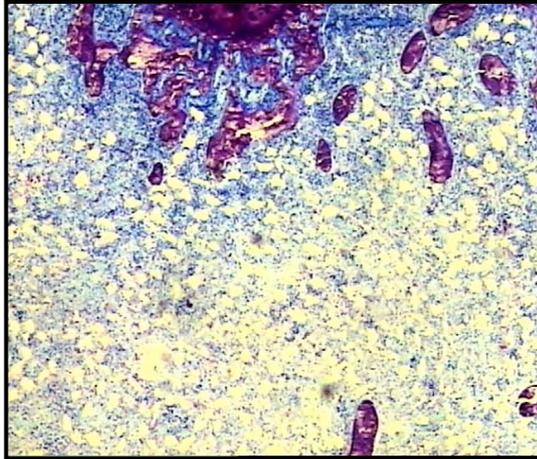


Figura 7. Corte Histológico de tecido ósseo - Fêmur distal. Demonstrando diminuição do volume trabecular, menor número de trabéculas e maior separação das trabéculas no grupo Sham-rP (G3); Azul de Toluidina 0,1% (x250)

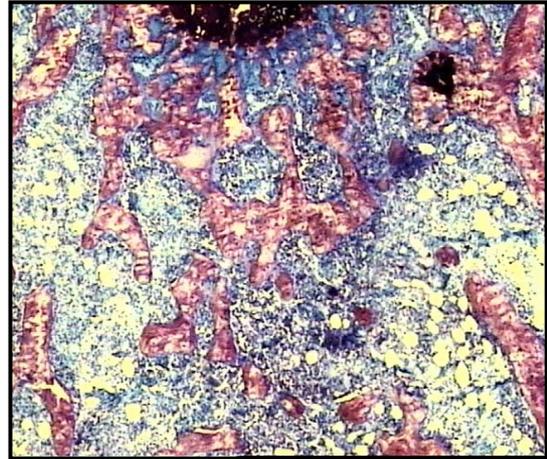


Figura 8. Corte Histológico de tecido ósseo - Fêmur distal. Demonstrando, volume trabecular normal no grupo Sham-pP (G2); Azul de Toluidina 0,1% (x250)

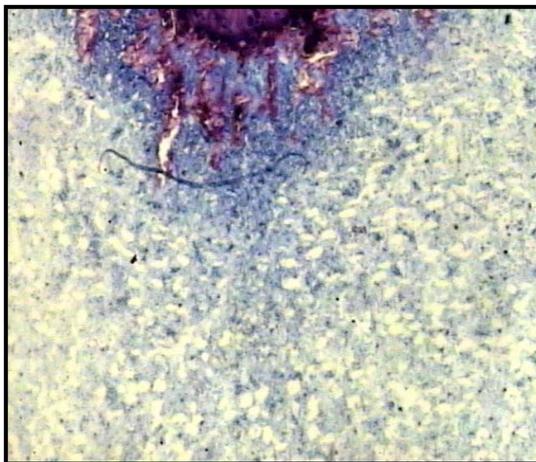


Figura 9. Corte Histológico de tecido ósseo - Fêmur distal. Demonstrando diminuição do volume trabecular, menor número de trabéculas e maior separação das trabéculas no grupo NxPTHn-rP (G5); Azul de Toluidina 0,1% (x250)

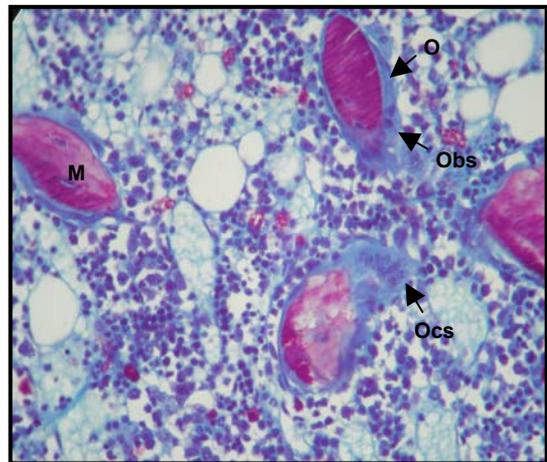


Figura 10. Corte Histológico de tecido ósseo - Fêmur distal. Observa-se aumento da superfície osteóide (O), do número de osteoblastos (Obs) e da superfície de reabsorção (R) no grupo NxPTHn-pP (G4), Osso mineralizado (M) e osteoclastos (Ocs); Azul de Toluidina 0,1% (x400).

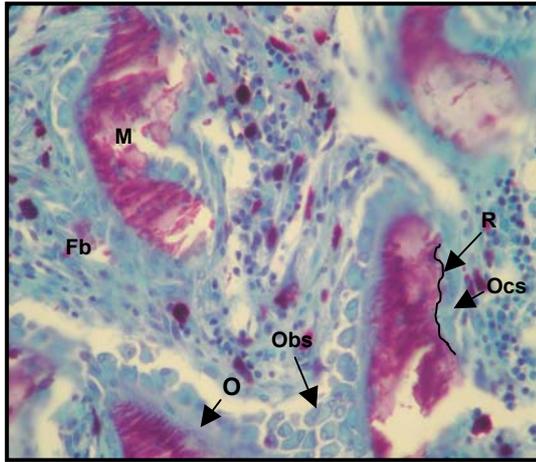


Figura 11. Corte Histológico de tecido ósseo - Fêmur distal. Observa-se diminuição do volume trabecular, aumento da superfície osteóide (O), da superfície de reabsorção (R), do número de osteoblastos (Obs) e osteoclastos (Ocs), além da fibrose medular (Fb) no grupo NxPThe-rP (G7). Osso mineralizado (M); Azul de Toluidina 0,1% (x400).

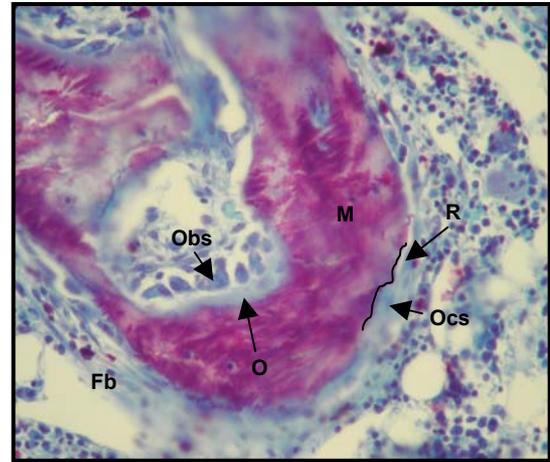


Figura 12. Corte Histológico de tecido ósseo - Fêmur distal. Observa-se aumento da superfície osteóide (O), da superfície de reabsorção (R), do número de osteoblastos (Obs) e osteoclastos (Ocs), além da fibrose medular (Fb) no grupo NxPThe-pP (G6). Osso mineralizado (M); Azul de Toluidina 0,1% (x400).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a ingestão reduzida ou elevada de fósforo afetou o tecido ósseo de animais controles e nefrectomizados tratados com diferentes concentrações de PTH.

O P inorgânico é fundamental para o desenvolvimento do esqueleto e manutenção do metabolismo mineral ³⁹. Além disso, participa de diversas funções celulares como a transferência de energia e a sinalização celular³¹. Os níveis séricos de P são mantidos por vários mecanismos, incluindo absorção intestinal, intercâmbio entre tecidos mole e ósseo e excreção renal. Estes processos são regulados pelo PTH, pela 1 α 25-dihydroxyvitamina D (1,25(OH)2D3) e pelas fosfatoninas ⁴⁰.

No nosso estudo, os animais Nx que ingeriram dieta rica em P apresentaram elevação do P sérico quando comparados aos seus controles, assim como menores níveis de cálcio. A elevada ingestão de fósforo diminuiu a absorção intestinal de cálcio, provavelmente pela formação de complexos insolúveis de cálcio e fósforo na luz intestinal ¹⁸. Quanto aos animais Sham, a concentração de fósforo na dieta não interferiu no fósforo sérico. Em condições normais, quanto maior o fósforo da dieta maior a produção de PTH ²⁴. O excesso de hormônio promove fosfatúria e normaliza o fósforo sérico, o que foi observado no nosso estudo.

O grande achado deste estudo foi a diminuição do volume ósseo com conseqüente alteração na microarquitetura nos animais que ingeriram dieta rica em P, fossem eles Sham ou Nx.

No nosso estudo, a reposição de PTH foi contínua, o que também poderia ter contribuído para a diminuição do volume trabecular. O PTH exerce efeito bifásico nas células osteoblásticas. Este efeito depende da concentração de PTH administrada, do tempo de exposição ao hormônio e do estágio de diferenciação dessas células ^{41,42}. Estudos têm mostrado que o PTH administrado de forma intermitente aumenta o número e a atividade dos osteoblastos e, portanto, a formação óssea. Já a administração contínua tem um efeito catabólico, aumentando mais a reabsorção que a formação óssea, favorecendo a perda de massa óssea ⁴³. Entretanto, Lotinun e cols. estudaram ratos normais tratados com infusão contínua e elevada de PTH (com doses similares a que usamos neste estudo nos animais dos grupos G6 e G7) durante 4 semanas, mostraram aumento progressivo do volume trabecular a partir do quinto dia de infusão de PTH, atingindo valores máximos no momento do sacrifício. Estes animais desenvolveram quadro semelhante ao hiperparatireoidismo, com aumento do número de osteoblastos, osteoclastos e fibrose na medula óssea. Neste mesmo estudo, foi avaliada a proliferação e diferenciação de osteoblastos, concluindo que o PTH aumentou o número de osteoblastos recrutando lining cells, pré-osteoblastos e favorecendo a diferenciação dos fibroblastos da medula em osteoblastos ⁴⁴. Assim, pelo menos no grupo de animais Nx que receberam

doses elevadas de PTH podemos descartar que a diminuição do volume trabecular tenha ocorrido pela forma como o PTH foi infundido.

Estudos com animais normais submetidos à ingestão elevada de fósforo demonstraram aumento da reabsorção óssea avaliada através da excreção urinária de telopeptídeo-C⁴⁵. Em outro trabalho, Huttunen e cols. descreveram uma diminuição da densidade mineral óssea em animais normais alimentados com 1,2% de fósforo durante 8 semanas. À semelhança dos nossos resultados, ambos os estudos relataram elevação do PTH sérico⁴⁶. Assim, a diminuição do volume trabecular observada nos animais Sham que foram submetidos a sobrecarga oral de P provavelmente se deu pelo aumento do PTH e, portanto, da reabsorção óssea. Nesse grupo, apesar de não significativa, observamos aumento da reabsorção óssea e do número de osteoclastos quando comparados aos animais que receberam dieta pobre em P.

Nos animais Nx, a associação da sobrecarga de P com reposição fisiológica de PTH foi a que mais prejudicou o volume e a microarquitetura óssea. Esses resultados demonstram de maneira contundente que, na uremia, para manter um volume ósseo mais próximo do normal são necessárias concentrações mais elevadas de PTH. Vários mecanismos têm sido implicados nessa resistência óssea ao PTH na uremia, ou seja, a diminuição de receptores de PTH nos osteoblastos, o acúmulo de fragmentos de PTH 7-84 e de osteoprotegerina¹⁹. Neste grupo, os níveis de fósforo sérico foram mais elevados que nos demais e a hiperfosfatemia, por si, agravou a resistência óssea ao PTH⁴⁷.

Nos animais com reposição elevada de PTH e Nx, o volume e a microarquitetura óssea foram preservados. Entretanto, aqui também a sobrecarga de fósforo diminuiu o volume trabecular quando comparamos os animais que receberam mais ou 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 ingestão baixa em fósforo.

A sobrecarga de fósforo diminuiu a superfície osteóide e o número de osteoblastos dos animais Nx e com PTH elevado, o que também contribuiu para a diminuição do volume trabecular, quando comparados aos seus controles. Meleti e cols. demonstraram *in vitro* que o fósforo causa apoptose dos osteoblastos, e que elevadas concentrações de P diminuem a viabilidade dos osteoblastos diferenciados, sendo este efeito tempo e dose dependente. Neste mesmo trabalho, o uso do inibidor do co-transportador de Na/P foi capaz de inibir a apoptose de osteoblastos, demonstrando ser necessária a entrada do P na célula para que ocorra a apoptose⁴⁸. Um outro grupo, estudando condrócitos *in vitro* também mostrou que o aumento do P intracelular é o sinal primário para apoptose destas células e que este efeito é dependente da concentração de cálcio no meio extracelular⁴⁹.

Nos últimos anos, a quantidade de fósforo na dieta de indivíduos de diferentes países tem aumentado progressivamente, cerca de 17% a cada década⁵⁰. Esse fato se deve principalmente ao uso de conservantes nos alimentos. Estudo realizado no Japão mostrou que a ingestão de P em 1960 era de 1,243 mg/dia; em 1975 de 1,332 mg/dia; e em 1995 subiu para 1,42

mg/dia⁵¹. Nosso grupo, utilizando o mesmo modelo com infusão contínua de PTH em concentração fisiológica e dieta rica e pobre em fósforo, demonstrou que a sobrecarga de fósforo era deletéria para o tecido ósseo promovendo lesões semelhantes à osteoporose⁵². No estudo Framingham Osteoporoses, mulheres que ingeriram elevadas quantidades de refrigerantes a base de cola apresentavam menor densidade mineral óssea⁵³. Resultados semelhantes foram observados por McGartland e cols. avaliando adolescentes normais demonstraram que aquelas que ingeriram dieta com alto teor de P tinham diminuição da DMO e maior risco de fraturas⁵⁴. Recentemente Kemi VE e cols. estudando mulheres jovens e saudáveis, tratadas com diferentes suplementações de P, demonstrou elevação do PTH, e diminuição do cálcio iônico proporcional a carga de P ingerida, além de diminuição dos marcadores de formação e aumento dos marcadores de reabsorção óssea⁵⁵. Esses resultados sugerem que a ingestão de quantidades elevadas de fósforo favorece a perda de massa óssea em indivíduos normais provavelmente pelo efeito direto do fósforo na secreção de PTH e conseqüente aumento na reabsorção óssea⁵⁶.

Cerca de 60% dos pacientes em diálise apresentam hiperfosfatemia². Além dos efeitos deletérios já conhecidos e atribuídos a hiperfosfatemia, não é impossível que o excesso de fósforo influencie negativamente a massa óssea desses pacientes⁵³, contribuindo para a elevada incidência de osteoporose nessa população⁵⁷.

Nossos resultados mostram que a insuficiência renal moderada associada com alto teor de P na dieta foi capaz de produzir hiperfosforemia, hipocalcemia e diminuição da massa óssea, e este efeito foi amenizado pela elevação sérica do PTH. O hiperparatireoidismo protegeu o osso do efeito osteopênico do P. Por outro lado, sabemos que o HPTH também é deletério ao osso. Estes dados só vêm confirmar que, na uremia, é necessário um controle adequado do P na dieta e um ajuste do PTH para que se tenha uma remodelação óssea adequada.

7. CONCLUSÕES

- A hiperfosfatemia diminuiu o volume trabecular e modificou a microarquitetura óssea, independente da uremia.
- Níveis elevados de PTH atenuaram os efeitos do fósforo no volume e na microarquitetura óssea.
- Na DRC o controle adequado de fósforo, assim como níveis de PTH superiores ao fisiológico, são necessários para uma remodelação óssea adequada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Goodman, WG, Goldin J, Kuizon BD, et al. *Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis*. N Engl J Med, 2000; 342:1478-1483.
- 2- Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, et al. *Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis*. JASN, 2004; 15:2208-2218.
- 3- Moe S, Drueke T, Cunningham J, et al. *Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving global Outcomes (KDIGO)*. Kidney Int, 2006; 69:1945-1953.
- 4- Goodman WG, Coburn JW, Slatoplosky E, Salusky IB. *Renal Osteodystrophy in Adults and Children*. In Favus JM. *In Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism*, Third Edition, Chicago, Illinois, Lipincott - Raven, 1996, p. 341-360.
- 5- Martin KJ, González EA. *Strategies to minimize bone disease in renal failure*. Am. J. Kidney. Dis, 2001; 38(6): 1430-36.
- 6- Sherrard D, Ott S, Maloney N, Andress D, Coburn J. *Uremic osteodystrophy: Classification, cause and treatment*. In: Frame, B. & Potts, J.T.JR., ed. *Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Amsterdam, Expecta Medica, 1983, p. 254-59.
- 7- Salem MM. *Hyperparathyroidism in the hemodialysis population: A survey of 612 patients*. Am. J. Kidney. Dis, 1997; 29: 862-65.

- 8- Canella G, Bonucci E, Rolla D, et al. *Evidence of healing of secondary hyperparathyroidism in chronically hemodialyzed uremic patients treated with long- term intravenous calcitriol*. *Kidney Int*, 1994; 46: 1124-1132.
- 9- Ferreira MA. *Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when bone biopsy is needed*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000; 15(Suppl 5):S8-14.
- 10- Araújo S, Ambrosini P, Lobão R, Ambrosini P, Lobão R, Caorsi H, Moysés R, Barreto F, Olaizola I, Cruz E, Petraglia A, Reis L, Duarte ME, Jorgetti V, Carvalho A. *The Renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: An overview*. *Kidney Int*, 2003; 63(Suppl. 85): S54-S56.
- 11- Goodman WG, Coburn JW, Slatopolsky E, Salusky I. Renal osteodystrophy in adult and children. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4th.ed.Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. Cap.6, p.350-1.
- 12- Pei Y, Hercz G, Greenwood C, Segre G, Manuel A, Saiphoo C, Fenton S, Sherrard D. *Risk factors for renal osteodystrophy: a multivariant analysis*. *J Bone Miner Res*, 1995; 10:149-56.
- 13- Houillier P, Froissart M, Maruani G, Blanchard A. *What serum calcium can tell us and what it can't*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 1-4.
- 14- Phillips F. *Diet and bone health*. British Nutrition foundation, 2004; 29:99-110.

- 15- Leman J, Favus Jr and Murray. *Intestinal Absorption of Calcium, Magnesium, and Phosphate*. In: Favus JM, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 5th edition; 93-97,.
- 16- Brown E. *Calcium – Sensing Receptor*. In: Favus JM, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 5th edition; 111-117.
- 17- Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovannini M, Sarfatie E, Drueke TB. *Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with primary or secondary hyperparathyroidism*. *Kidney Int*, 1997; 51: 328-336.
- 18- Brautbar N, Levine BS, Walling MW, Coburn JW. *Intestinal absorption of calcium: role of dietary phosphate and vitamin D*. *Am. J. Physiol*, 1981; 241: 49-53.
- 19- Iwasaki Y, Yamato H, Nii- Kono T, Fujeda A, Uchida M, Hosokawa A, Motojima M, Fukagawa M. *Insufficiency of PTH action on bone in uremia*. *Kidney Int Suppl*, 2006; 102:s34-6.
- 20- Knochel JP. *The clinical and Physiological Implications of Phosphorus Deficiency*. In *the Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press, 2533-2562.
- 21- Statopolsky EA, Bricker NS. *The role of phosphorus restriction in the prevention of secondary hyperparathyroidism in chronic renal disease*. *Kidney Int*, 1973; 4(2):141-145.

- 22- Slatopolsky E, Brown A, Dusso A . *Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. Kidney Int*,1999; 56(Suppl 73): 14-19.
- 23- Slatopolsky E, Delmez JA. *Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. Am. J. Kidney. Dis.*1994; 23(2): p. 229-36.
- 24- Bernedt T, Kumar R. *The phosphatonins and the regulation of phosphate excretion. In the kidney: physiology and pathophysiology.* D.a.G seldin, G, editor. New York: raven press.1992. 2511-2532.
- 25- Santos F, Moysés R, Montenegro F, Jorgetti V, Noronha I. *IL- 1 β , TNF- α , TGF- β , and bFGF expression in bone biopsies before and after parathyroidectomy.* *Kidney Int*, 2003; 63, 899-907.
- 26- Hernandez A, Concepcion MT, Rodriguez M, Salido E, Torres A. *High phosphorus diet increases preproPTH mRNA independent of calcium and calcitriol in normal rats.* *Kidney Int*, 1996; (6), 1872-1878.
- 27- Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia- Navarro E, Torres A, Rodriguez M. *Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro.* *J Bone Miner Res*, 1996; (11) 970-976.
- 28- Bernedt T, Kumar R. *The phosphatonins and the regulation of Phosphorus Homeostasis.* *Bone KEy-Osteovision*, 2005; 2:5-16.
- 29- Brown EM, Juppner H. *Parathyroid hormone: Synthesis, secretion, and action.* In: Favus JM, editor. *Primer on the metabolic Bone Diseases and disorders of Mineral Metabolism.* 6th edition, Washington DC. 2006; 90-99.

- 30- Brown EM. *Calcium receptor and regulation of parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism*. *Kidney Int*, 2000; 1:307-315.
- 31- Potts JT. *Parathyroid hormone: past and present*. *Journal of Endocrinology*, 2005; 187:311-325.
- 32- Holick MF. *Vitamin D: The underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health*. *Curr Opin Endocrinol Diabets*, 2002; 9:87-98.
- 33- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, et al. *An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3*. *Cell*, 1999; 96:507-515.
- 34- LaClair RE, Hellman RN, Karp SN, et al. *Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: A cross-sectional study across latitudes in the United States*. *Am. J Kidney Dis*, 2005; 45:1026-1033.
- 35- Holick MF, Garabedian M. *Vitamin D: Photobiology, Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications*. In: Favus JM, editor. *Primer on the metabolic Bone Diseases and disorders of Mineral Metabolism*, 6th edition, Washington DC; 2006; 106-114.
- 36- Bouillon R 2001. *Vitamin D: From photosynthesis, metabolism and action to clinical applications*. In Degroot LL, Jameson JL(eds.) *Endocrinology*, vol. 2, 4th Saunders, Philadelphia, PA, USA, pp.1009-1028.

- 37- Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. *Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats.* J Bone Miner Res, 1997; 12:2098-2107.
- 38- Parffit AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.* J Bone Miner Res, 1987; 2 :595-610.
- 39- Takeda E, Yamamoto H, Nashiki K, Sato T, Arai H, Taketani Y. *Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus.* J Cell. Mol. Med, 2004; 8: 191-200.
- 40- Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R. *Phosphatonins and regulation of phosphorus homeostasis.* AM J Physiol Renal Physiol, 2005; 289(6): F 1170-82.
- 41- Schmitt CP, Hensing S, OH Jun, Webwr L, Ochlich P, Mehls O. *Intermittent administration of parathyroid hormone (1-37) improves growth and bone mineral density in uremic rats.* Kidney Int, 2000; 57:1484-1492.
- 42- Locklin RM, Khosla S, Turner S, et al. *Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone.* Journal of Cellular Biochemistry, 2003; 89:180-190.

-
- 43- Padagas J, Colloton M, Shallhoub V, Kostenuik P, Morony S, Munyaiakazi L, Guo M, Gianneschi D, Shatzen E, Geng Z, Tan HL, Dunstan C, Lacey D, Martin D. *The Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand Inhibitor Osteoprotegerin Is a Bone-protective agent in a rat model of chronic renal insufficiency and hyperparathyroidism.* Calcif Tissue Int, 2006; 78: 35-44.
- 44- Lotinum S, Sibonga JD, Turner RT. *Evidence that the cells responsible for marrow fibrosis in a rat model for hyperparathyroidism are preosteoblasts.* Endocrinology. 2005; 4074-4081.
- 45- Katsumata S, Matsuzaki H, Uehara M, Suzuki K. *Effects of Lowering food intake by high phosphorus diet on parathyroid hormone actions and kidney mineral concentration in rats.* Biosci.Biotechnol.Biochem, 2006; 70(2), 528-531.
- 46- Huttunen MM, Pietila PE, Viljakainen HT, Lamberg- Allardt CJ. *Prolonged increase in dietary phosphate intake alters bone mineralization in adult male rats.* J Nutr Biochem, 2005; 17(7):479-84.
- 47- Bover j, Jara A, Trindad P, et al. *Dynamics of skeletal resistance to parathyroid hormone in rat: effect of renal failure and dietary phosphorus.* Bone, 1999; 25(3):279-85.
- 48- Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS. *Inorganic Phosphate Induces Apoptosis of Osteoblast-like Cell in Culture.* Bone, 2000; 27(3):359-366.

-
- 49- Mansfield K, Teixeira CC, Adams CS, Shapiro IM. *Phosphate ions mediate chondrocyte apoptosis through a plasma membrane transporter mechanism*. Bone, 2001; 1-8.
- 50- Calvo MS. *Dietary phosphorus, calcium metabolism, and bone*. J. Nutr, 1993; 123: 1627-1633.
- 51- Takeda E, Sakamoto K, Yokota K, et al. *Phosphorus supply per capita from food in Japan between 1960 and 1995*. J. Nutri Sci. vitaminol, 2002; 48:102-108.
- 52- Neves K, Graccioli, F, dos Reis LM, Pasqualucci C, Moysés R, Jorgetti V. *Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure*. Kidney Int, 2004; 66:2237-2244.
- 53- Tucker KL, Morita K, Qiao N, et al. *Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham osteoporosis study*. Am J Clin Nutr, 2006; 84:936-42.
- 54- McGartland C, Robson P, Murray L, Cran G, Savage MJ, Watkins D, Rooney M and Boreham C. *Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: The Northern Ireland Young Hearts Project*. J of Bone Mineral Research, 2003; 18: 1563-1569.

-
- 55- Kemi VE, Karkkainen MU, Lamberg-Allardt CJ. *High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy Young females.* Br J Nutr, 2006; 545-552.
- 56- Karaplis AC, Goltzman D. *PTH and PTH rP effects on the skeleton.* Rev Endocr. Metab. Disord, 2000; 1 :331-341.
- 57- Barreto FC, Barreto DV, Moyses RMA, Neves CL, Jorgetti V, Draibe SA, Canziani ME, Carvalho AB. *Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry. A new insight into an old problem.* Kidney Int, 2006; 69:1852-7.

ANEXO



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 14.12.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1136/05, intitulado: "Avaliação das alterações ósseas em ratos urêmicos tireoparatiroidectomizados submetidos a dieta rica e pobre em fósforo associada a infusão de diferentes concentrações de paratormônio." apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

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").

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Vanda Jorgetti

Pesquisador (a) Executante: Dra. Daniella Guimarães Batista

CAPPesq, 14 de Dezembro de 2005.

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesa@hcnet.usp.br / secretariocappesa@hcnet.usp.br
VCN