

Daniella Guimarães Batista

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

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

Programa de: Nefrologia

Orientadora: Dr^a. Vanda Jorgetti

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Batista, Daniella Guimarães

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

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

Orientadora: Vanda Jorgetti.

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

USP/FM/DBD-478/10

Normalização Adotada

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

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

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

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

Resumo

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

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

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

Summary

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

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

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

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Metabolismo do cálcio

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

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

