

Luís Eduardo Becker

**Efeito do paricalcitol e do calcitriol
sobre a doença cardiovascular
em camundongos uninefrectomizados ApoE -/-**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo
2007

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Relação entre doença renal crônica e cardiovascular	1
1.2. Relação entre calcificações vasculares e doença cardiovascular	3
1.3. Distúrbios no metabolismo do cálcio e fósforo e tratamento com vitamina D na doença renal crônica	6
1.3.1. Fisiopatologia do hiperparatireoidismo secundário	6
1.3.2. Regulação da secreção do PTH pela concentração de Ca^{+2} o receptor cálcio-sensível (CaSR)	8
1.3.3. O papel da vitamina D ₃ ativa na regulação do PTH e na hiperplasia da paratireóide	9
1.4. Efeitos do tratamento com calcitriol sobre o sistema cardiovascular	14
1.4.1. Efeitos do tratamento com calcitriol sobre o coração	14
1.4.2. Efeitos da calcitriol sobre os vasos	16
1.5. Análogos da Vit D - Paricalcitol	21
1.6. Modelo experimental de uninefrectomia (UNX) em animais ApoE knockout (ApoE -/-)	24
2. OBJETIVOS	28

3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais	29
3.2. Dietas	30
3.3. Modelo experimental	31
3.3.1. Modelo de uninefrectomia (UNX) em camundongos ApoE -/-	31
3.3.2. Procedimento cirúrgico	32
3.3.3. Anestesia	33
3.3.4. Cuidados pós-operatórios	34
3.4. Tratamento farmacológico	34
3.5. Grupos experimentais	36
3.6. Pressão arterial	37
3.7. Gaiolas metabólicas	38
3.8. Eutanásia dos animais	38
3.9. Análise bioquímica	41
3.9.1. Análise bioquímica do soro	41
3.9.2. Albuminúria	41
3.10. Preparo do tecido	43
3.10.1. Preparo do tecido dos animais submetidos à perfusão com glutaraldeído	43
3.10.2. Preparo tecidual para os animais submetidos à perfusão com solução de NaCl a 0,9%	49
3.11. Análise morfológica	49
3.11.1. Análise morfológica do coração	49
3.11.2. Análise morfológica da aorta	54
3.12. Colorações histológicas	55
3.12.1. Histologia comum	55
3.12.2. Imuno-histoquímica	56
3.12.3. Análise das lâminas	60
3.13. Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)	61
3.13.1. Isolamento do RNA	62
3.13.2. Transcrição para DNA complementar	62
3.13.3. PCR semiquantitativo	62
3.14. Análise estatística	63

4. RESULTADOS	64
4.1. Dados biométricos.....	64
4.1.1. Evolução ponderal e pressão arterial.....	64
4.1.2. Massa cardíaca, massa do ventrículo esquerdo (VE) e relação com massa corporal.....	67
4.2. Análise bioquímica.....	68
4.2.1. Depuração de creatinina e albuminúria.....	68
4.2.2. Perfil lipídico.....	70
4.2.3. Cálcio e fósforo.....	72
4.3. Análise morfológica tecidual.....	73
4.3.1. Tecido cardíaco.....	73
4.3.2. Aorta.....	75
4.4. Colorações histológicas e imuno-histoquímica.....	80
4.4.1. Tecido cardíaco.....	80
4.4.2. Aorta.....	83
4.5. PCR.....	89
5. DISCUSSÃO	90
6. RESUMO	109
7. CONCLUSÕES	110
8. REFERÊNCIAS	111

RESUMO

Becker LE. *Efeito do Paricalcitol e do Calcitriol sobre a doença cardiovascular em camundongos uninefrectomizados ApoE -/-* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

O estudo investigou a influência do tratamento de 10 semanas com paricalcitol (0,1µg/kg 5x/semana) e calcitriol (0,03µg/kg 5x/semana) em modelo de aterosclerose espontânea utilizando camundongos ApoE -/- sham e uninefrectomizados (UNX).

Resultados: a densidade capilar por comprimento no tecido cardíaco foi significativamente mais baixa nos animais UNX Controle quando comparados aos shams, o que não ocorreu nos animais UNX tratados com paricalcitol e calcitriol. Nas aortas, a relação parede/lúmen foi significativamente menor no grupo Sham Controle quando comparada à dos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol, sendo que nesses últimos, foram evidenciadas calcificações vasculares acompanhadas por células positivas para Runx-2 (cbfa-1). Houve também uma menor expressão de TGFβ nas aortas dos animais do grupo UNX Paricalcitol em relação aos grupos UNX Controle e UNX Calcitriol.

Conclusões: Ambos os tratamentos preveniram alterações na capilarização cardíaca induzidas pela UNX. O tratamento com calcitriol na dose empregada induziu significativas calcificações vasculares, o que não ocorreu com o paricalcitol.

Descritores

1. Vitamina D/análogos & derivados
2. Calcitriol
3. Aterosclerose
4. Esclerose calcificante da média de Mönckeberg
5. Doenças cardiovasculares
6. Camundongos Knockout
7. Nefrectomia

SUMMARY

Becker LE. *Effect of Paricalcitol and Calcitriol on cardiovascular disease in uninephrectomized ApoE -/- mice* [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2007.

The study investigated the influence of a 10-week treatment with Paricalcitol (0.1µg/kg, 5x/week) or Calcitriol (0.03µg/kg, 5x/week) on cardiovascular disease in spontaneously atherosclerotic ApoE -/- mice submitted to uninephrectomy (UNX).

Results: capillary length density of the heart was significantly lower in UNX Control, but not in UNX Paricalcitol and UNX Calcitriol animals, when compared to shams. In the aortas, a significantly lower wall/lumen ratio was observed in the Sham Control group when compared to UNX Control and UNX Calcitriol groups. In the latter, vascular calcifications accompanied by a significant presence of Runx-2 (cbfa-1) positive cells was observed. TGFβ aorta expression was significantly higher in UNX Control and UNX Calcitriol groups when compared to UNX Paricalcitol.

Conclusions: Both treatments were able to prevent the reduction in heart capillarization induced by the UNX model. Treatment with Calcitriol at the employed dose and duration, though, induced significant vascular calcifications.

Descriptors

1. Vitamin D/analogues & derivatives
2. Calcitriol
3. Atherosclerosis
4. Mönckeberg medial calcific sclerosis
5. Cardiovascular diseases
6. Knockout mice
7. Nephrectomy

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE -/-	Apolipoproteína E “knockout”
APS	Persulfato de amônio
AR	Área de referência
CaSR	Receptor cálcio-sensível
Cbfa1	Fator de ligação nuclear, subunidade alfa-1
cDNA	DNA complementar
DTT	1,4-Ditiotreitol
ECL	Quimioluminescência aprimorada
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
EGTA	Dietil-enol-glicol(2-amino-etil-eter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligada à enzima
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
EVG	Elástica van Gieson
FELASA	Federação Européia de Ciência Animal Laboratorial
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GV-SOLAS	Sociedade Alemã de Zoologia Experimental
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEPES	4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-ácido etanossulfônico
IBF	Biotério Central da Universidade de Heidelberg
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
NF_κB	Fator nuclear κ B
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular

RANKL	Ativador do receptor do ligante de NF _κ B
RNAse-free	Livre de ribonucleases
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa
Runx-2	ver Cbfa1
RXR	Receptor retinóico X
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de dodecilsulfato sódico/poliacrilamida
SNX	Nefrectomia subtotal (remoção de 5/6 do parênquima renal)
SPF	Livre de patógenos específicos
TBS	Solução salina tris-tamponada
TBS-T	TBS com <i>tween 20</i> (solução emulsificadora)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TGFβ	Fator transformante do crescimento beta
UNX	Uninefrectomia
VDR	Receptor para vitamina D
VDREs	Elementos de resposta à vitamina D
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL	Lipoproteína de baixíssima densidade

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida de pacientes em diálise encontra-se reduzida em três a seis vezes, quando comparada à de indivíduos saudáveis da mesma idade, segundo dados do registro norte-americano de 2006 (USRDS). Embora esta discrepância seja em parte explicada pela própria doença de base que levou à insuficiência renal crônica, a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e otimização da abordagem terapêutica durante toda a evolução da doença renal são os principais pontos a serem abordados, para uma melhoria da sobrevida do paciente portador de doença renal crônica. Nesse contexto, atenção especial deve ser dada à doença cardiovascular, cujo risco é diretamente proporcional à queda na taxa de filtração glomerular (Zoccali, 2006).

1.1. Relação entre doença renal crônica e cardiovascular

Eventos cardiovasculares constituem a principal causa de óbito em pacientes urêmicos (Levey et al., 1998). Os processos ateroscleróticos encontram-se acelerados nesses pacientes, sendo que a mortalidade cardiovascular em um paciente em diálise é da ordem de 10 a 20 vezes maior quando comparada à da população geral (Sarnak et al., 2002), o que classifica todo o paciente portador de doença renal crônica como de alto risco para tais eventos (Levey et al., 1998).

Pacientes portadores de doença renal crônica também possuem frequentemente outros fatores de risco cardiovasculares, tais como: idade avançada, hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia (Longenecker et al., 2002). Porém, estudos transversais com pacientes com doença renal crônica mostraram que a equação de Framingham (Anderson et al., 1991), a qual estratifica o risco cardiovascular através dos fatores de risco tradicionais, não prediz integralmente o risco cardiovascular dessa classe específica de pacientes (Sarnak et al., 2002; Longenecker et al., 2002). Estudos recentes revelam que somente a redução da taxa de filtração glomerular constitui fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (Go et al., 2004), sendo que estudos observacionais de longo prazo, analisando diferentes faixas etárias, concluem que o déficit de função renal constitui fator de risco independente para a ocorrência de eventos cardiovasculares e óbito de causa cardiovascular (Fried et al., 1998). O consenso destas observações pode ser observado no “Seventh Report of Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure” (VII JOINT), no qual encontra-se estabelecido que uma taxa de filtração glomerular inferior a 60ml/min constitui fator de risco maior para o desenvolvimento de doença cardiovascular (Levey et al., 2003).

No caso da prevenção secundária de eventos cardiovasculares, esta afirmação também é verdadeira, como revelado na análise de mais de 14.000 pacientes do estudo VALIANT (Anavekar et al., 2004). Neste estudo

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:

