

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Bárbara Bruna Abreu de Castro

**EFEITO DA QUITOSANA-FE(III) RETICULADA SOBRE A
CALCIFICAÇÃO VASCULAR EM UM MODELO DE UREMIA**

Juiz de Fora
2015

Bárbara Bruna Abreu de Castro

**EFEITO DA QUITOSANA-FE(III) RETICULADA SOBRE A
CALCIFICAÇÃO VASCULAR EM UM MODELO DE UREMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Hélydy Sanders Pinheiro

Juiz de Fora

2015

Bárbara Bruna Abreu de Castro

**EFEITO DA QUITOSANA-FE(III) RETICULADA SOBRE A
CALCIFICAÇÃO VASCULAR EM UM MODELO DE UREMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Aprovada em _____ de _____ de 2015

BANCA EXAMINADORA

Dra. Hélydy Sanders Pinheiro - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Melani Ribeiro Custódio
Universidade de São Paulo

Dr. Vinicius Sardão Colares
Universidade Presidente Antônio Carlos - Juiz de Fora

Juiz de Fora

2015

Dedico esse trabalho à minha querida vovó Carminha (Maria do Carmo Abreu de Castro), que viveu ensinando o valor do sacrifício, sem perder a doçura e o dom da paciência. Tenho certeza que a sua luta foi recompensada... Teu lar é no Reino Divino.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Hélydy Sandders Pinheiro, principal responsável pelo meu crescimento intelectual durante todos esses anos...

Minha orientadora querida, muitíssimo obrigada, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos para a vida profissional, exemplo pessoal e pelo companheirismo de sempre. Sua amizade foi o melhor e mais feliz resultado!

Ao Dr. Wander Barros do Carmo, meu “irmãozão” mais velho, agradeço de coração, todo o incentivo, companhia nas eutanásias, ajuda eterna para entender o “tal” distúrbio mineral ósseo e a bendita estatística. Obrigada pelas palavras de conforto nos momentos de desespero (Oh criatura calma esse Wander)... Valeu mesmo por todo esforço!

À minha família, que não poupa esforços e cuidados comigo. Meus pais Luiz de Castro e Rosane de Castro, obrigada por todo amor, carinho e dedicação. Às minhas irmãs, Lorena Gabrielle e Sophia Kelly pelo afeto e incentivo sempre. Vocês duas são meu orgulho! Sem esquecer o Boris (nosso irmão mais novo) e meu eterno companheiro Théo... É um privilégio fazer parte dessa família, obrigada, meu porto seguro!

Aos amigos da equipe LABNEX...

Obrigada Júlia, Luísa, Leonardo, João, Allyne, Mariana e Paula que de alguma forma ajudaram, durante sua iniciação científica ou em estágio, colaborando com esse projeto.

Ao Dr. Paulo Suassuna, por todo apoio moral e intelectual. Grande amigo, dono de uma inteligência fantástica e um coração gigante.

Aos colegas do Centro de Biologia da Reprodução...

Às professoras Dra. Vera Maria Peters e Martha de Oliveira Guerra, pela disponibilidade e amizade, juntamente com todos da equipe do CBR.

À professora Dra. Beatriz Aaestrup e seu aluno Álvaro, professora Dra. Leda Lucinda e aluna de mestrado Lúcia. Meus agradecimentos ao Dr. Roberto, Marcella, Lorena, Ana Paula, Jéssica, Evelise, Paulinho, Luiz, Laetitia, Pedro, Clemilson, Bruno, Marcos, Djenane, José Wilson, João, José Carlos, Luiz Carlos, Paulo, Julieta, Flávia por toda colaboração durante minha trajetória no CBR.

Aos colegas do NIEPEN...

Obrigada Dr. Rogério Baumgratz, Dr. Marcus Bastos, Dra. Nathalia Fernandes, Dr. Fernando Colugnati e demais professores. Meus agradecimentos aos colegas de pós-graduação, em especial às amigas: Andresa Nascimento, Elisa Marsicano e Renata Pinhati. Minhas “sisters”, sem vocês os congressos não seriam os mesmos! Obrigada por me acolherem nesse grupo, vocês são especiais!

Aos amigos do LIM16...

Minha admiração e gratidão especial à Dra. Vanda, pela recepção calorosa e amigável. À minha co-orientadora Melani Ribeiro Custódio, agradeço infinitamente pela dedicação e ajuda constante, pelo conhecimento repassado e pelo bom humor contagiante.

Wagner, Luciene, Fabiana, Ivone, Rosa e todos os pesquisadores, professores e estudantes com os quais tive o prazer de conviver por algumas semanas, fiquei muito feliz por acompanhar parte da rotina de vocês, vocês são exemplo de dedicação e respeito. Mesmo em pouco tempo, já tenho um carinho imenso por vocês.

Aos amigos queridos...

Luísa, obrigada pelas madrugadas de apresentação de slides com jantares no “porquinho”. Jasmin, companhia internacional e mais que especial, Marcella e Lucas, casal favorito (rs), obrigada por fazerem parte dos momentos de lazer e de descontração desse período da minha vida! Marcella Terra, obrigada pelo incentivo... Somos exemplos na academia, somos dessas! Taísa Nascimento, minha amiguinha querida, obrigada pela força e pelo carinho com nossos bebês... Sem você, boa parte desse trabalho não seria possível... O Théozinho agradece a companhia enquanto a mamãe viajava!

Obrigada aos meus familiares, tios, tias, primos, primas, minha avó Letinha e às amigas do vôlei de João Monlevade, pessoas queridas que sempre estiveram presentes em minha vida.

“Rebeldia é orgulho impondo cegueira ao coração. Não há progresso sem esforço, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício, como não existe tranquilidade sem paciência.”

Emmanuel por Chico Xavier

RESUMO

Castro BBA. Efeito da Quitosana-Fe(III) reticulada sobre a calcificação vascular em um modelo de uremia [Dissertação]. Juiz de Fora: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015.

Introdução: A Doença Renal Crônica (DRC) provoca alterações nas concentrações de fósforo, cálcio, vitamina D e paratormônio. A Quitosana Fe(III) reticulada (QST-Fe(III)R) é um quelante de fósforo capaz de reduzir a hiperfosfatemia, principal indutora da calcificação vascular (CV) na DRC. Este polímero derivado da quitina mostrou ação quelante sobre o fósforo *in vitro* e *in vivo* em animais não urêmicos.

Objetivo: Avaliar a ação quelante de fósforo da QST-Fe(III)R e seu efeito sobre a calcificação vascular em ratos com uremia induzida por adenina. **Métodos:** Ratos normais e urêmicos induzidos por dieta rica em fósforo (1%) e suplementada com adenina (0,75% - 4 semanas e 0,10% - 3 semanas) foram divididos em 4 grupos e tratados diariamente com água destilada (10ml/Kg/dia); 30mg/Kg/dia de QTS-Fe(III)R; 500mg/Kg/dia de CaCO₃ e 500mg/Kg/dia de Cloridrato de sevelamer (Cl-Sev) durante 4 semanas. Foram mensurados creatinina (Cr), fósforo (P) e cálcio sérico (Ca), fosfatase alcalina (FA), PTH e FGF23, ao final da 4^a e 7^a semanas de experimento. O conteúdo de Ca foi quantificado em fragmentos da aorta abdominal e expresso em mg/g de aorta. Alterações da morfologia vascular foram avaliadas de forma semi-quantitativa no arco da aorta pela coloração de von Kossa. Utilizamos anticorpos específicos para identificação da expressão da angiotensina II (Angioll) e alfa-actina do músculo liso (α -actina) pela técnica de imuno-histoquímica, em fragmentos do arco da aorta. A avaliação morfológica foi realizada apenas na 7^a

semana. **Resultados:** Nos grupos urêmicos observamos redução da função renal com pico de creatinina na quarta semana. Os tratamentos não alteraram a progressão da doença. O grupo DRC apresentou nível de fósforo 35% mais elevado comparado ao grupo controle. Todos os tratamentos reduziram aproximadamente 20% do fósforo sérico, além de reduzirem a fração excretada de fósforo (redução de 20% a 30%). Os tratamentos com QTS-Fe(III)R e CaCO₃ foram eficientes em reduzir o PTH e a FA dos animais urêmicos. Acredita-se que o tratamento com Cl-Sev não tenha sido eficiente devido à intercorrências metodológicas de dificuldade de administração da droga. O grupo DRC apresentou conteúdo de cálcio na aorta 80% maior do que o grupo controle e a QTS-Fe(III)R reduziu o conteúdo de cálcio na aorta, apresentando uma média mais baixa que todos os outros tratamentos. Em comparação com o grupo controle, a QTS-Fe(III)R reduziu a expressão de Angioll na camada íntima da aorta. A utilização dos tratamentos não apresentou benefícios sobre a integridade da camada média quando avaliamos a expressão de α -actina.

Conclusões: O modelo experimental promoveu perda importante e sustentada de função renal. A QTS-Fe(III)r apresentou eficiência quelante semelhante aos demais já utilizados na prática clínica e reduziu o conteúdo de cálcio na aorta.

Palavras-chave: doença renal crônica, distúrbio mineral ósseo, calcificação vascular, hiperfosfatemia, hiperparatireoidismo secundário.

ABSTRACT

Castro BBA. Effect of Cross-linked Iron(III) Chitosan on vascular calcification in a model of uremia [Dissertation]. Juiz de Fora: School of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, 2015.

Introduction: Chronic Kidney Disease (CKD) causes changes in the concentrations of phosphorus, calcium, vitamin D and parathyroid hormone. Cross-linked Iron(III) Chitosan (QST-Fe(III)R) is a phosphorus binder, with properties of reducing the hyperphosphatemia, the main inducer of vascular calcification (VC) in CKD. This polymer derived from chitin showed chelating action on phosphorus *in vitro* and *in vivo*. **Objective:** To evaluate the phosphorus chelating action of QST-Fe(III)R and its effect on VC in adenine-induced uremic rats. **Methods:** Normal and uremic rats, induced by adenine feeding (0.75% - 4 weeks and 0.10% - 3 weeks) and phosphorous 1%, were divided into 4 groups and treated daily with distilled water (10ml/kg/day); QST-Fe(III)R 30mg/kg/day; CaCO₃ 500mg/kg/day and sevelamer hydrochloride (Cl-Sev) 500mg/kg/day, for 4 weeks. Biochemical parameters were measured at the fourth and seventh week: creatinine (Cr), phosphorus (P) and serum calcium (Ca), alkaline phosphatase (FA), PTH and FGF23. The Ca content of the abdominal aortic fragments was quantified and expressed as mg/g of aortic tissue. We evaluated vascular changes in the aortic arch and calcium deposition. Specific antibodies used to identify the expression of angiotensin II (AngiII) and alpha-smooth muscle actin (α -actin) by immunohistochemical technique, in fragments of abdominal aorta at seventh week. **Results:** In uremic groups, we observed reduced kidney function and a maximum creatinine in the fourth week. The treatments did not

alter CKD progression. The CKD group showed 35% higher phosphorus, compared to the control group. All treatments reduced approximately in 20% the serum phosphorus, and reduced the FeP (reduction of 20% to 30%). Treatments with QTS-Fe(III)R and CaCO₃ were effective in reducing PTH and FA of uremic rats. We believe that treatment with Cl-Sev has not been effective due to methodological problems during drug administration. The CKD group presented aortic calcium content 80% higher than the control group and the QTS-Fe(III)R reduced the calcium content in the aorta, more than all other treatments. Compared to the control group, the QTS-Fe(III)R promotes the reduction expression of AngiII in aortic intima. The treatments did not show benefits over the media layer integrity when evaluating the α -actin expression. **Conclusions:** The experimental model showed important and sustained loss of renal function. The QTS-Fe(III)R showed efficiency similar to others phosphorus binders already used in clinical practice and reduced the calcium content in the aorta.

Keywords: bone mineral disorder, chronic kidney disease, hyperphosphatemia, secondary hyperparathyroidism, vascular calcification.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Angio	–	Angiotensina
Angiol	–	Angiotensina I
Angioll	–	Angiotensina II
BMP	–	Proteína Morfogenética Óssea
CAM	–	Moléculas de Adesão Celular
CBR	–	Centro de Biologia da Reprodução
Clcr	–	Depuração da Creatinina
Cl-Sev	–	Cloridrato de Sevelamer
Cr	–	Creatinina
CV	–	Calcificação Vascular
DMO	–	Distúrbio Mineral Ósseo
DRC	–	Doença Renal Crônica
ECA	–	Enzima Conversora de Angiotensina
FA	–	Fosfatase alcalina
FeP	–	Fração Excretada de Fósforo
FGF-23	–	Fator de Crescimento de Fibroblasto 23
HPS	–	Hiperparatireoidismo Secundário
IL-6	–	Interleucina-6
K/DOQI	–	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
MCP-1	–	Proteína de Monócitos 1
MGP	–	Proteína de Matriz Gla
MMPs	–	Metaloproteinases de Matriz
NaPis	–	Co-transportadores de sódio dependente

NKF	–	National Kidney Foundation
OPG	–	Osteoprotegerina
PFA	–	Ácido Fosfonofórmico
Pit-1	–	Co-transportador NaPi tipo III
PPi	–	Pirofosfato
PTH	–	Paratormônio
QTS	–	Quitosana
QTS-Fe(III)	–	Quitosana Ferro III
QTS-Fe(III)R	–	Quitosana Ferro III Reticulada
RANKL	–	Receptor Ativador do Ligante do Fator Nuclear kappa-β
RFG	–	Ritmo de Filtração Glomerular
SBN	–	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SRA	–	Sistema Renina Angiotensina
SRAA	–	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TGF-β	–	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF	–	Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	–	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRS	–	Terapia Renal Substitutiva
UFJF	–	Universidade Federal de Juiz de Fora
UNIVALE	–	Universidade Federal do Vale do Itajaí
VCAM-1	–	Moléculas de Adesão Celular Vascular-1
α-actina	–	Alfa-actina do Músculo Liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos reguladores da homeostase do fósforo	27
Figura 2 – Organização do vaso	29
Figura 3 – Mecanismo geral da CV	33
Figura 4 – Quelante de fósforo	39
Figura 5 – Polímero QTS	44
Figura 6 – Monômero da QTS-Fe(III)	45
Figura 7 – Desenho experimental	54
Figura 8 – Coloração de Von Kossa para avaliação semi-quantitativa	63
Figura 9 – Avaliação da expressão de Angioll	66
Figura 10 – Avaliação semi-quantitativa da expressão de alfa-actina	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) E DISTÚRBO MINERAL ÓSSEO (DMO)	20
2.2. HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO (HPS)	21
2.2.1. Hiperfosfatemia	23
2.2.2. Fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF-23)	24
2.3. CALCIFICAÇÃO VASCULAR (CV)	28
2.3.1. Mecanismos gerais da calcificação vascular (CV)	30
<i>Transformação fenotípica dos vasos</i>	30
<i>Processos inflamatórios</i>	33
<i>Perda de inibidores de calcificação</i>	37
2.5. QUELANTES DE FÓSFORO	38
2.5.1. Hidróxido de alumínio	39
2.5.2. Sais de magnésio	40
2.5.3. Carbonato de cálcio (CaCO ₃)	40
2.5.4. Carbonato de lantânio	41
2.5.5. Cloridrato de sevelamer (Cl-Sev)	42
2.5.6. Quitosana Ferro (III) – Reticulada (QTS-Fe(III)R)	43
2.6. MODELO EXPERIMENTAL	45
3. HIPÓTESE DO ESTUDO	48
4. OBJETIVOS	49
4.1. OBJETIVO GERAL	49

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
5. MATERIAL E MÉTODOS	51
5.1. ANIMAIS	51
5.2. MODELO EXPERIMENTAL DE DRC	52
5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	53
5.4. TRATAMENTO COM QUELANTES DE FÓSFORO	55
5.4.1. QTS-Fe(III)R	56
5.4.2. CaCO ₃	56
5.4.3. Cl-Sev.....	57
5.5. PARÂMETROS AVALIADOS	57
5.5.1. Pesos	57
5.5.2. Avaliações no soro e urina	57
5.5.3. Função renal	58
5.5.4. Eficiência quelante	59
5.5.5. Densidade óssea	59
5.5.6. Calcificação vascular (CV)	60
5.5.6.1. Conteúdo de cálcio na aorta	60
5.5.6.2. Avaliação da parede das artérias	61
5.5.6.2.1. Alterações vasculares e depósito de cálcio	61
5.5.6.3. Imuno-histoquímica	63
5.5.6.3.1. Quantificação da expressão de Angioll e α -actina	65
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
6. RESULTADOS	68
7. CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS	123

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais consequências da doença renal crônica (DRC), e de mais difícil tratamento, é o distúrbio mineral ósseo (DMO), um transtorno definido como a interação de anomalias minerais e hormonais, anormalidades ósseas seguidas ou não de calcificação vascular (CV) (MOE et al., 2011). A CV é uma importante comorbidade em pacientes com DRC, está intimamente relacionada aos elevados níveis de fósforo sérico que vêm sendo associados ao aumento da mortalidade (SARNAK, 2003; KESTENBAUM et al., 2005; BELLASI et al., 2011). A retenção de fósforo ocorre sistematicamente em pacientes já na pré-diálise, quando a hiperfosfatemia se associa com a perda da função renal, formação de lesão aterosclerótica acelerada e aumento do risco cardiovascular, mas naqueles em terapia renal substitutiva (TRS) a retenção é mais importante (VOORMOLEN et al., 2007; NAKANO et al., 2010; KOVESDY, ANDERSON, KALANTAR-ZADEH, 2010, CARAVACA et al., 2011).

A perda da função renal associada à hiperfosfatemia pode favorecer o desenvolvimento de uma série de distúrbios metabólicos, principalmente do hiperparatireoidismo secundário (HPS) podendo resultar em alterações cardiovasculares (TONELLI et al., 2005). Para conter a evolução do HPS são utilizados dois recursos: a reposição de vitamina D (tratamentos com análogos da vitamina D) e a redução da sobrecarga de fósforo (restrição dietética e uso de quelantes de fósforo) (MITTMAN et al., 2010).

As opções de controle da hiperfosfatemia se resumem à restrição alimentar de fósforo, que na maioria das vezes não é eficiente. Compostos com a capacidade

de quelar o fósforo da dieta são associados à restrição dietética, sobretudo em pacientes em tratamento conservador. E finalmente dispomos da remoção pela diálise na tentativa de reduzir o fósforo sérico e restaurar a homeostase deste íon (K/DOQI, 2002; KDIGO, 2009; CARVALHO et al., 2012).

A evolução das intervenções terapêuticas se mostra de extrema importância para a melhoria da qualidade de vida e aumento da sobrevida desses pacientes (ZOCCALI, 2006). Drogas como hidróxido de alumínio e carbonato de lantânio são capazes de adsorver o fósforo do trato intestinal e reduzir sua entrada no líquido extracelular, porém, podem ser inviáveis por fatores que envolvem toxicidade dos metais presentes em suas fórmulas (PIERIDES et al., 1980, HERGESELL; RITZ, 1999, CAMPBELL, 2002).

Outros quelantes não tóxicos e com a capacidade de reduzir o fósforo sérico têm sido utilizados. Os compostos a base de cálcio: carbonato de cálcio (CaCO_3) e acetato de cálcio ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) apesar de serem baratos e se mostrarem eficazes no controle da hiperfosfatemia, em altas doses, podem agravar o quadro de calcificação dos vasos e tecidos moles (PHAN et al., 2008; HILL et al., 2013). A sobrecarga de cálcio decorrente do uso desses compostos associa-se com a deposição do mesmo no tecido cardíaco e vascular, aumentando os índices de mortalidade entre os pacientes com DRC por doenças cardiovasculares (EKNOYAN et al., 2004; MOE et al., 2009; CHUE, 2012).

Formulações mais recentes possuem o sevelamer como princípio ativo, um ligante polimérico de fósforo insolúvel em água. O principal deles utilizado no Brasil é o cloridrato de sevelamer (Cl-Sev), que apesar de se mostrar eficaz no tratamento da hiperfosfatemia têm seu uso restrito principalmente devido ao seu alto custo (LOCATELLI et al., 2002; SESSO; FERRAZ, 2003; DE SANTO et al., 2006).

O potencial quelante, a baixa toxicidade e a possibilidade de reduzir os riscos de calcificação têm sido explorados na tentativa de desenvolver novas drogas que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DRC (LOGHMAN-ADHAM, 2003). Novas formulações vêm utilizando compostos a base de ferro com potencial quelante de fósforo e livres de cálcio (PHAN, et al. 2013; IIDA et al., 2013; WILHELM et al., 2014)

Estudos anteriores demonstraram a capacidade da Quitosana Ferro(III) (QTS-Fe(III)) como quelante oral de fósforo e encontraram resultados satisfatórios nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos que comprovaram a eficácia deste quelante de fósforo *in vivo* não avaliaram este potencial em modelos de uremia e também não demonstraram seu efeito sobre a CV (BAXTER et al., 2000; BÜRGER *et al.*, 2001; SCHONINGER et al., 2010). Sendo assim, avaliaremos a ação da Quitosana Ferro(III) Reticulada (QTS-Fe(III)R) em um modelo de uremia e seu efeito sobre a calcificação dos vasos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) E DISTÚRPIO MINERAL ÓSSEO (DMO)

A DRC, definida pela National Kidney Foundation (NKF), em seu documento *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI, 2002)*, consiste na lesão renal, associada ou não a perda progressiva e irreversível da função dos rins, que se mantém por pelo menos três meses. Baseada nesta definição foi proposta uma classificação das categorias da doença, onde na fase mais avançada (categoria V), os rins não conseguem mais manter a normalidade do meio interno do indivíduo (LEVEY et al., 2003; KDIGO, 2009; LEVEY; CORESH, 2012). É considerado um processo irreversível que evolui para seu estágio terminal, no qual o paciente dependerá ao longo da vida de TRS, tais como hemodiálise, diálise peritoneal ou o transplante renal (REMUZZI; BENIGNI; REMUZZI, 2006; FINK et al., 2012).

A detecção precoce da DRC é um fator primordial para o seu tratamento (KDIGO, 2009). A DRC progride e pode levar à hipertensão, anemia, distúrbios do sistema nervoso, doença cardiovascular, desnutrição e doenças ósseas, sendo, portanto uma doença extremamente grave (LEVEY; CORESH, 2012).

Uma das principais consequências da DRC e de mais difícil tratamento é o distúrbio mineral ósseo (DMO), transtorno recentemente definido como a interação de anormalidades bioquímicas de cálcio, fósforo, vitamina D e Paratormônio (PTH), anormalidades ósseas e CV (ASBMR, 2006; MOE et al., 2009; KDIGO, 2009).

Mesmo com a melhora da qualidade do atendimento dialítico observado nos últimos anos, a morbidade e a mortalidade dos pacientes acometidos pela DRC continuam elevadas (ARAUJO et al., 2003; IR et al., 2004; AYODELE; ALEBIOSU, 2010; SESSO et al., 2012; CENSO SBN, 2013). Sabe-se que as complicações cardiovasculares são as principais causas de morte e as consequências do DMO vêm progressivamente sendo associadas a estas complicações nesses pacientes (IR et al., 2004; EKNOYAN et al., 2004; TENTORI et al., 2008). Estudos apontam associação entre a alta mortalidade na DRC e DMO e destacam a correlação inversa entre o enrijecimento vascular e a função renal (BLOCK et al., 2004; TONELLI et al., 2005; ADENEY et al., 2009).

2.2. HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO (HPS)

Uma das principais apresentações clínicas do DMO é o HPS. Estima-se que aproximadamente 50% dos pacientes com DRC em diálise desenvolvem HPS (ARAUJO et al., 2000; KALANTAR-ZADEH et al., 2006). Segundo o Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) em 2011, no Brasil, 35% dos pacientes em diálise apresentavam HPS (SESSO et al., 2012). Caracterizado pelo aumento do PTH, devido à diminuição dos níveis séricos de cálcio e ao aumento do fósforo no sangue, o HPS promove a desmineralização dos ossos causando a perda da estabilidade estrutural do tecido (NEVES et al., 2004; IIDA et al., 2013). Tais alterações, além de refletirem diretamente no sistema ósseo, podem causar a CV (Figura 1) (BLOCK et al., 2004; KDIGO, 2009).

O cálcio é o principal componente ósseo e está depositado sob a forma de cristais juntamente com o fósforo formando a chamada hidroxiapatita (RAZZAQUE, 2012). O cálcio do esqueleto é o responsável pela integridade óssea e funciona como reserva biológica, podendo ser mobilizado rapidamente (RIZZOLI; BONJOUR, 2006). Os rins exercem funções endócrinas relacionadas ao metabolismo do cálcio. A biossíntese da forma ativa da vitamina D (1,25- dihidroxivitamina D) é uma delas (RIELLA, 2003). Nos rins, a 25- hidroxivitamina D (forma inativa) passa pela última hidroxilação e se transforma em 1,25- dihidroxivitamina D (forma ativa). A função da vitamina D é promover a mineralização óssea, aumentando a reabsorção intestinal de cálcio e fósforo redirecionando-os para que sejam depositados nos ossos (VICENTE-RODRIGUEZ et al., 2008). Com a perda de massa renal progressiva na DRC ocorre redução da sua produção e conseqüentemente a taxa de absorção de cálcio no intestino diminui (GUYTON; HALL, 2006). O PTH é então produzido em abundância e promove a liberação de cálcio e fósforo a partir dos ossos, aumentando a reabsorção óssea e a diferenciação de osteoclastos (Figura 1) (ASBMR, 2006; PEACOCK, 2010).

O cálcio no soro também pode ser associado à CV e ao aumento da mortalidade em pacientes com DRC (BLOCK et al., 2004; KESTENBAUM et al., 2005). O uso de vitamina D no intuito de aumentar a absorção de cálcio a partir do intestino pode induzir o depósito do cálcio nos vasos, além do uso crônico de quelantes de fósforo à base de cálcio que podem induzir a CV (BLOCK et al., 2005; BLOCK et al., 2007).

2.2.1. Hiperfosfatemia

Pacientes com DRC em fase avançada apresentam hiperfosfatemia devido à retenção de fósforo, consequência da perda da função renal (EKNOYAN; LEVIN; LEVIN, 2003) A hiperfosfatemia ocorre em maior parte pela diminuição da excreção renal desse íon devido à redução do ritmo de filtração glomerular (RFG), gerando um desequilíbrio entre rins, paratireoide e ossos (TONELLI; PANNU; MANNNS, 2010).

O fósforo inorgânico é um ânion intracelular que desempenha um papel importante nas funções celulares e está envolvido em diversos processos metabólicos, incluindo a transferência e o armazenamento de compostos energéticos como o ATP (SCHUCKER; WARD, 2005). Cerca de 85% do fósforo encontrado no organismo humano está depositado na matriz óssea, e os níveis normais no sangue variam de 3,0 a 4,5 mg/dL (RIELLA, 2003; PENIDO; ALON, 2012). Obtido através da alimentação, o fósforo é mantido em equilíbrio no organismo pela ação dos rins, do intestino e dos ossos (LOGHMAN-ADHAM, 2003; KETTELER, 2011) e sua concentração sérica é dependente tanto da ingestão, filtração, reabsorção renal e trocas dos reservatórios intracelulares e ósseos (TONELLI; PANNU; MANNNS, 2010; BELLASI et al., 2011).

A retenção de fósforo ocorre desde as fases iniciais da DRC, porém, o organismo consegue manter seus níveis séricos normais por meio dos mecanismos compensatórios (ASKAR, 2015). O mecanismo que envolve fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF-23) e Klotho mantém a homeostase do fósforo, aumentando os níveis do FGF-23 que estimula a eliminação do fósforo na urina, reduzindo sua sobrecarga (Figura 1) (CARAVACA et al., 2011; KETTELER, 2011).

Altos níveis de fósforo sérico há décadas vêm sendo associados ao aumento da mortalidade e eventos cardiovasculares em pacientes com DRC (BLOCK et al., 1998; SARNAK, 2003; TENTORI et al., 2008; HOUSTON et al., 2013) e alguns trabalhos associam os altos níveis de fósforo sérico com a CV (GOODMAN et al., 2004; RAGGI et al., 2002; KANBAY et al., 2009; ADENEY et al., 2009).

O aumento do fósforo também estimula a secreção de PTH, acentuando o HPS, também correlacionado com a mortalidade cardiovascular (LUNDGREN et al., 2001; TENTORI et al., 2008). O PTH atua sobre os rins aumentando a produção de vitamina D e diminuindo a reabsorção de fósforo (ASBMR, 2006; TORRES; BRAWERE, 2011; LÓPEZ et al., 2011). Para tentar normalizar os níveis séricos de fósforo, o PTH atua nos néfrons residuais promovendo a fosfatúria até que a função renal seja totalmente comprometida se tornando impossível eliminar todo o fósforo em excesso (SLATOPOLSKY et al., 1966; SLATOPOLSKY et al., 1971) (Figura 1).

2.2.2. Fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF-23)

Um mediador importante no processo de eliminação do excesso de fósforo é o FGF-23 que atua no metabolismo aumentando a excreção urinária desse íon (FERRARI; BONJOUR; RIZZOLI, 2005; OLIVEIRA et al., 2010). O FGF-23 é sintetizado principalmente pelo tecido ósseo e sua produção é induzida em resposta ao aumento do fósforo sérico e da vitamina D (NAKAI, KOMABA, FUKAGAWA, 2010; HOUSTON et al., 2013; SCIALLA; WOLF, 2014). Estudos apontam que o mesmo pode regular a síntese de PTH agindo diretamente sobre as glândulas

paratireoides e também indiretamente, aumentando a fosfatúria (BERNDT; SCHIAVI; KUMAR, 2005) (Figura 1).

O papel do FGF-23 no metabolismo mineral é mediado pela ligação do FGF-23 com seu receptor, o Klotho. A ativação do complexo FGF-23/Klotho no rim aumenta a excreção urinária de fósforo por regulação negativa da expressão e da atividade dos transportadores de fósforo dependentes do sódio (NaPi-2a e NaPi2c) no túbulo proximal (SCIALLA; WOLF, 2014). O mecanismo de ação do FGF-23 é dinâmico, impede que o fósforo seja absorvido e inibe a expressão do gene codificador de vitamina D, resultando no aumento da excreção urinária e diminuição da absorção intestinal do fósforo (NAKAI; KOMABA; FUKAGAWA, 2010).

Quando há perda de função renal, os níveis dos hormônios fosfatúrico e paratireoideiano aumentam mostrando uma correlação inversa com o RFG. Em um estudo clínico foi demonstrado que os níveis de FGF-23 são regulados pelo fósforo ingerido na dieta (FERRARI; BONJOUR; RIZZOLI, 2005). Outros estudos correlacionaram os níveis de FGF-23 com os níveis de fósforo, PTH e creatinina em pacientes com DRC (WEBER et al., 2003; LARSSON et al., 2003; IMANISHI et al., 2004; SHIGEMATSU et al., 2004).

A ação do FGF-23 sobre a calcificação vascular é questionada. Estudos experimentais *in vitro* mostraram que o FGF-23 não contribui para a calcificação de células musculares dos vasos e não contribuem para a absorção intracelular de fósforo (SCIALLA et al., 2013). Outro estudo demonstra que o FGF-23 potencializa a CV em fragmentos de aorta em meio hiperfosfatêmico sem deficiência de Klotho (JIMBO et al., 2013).

O FGF-23 já foi correlacionado com a CV em pacientes em hemodiálise (JEAN et al., 2009; JEAN et al., 2009a) e, um estudo clínico mostrou associação do

FGF-23 com a gravidade da aterosclerose (DESJARDINS et al., 2012). Outro estudo mostrou correlação negativa entre os níveis de FGF-23 e o escore de CV avaliada por tomografia computadorizada em pacientes (CANCELA et al., 2012). Já em camundongos urêmicos houve correlação positiva entre os níveis de FGF-23 e o conteúdo de cálcio na aorta (EL-ABBAD et al., 2009).

A deficiência de Klotho também é uma consequência da DRC e pode promover a doença cardiovascular. O papel do excesso de fósforo na calcificação vascular é baseado em estudos que mostram que a deleção do NaPi-2a normaliza os níveis séricos de fósforo, reduz a calcificação vascular e restaura a deficiência de Klotho (RAZZAQUE, 2009; OHNISHI; RAZZAQUE, 2010).

A associação entre o alto nível de fósforo, FGF-23 e PTH com as causas de mortalidade continua sendo estudada ao longo dos anos e existem fortes indícios de que haja ligação entre o aumento dos níveis séricos de fósforo com a elevada taxa de mortalidade cardiovascular dos pacientes renais crônicos, sejam em diálise ou não, mas, principalmente envolvendo a CV (GANESH et al., 2001; KESTENBAUM et al., 2005; VOORMOLEN et al., 2007; KOVESDY, ANDERSON, KALANTAR-ZADEH, 2010; FOLEY et al., 2009; WATANABE et al., 2010).

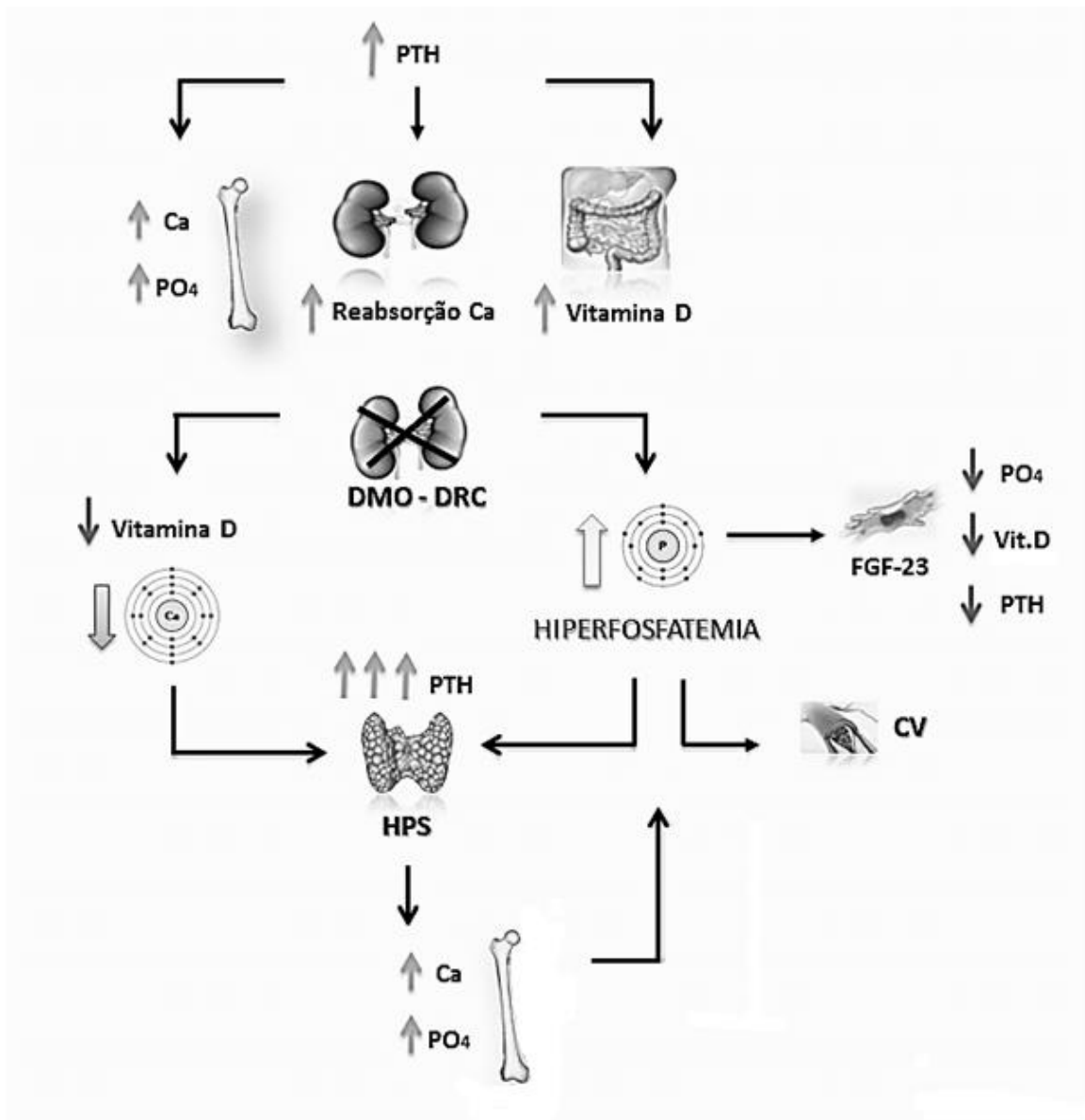


Figura 1. Mecanismos reguladores da homeostase do fósforo. O fósforo é obtido a partir da dieta diária e é absorvido no intestino. Uma vez absorvido, o fósforo inorgânico vai para a corrente sanguínea, onde a sua concentração é regulada por três órgãos: paratireoide, ossos e rins. As paratireoides produzem PTH que no rim estimula a excreção de fósforo e síntese de vitamina D ativa; sendo assim, a redução do fósforo sérico e a síntese de vitamina D inibem diretamente a produção de PTH. No osso, o PTH estimula a produção do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), a remodelação óssea e consequentemente a liberação de fósforo. O aumento do FGF-23 tende a inibir a secreção de PTH, mas o fósforo tende a estimular sua produção de PTH. O FGF-23, nos rins, estimula a excreção urinária de fósforo, inibe a produção de vitamina D e suprime a reabsorção de fósforo; esses mecanismos tentam reduzir os níveis de fósforo no soro. Por outro lado, a produção PTH estimula a produção de vitamina D, que por sua vez estimula a produção de FGF-23 pelas células ósseas. Estas três vias regulatórias mantêm a absorção intestinal e a concentração de fósforo no soro rigidamente controlada.

2.3. CALCIFICAÇÃO VASCULAR (CV)

As doenças cardiovasculares juntamente com o diabetes representam a maior causa de morte no mundo, e no Brasil, 80% da mortalidade de pacientes portadores de doenças crônicas são sucedidas por alterações cardiovasculares (OMS, 2013; BRASIL, 2011; CHEN et al., 2013). A mortalidade cardiovascular de pacientes jovens em diálise se iguala a da população idosa em geral e a calcificação vascular (CV) tem sido identificada como um fator de risco independente para tal mortalidade (FOLEY; PARFREY; SARNAK, 1998; FOLEY et al., 2009; NAKANO et al., 2010; WATANABE et al., 2010).

A CV é uma grave consequência dos distúrbios metabólicos causados pela DRC, frequente em até 90% dos pacientes em hemodiálise, o enrijecimento da artéria está associado ao aumento de riscos cardiovasculares e mortalidade (KDIGO, 2009; CHEN et al., 2013).

Estudos observacionais e experimentais têm mostrado que as concentrações excessivas de fósforo no soro estão associadas ao desenvolvimento da CV e de outros tecidos moles (NEVEN et al., 2009; GIACHELLI, 2009; ADENEY et al., 2009; STAUDE et al., 2013; LAU et al., 2013).

A CV é associada com a mortalidade cardiovascular, incluindo eventos cardíacos isquêmicos (MOE; CHEN, 2008). A patogênese da CV é complexa e envolve precipitação do fósforo e cálcio, atração de fatores locais envolvidos no processo de mineralização e o desbalanço entre ativadores e inibidores da transição fenotípica de células do músculo liso vascular em células com características ósseas (GOLDSMITH et al., 1997; SHANAHAN et al., 2011; ASKAR, 2015).

O tecido vascular é organizado em camadas concêntricas denominadas túnicas (Figura 2) e, a calcificação da túnica média é frequente nas categorias mais avançadas da DRC. Os sinais de CV são frequentemente encontrados nesses pacientes e tais achados agravam ainda mais as doenças cardiovasculares (NEGRI, 2010; CAI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

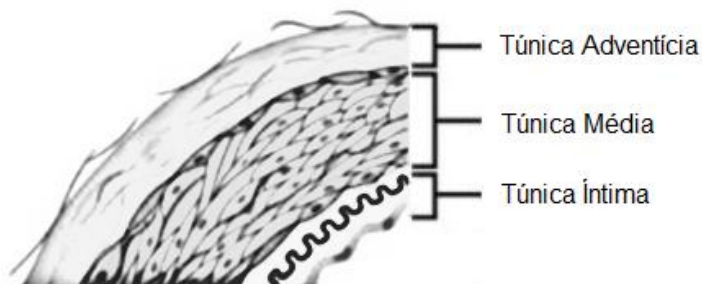


Figura 2. Organização do vaso. A túnica íntima é caracterizada por células endoteliais em contato com o sangue, enquanto a túnica média, geralmente mais espessa, é composta por células musculares lisas sustentadas por matriz extracelular (MEC). Fibras colágenas e elásticas estão presentes na média interligando-a com a íntima e com a camada mais externa: adventícia. A camada adventícia é basicamente formada por tecido conjuntivo.

Previamente, a CV era considerada como uma condição do envelhecimento envolvendo aterosclerose, hipertensão e diabetes ou decorrente somente da interação físico-química entre cálcio e fósforo (SAGE; TINTUT; DEMER, 2010). Atualmente, sabe-se que a CV da DRC é biologicamente regulada por processos ativos do metabolismo humano (SHANAHAN et al., 1999; GUÉRIN et al., 2000; SHANAHAN, 2005) associados também a fatores de risco não tradicionais como a hiperfosfatemia, hiperparatireoidismo secundário, hipervitaminose D ou excesso de administração de sais de cálcio (CHERTOW, et al., 2004; MOE; CHEN, 2008; SAGE; TINTUT; DEMER, 2010). Além de envolver mecanismos específicos, apresenta

aspectos morfológicos distintos que se caracterizam pela presença da transformação fenotípica das células musculares e calcificação da camada média dos vasos (GIACHELLI, 2003; ASKAR, 2015).

2.3.1. Mecanismos gerais da calcificação vascular (CV)

Transformação fenotípica dos vasos

De maneira geral, diversos processos podem estar envolvidos na patogênese da CV e os níveis de fósforo elevados no sangue comprovadamente atuam sobre as células musculares lisas dos vasos (SHAO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Estudos *in vitro* avaliaram a ação do fósforo sobre tais células e demonstram que a deposição de cálcio é aumentada em meio contendo níveis elevados de fósforo (JONO et al., 2000; MUNE et al., 2009). Tais estudos levam a crer que o fósforo elevado pode diretamente promover transição fenotípica das células do músculo liso vascular, sendo um acelerador desse processo (GIACHELLI, 2003; ASKAR, 2015).

As alterações induzidas pelo fósforo, dentro das células do músculo liso dos vasos, incluem aumento da expressão de marcadores osteogênicos (fosfatase alcalina e proteínas ósseas), que constitutivamente não são expressos por estas células, e do RUNX-2, que é considerado atualmente o principal gene de diferenciação de osteoblastos (DUCY et al., 1997). A transformação dessas células tornando-as capazes de fixar os minerais de fósforo de cálcio, parece ser um mecanismo chave em resposta às anormalidades minerais envolvendo excreção

renal e remodelação óssea (KETELLER; GIACHELLI, 2006; CAI et al., 2010; SHOBEIRI et al., 2013).

A camada média é composta por células do músculo liso que se originam de células-tronco mesenquimais assim como os osteoblastos, podendo se transformar em células semelhantes a estas, os osteoblastos *like*, sob a regulação de fatores de crescimento específicos do desenvolvimento normal do osso. As células são diferenciadas pela regulação positiva desses fatores e em seguida secretam proteínas da matriz óssea (CHILLON et al., 2009; SHANAHAN et al., 2011).

Um dos mediadores chave deste processo é o RUNX2, regulador da osteocalcina, osteopontina e do gene que expressa colágeno tipo I (BYON et al., 2008). Animais urêmicos que receberam alto teor de fósforo na dieta apresentaram calcificação medial da artéria, além de apresentarem elevados níveis de FGF-23 e osteopontina altamente correlacionados com a CV (EL-ABBAD et al., 2009; LAU et al., 2013). Tintut et al. (1998) observaram aumento da expressão de fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina em células vasculares calcificadas. Outro fator que comprova que na presença de fósforo elevado as células da musculatura lisa vascular sofrem transformação fenotípica é a redução da expressão de genes comuns a essas células, como por exemplo, o ACTA2 que codifica a proteína alfa-actina do músculo liso (α -actina) (GIACHELLI, 2003). Em um estudo com aortas bovinas, a mineralização das células do músculo liso vascular, em cultura, foi associada com a perda da expressão do ACTA2. Em contrapartida, os genes normalmente encontrados em tecidos mineralizados, fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina foram aumentados nessas células (STEITZ et al., 2001).

O transporte de fósforo para o meio intracelular é mediado pelos co-transportadores de fósforo sódio-dependentes (NaPis) e na células do músculo liso

vascular existe alta expressão do co-transportador NaPi tipo III (Pit-1) (SHIOI; NISHIZAWA, 2009). A supressão do Pit-1 bloqueou a indução de marcadores osteogênicos nestas células (RUNX2), que também reduziram a absorção de fósforo apresentando menores níveis de calcificação (LI, YANG, GIACHELLI, 2006; GIACHELLI, 2009).

Mune et al. (2009) mostraram que não houve calcificação em fragmentos da aorta de ratos Sprague-Dawley em meio hiperfosfatêmico utilizando ácido fosfonofórmico (PFA), um inibidor específico do Pit-1. Além disso, o fósforo elevado estimulou a apoptose nos fragmentos não bloqueados pelo PFA, sugerindo que a apoptose participa do mecanismo de calcificação.

Um estudo ainda mais recente mostrou que a dieta enriquecida com fósforo induz a calcificação vascular em ratos urêmicos, com aumento da expressão do RUNX-2 e do Pit-1 (SETO; HAMADA; TOMINO, 2014). Baseado nestes estudos propõe-se que o fósforo extracelular seja deslocado para o meio intracelular através do Pit-1 e que este mecanismo esteja potencialmente estimulado em presença da hiperfosfatemia da DRC. Grande quantidade de fósforo intracelular sinaliza para o aumento da expressão dos genes osteogênicos (RUNX2) e para a supressão de genes comuns às células lisas do músculo (Figura 3). A implicação dessa remodelação é a secreção de vesículas de matriz, proteínas de ligação com o cálcio (osteocalcina e osteopontina), aumento da matriz extracelular (MEC) rica em colágeno e aumento da produção de fosfatase alcalina (DHORE et al., 2001; LONDON et al., 2002; BYON et al., 2008).

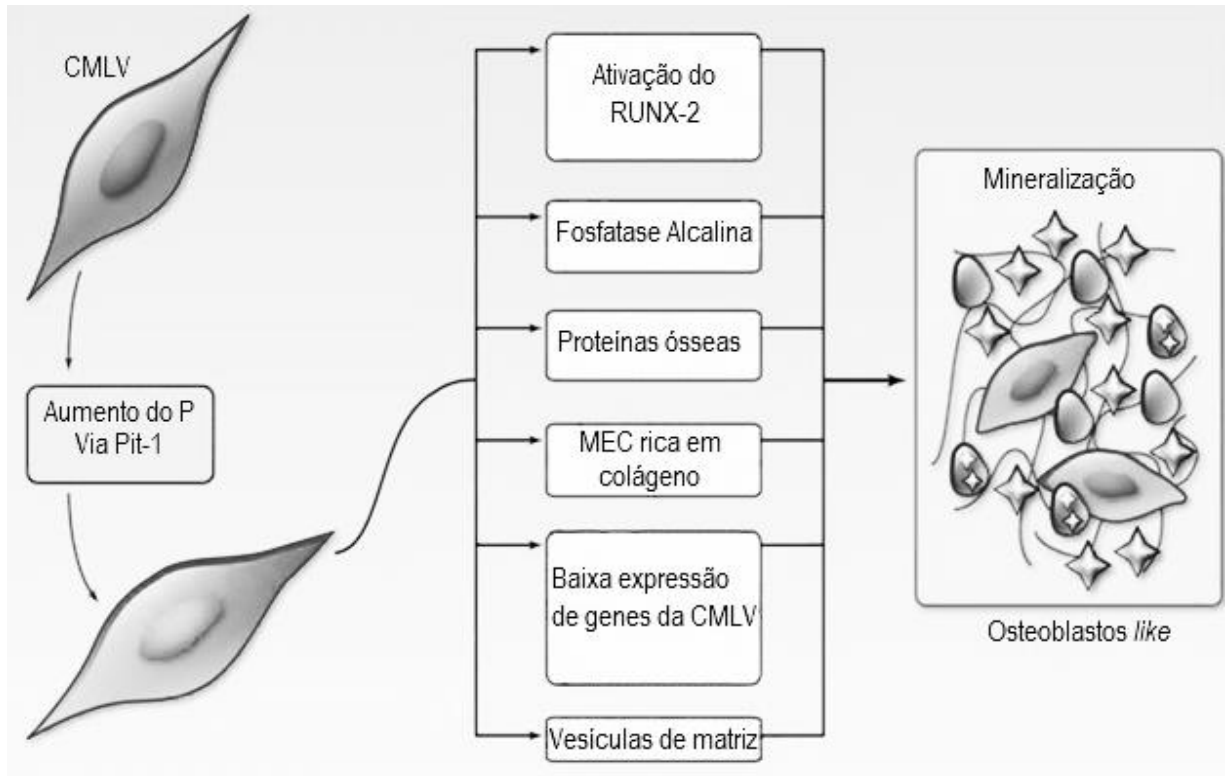


Figura 3. Mecanismo geral da CV. Adaptada de SHANAHAN, C.M. et al. *Circulation Research*. (2011)109:697-711

Processos inflamatórios

O alto teor de fósforo nas células do músculo liso vascular pode induzir a degradação da elastina presente na túnica média. Após ser degradada, a elastina possui alta afinidade com cristais de cálcio resultando na deposição de hidroxiapatita (OLIVEIRA et al., 2013). Em resposta ao processo de degradação, o tecido inicia o processo de reparação mediado por leucócitos e ativação de mediadores inflamatórios (MARCHESI; PARADIS; SCHIFFRIN, 2008; SUZUKI et al., 2003).

A estabilidade da parede vascular é dependente principalmente de colágeno e elastina, e o processo inflamatório induz a formação de colágeno atípico e a redução da quantidade de elastina nos vasos, contribuindo para a rigidez vascular (HOSAKA

et al., 2009). Este evento é resultante da ação da elastase, metaloproteinases de matriz (MMPs) e proteases que dão origem a peptídeos capazes de alterar o sistema de sinalização do fator de crescimento transformador beta (TGF- β).

O TGF- β controla principalmente a proliferação e a diferenciação celular. As alterações causadas pelas MMPs em sua sinalização podem prejudicar a estrutura da MEC das células do músculo liso vascular (ZIEMAN; MELENOVSKY; KASS, 2005; SHANAHAN et al., 2011).

O aumento das MMPs e consequentemente da remodelação da MEC pode ser mediado pelo sistema renina angiotensina (SRA). Este sistema, um dos mais importantes sistemas hormonais, regula a homeostase cardiovascular, renal e das glândulas suprarrenais (FERRARIO; STRAWN, 2006). A clivagem do angiotensinogênio ocorre por meio de reações bioquímicas que envolvem a ação da renina, uma enzima proteolítica ativa, produzida por células justaglomerulares renais. A renina converte o angiotensinogênio em angiotensina I (Angiot) e esta, é clivada em angiotensina II (AngiotII) pela enzima conversora da angiotensina (ECA) (QUINN; WILLIAMS, 1988; NGUYEN et al., 2002; RIELLA, 2003; PACURARI et al., 2014).

A AngiotII regula a produção de aldosterona, ambas com papel fundamental na regulação da pressão arterial, no balanço do sódio (Na⁺), potássio (K) e da água (H₂O) (QUINN; WILLIAMS, 1988; FERRARIO; STRAWN, 2006). Potente vasoconstritor da musculatura lisa dos vasos, a AngiotII atua sob ativação dos receptores AT1 e AT2. O primeiro receptor pode ativar vias de sinalização intracelulares indutoras da produção de mediadores inflamatórios (TADDEI et al., 2002). Já a aldosterona pode mediar mecanismos cardiopatológicos incluindo fibrose e remodelação vascular (QUINN; WILLIAMS, 1988).

Sabidamente, o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é atuante em outros mecanismos além da regulação hemodinâmica, e existem consideráveis contribuições desse sistema sobre a fisiologia e patologia local, independente da hipertensão. O aumento da rigidez arterial é uma dessas patologias (MARCHESI; PARADIS; SCHIFFRIN, 2008; PARK; LAKATTA, 2012).

Sabe-se que o funcionamento irregular do SRAA leva ao desenvolvimento de uma variedade de doenças cardiovasculares e, uma das respostas de alterações patológicas no tecido vascular é a inflamação (SUZUKI et al., 2003; MARCHESI; PARADIS; SCHIFFRIN, 2008).

A resposta inflamatória possui dois aspectos: inflamação e reparação. Primeiramente se inicia uma série complexa de eventos que tentam reconstituir o tecido danificado por meio de respostas de células mesenquimais, incluindo hipertrofia, hiperplasia, a produção da MEC. Em seguida, a lesão inflamatória gera o processo de cicatrização levando à formação de fibroblastos menos especializados. Em geral, o processo inflamatório resulta em alterações vasculares, a liberação de leucócitos e o crescimento celular (SUZUKI et al., 2003).

Estudos recentes abordam sobre a importância da inflamação na patogênese da lesão vascular e sua associação com o aumento da atividade da AngiII. A AngiII possui ação no crescimento celular e, o desenvolvimento de fisiopatologias associadas à sua elevação, provoca alterações estruturais vasculares causadas por modificações na MEC, induzidas pela produção de fatores de crescimento, sobretudo em células do músculo liso vascular (PARK; LAKATTA, 2012; MONTEZANO et al., 2014; PACURARI et al., 2014). A sinalização de monócitos e citocinas inflamatórias pode ser ativada pela AngiII, incluindo o fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α), proteína de monócitos 1 (MCP-1) e interleucina-6 (IL-6) (SUZUKI et al., 2003).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória capaz de regular alguns genes inflamatórios, o estresse oxidativo e as vias de sinalização anti-apoptóticas. O aumento do TNF- α pode levar ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010; PELISEK et al., 2009). No endotélio, o TNF- α induz a expressão de MCP-1; IL-6 e de moléculas de adesão celular (CAM) (RUSSO; LEOPOLD; LOSCALZO, 2002). A inibição do TNF- α tem sido sugerida para melhorar a função do endotélio através do estímulo de regeneração das células endoteliais (KRASINSKI et al., 2001). A inflamação causada pela lesão endotelial provoca uma cascata de sinalização pró-inflamatória e a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). A VCAM-1 é regulada pela Angioll e sua função é recrutar monócitos do sangue para a parede vascular, liberando outras citocinas e quimiocinas no local da lesão. Esse mecanismo pode provocar o desenvolvimento da doença vascular, tal como aterosclerose (PUEYO et al., 2000; NEVES et al., 2005; PACURARI et al., 2014).

A calcificação da camada média dos vasos, resultado da deposição mineral em pacientes com DRC, pode ser encontrada em toda a árvore vascular independente da aterosclerose (SHIOI et al., 2001). Embora sejam patologicamente distintas, existe uma associação entre o mecanismo molecular que regula a CV da íntima e da média, agravando ainda mais os riscos de eventos cardiovasculares (WEXLER et al., 1996; OSAKO et al., 2013).

Alguns estudos descreveram o envolvimento do receptor ativador do ligante do fator nuclear kappa B (RANKL) com a proteína morfogenética óssea (BMP) no desenvolvimento da calcificação da íntima e da média (PANIZO et al., 2009; OSAKO

et al., 2010;) destacando a interferência da Angioll. Os osteoblastos expressam RANKL e osteoprotegerina (OPG) que regulam a ação dos osteoclastos. Segundo Osako et al. (2013), a Angioll pode induzir a CV por via RANKL *in vitro* e *in vivo* e por outro lado, o bloqueio da Angioll inibe significativamente a CV.

Perda de inibidores de calcificação

Alguns estudos propuseram terapias capazes de inibir a calcificação em ratos com insuficiência renal, mas ainda existem incertezas sobre sua eficácia (PASCH, 2008; O'NEILL; HARDCASTLE, 2012). Outro mecanismo que contribui para a mineralização vascular é a perda dos inibidores de CV como: Fetuína-A, Proteína de matriz Gla (MGP), Pirofosfato (PPi) e osteoprotegerina (FREEDMAN et al., 2009; MONTEZANO et al., 2014).

A fetuína-A é uma glicoproteína do sangue e sua ausência promoveu a calcificação generalizada em ratos e sua deficiência em pacientes com DRC é fator de risco para alterações cardiovasculares correlacionadas à mortalidade (WESTENFELDA et al., 2007). A MGP possui alta afinidade de ligação a íons de cálcio e atua como um inibidor da mineralização vascular desempenhando um papel importante na organização do osso. Yao et al. (2013) mostraram que camundongos que não expressavam MGP apresentavam aumento das BMPs, resultando em transição endotelial mesenquimal e no surgimento de células multipotentes susceptíveis à CV. Alguns desses fatores são influenciados pela Angioll, que estimula a expressão da BMP-2 e também inibe a produção de MGP (JIA et al., 2012).

Já o PPI é um importante inibidor fisiológico da formação de hidroxiapatita e consequentemente, inibe potentemente a CV. Uma das funções principais da fosfatase alcalina consiste em hidrolisar o PPI (OLIVEIRA et al., 2013). A osteoprotegerina pertence à superfamília dos receptores TNF (Fator de Necrose Tumoral) e é um regulador negativo da reabsorção óssea inibindo a atividade osteoclástica (ZHOU et al., 2013).

Ainda não existe tratamento direto da calcificação, porém, as medidas preventivas consistem no controle da hiperfosfatemia, dos níveis de cálcio, PTH e vitamina D (RUSSO et al., 2007). Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da CV possibilita a melhor compreensão das propostas terapêuticas e buscam melhorar os desfechos cardiovasculares em pacientes com DRC.

2.5. QUELANTES DE FÓSFORO

Os quelantes de fósforo são compostos que tentam restaurar a homeostase do fósforo, se ligam ao fósforo decorrente da dieta e devem ser ingeridos durante as refeições. Eles impedem que o fósforo seja absorvido e vá pra corrente sanguínea, fazendo com que o mesmo seja eliminando nas fezes (Figura 4) (K/DOQI, 2002; CARVALHO et al., 2012; KDIGO, 2009).

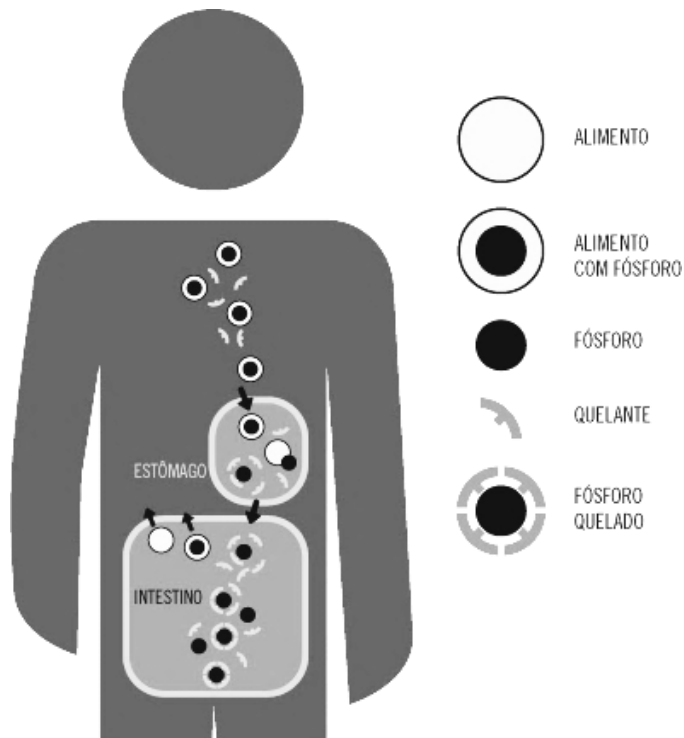


Figura 4. Quelante de fósforo. Esquema representando o alimento ingerido junto ao quelante, a atuação do quelante se ligando ao fósforo no intestino e sua eliminação nas fezes.

2.5.1. Hidróxido de alumínio

Drogas a base de alumínio foram os primeiros a serem utilizados, como é o caso do hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) que é capaz de quelar o fósforo no estômago e intestino (HERGESELL; RITZ, 1999). Evidências comprovaram que o acúmulo de alumínio no organismo pode potencializar processos inflamatórios e oxidativos causando danos teciduais (CAMPBELL, 2002). Na prática clínica, o hidróxido de alumínio se tornou inviável devido à toxicidade do alumínio que era absorvido, e está relacionado ao desenvolvimento de encefalopatias, anemia microcítica, miopatia, acúmulo de alumínio e intoxicação óssea (PIERIDES et al., 1980; HSU; PATEL; YOUNG, 1999).

2.5.2. Sais de magnésio

Os sais de magnésio surgiram como uma alternativa ao uso do $\text{Al}(\text{OH})_3$, isoladamente ou em combinação com o cálcio. Os sais carbonato de magnésio (MgCO_3) e hidróxido de magnésio $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se mostraram eficientes, porém, devido à distúrbios gastrointestinais provocados e à necessidade de ajustes na solução de diálise, estes compostos foram pouco utilizados (SPIEGEL, 2007; TZANAKIS; OREOPOULOS; 2009).

2.5.3. Carbonato de cálcio (CaCO_3)

O CaCO_3 possui eficácia no controle da hiperfosfatemia e é um dos quelantes mais utilizados (HILL et al., 2013). No entanto, seu uso prolongado pode desencadear sobrecarga de cálcio, causando intolerância aos pacientes que podem apresentar constipação ao longo do tratamento e aumento da calcemia (SPIEGEL; BRANDY, 2012). Este último aspecto, principalmente em pacientes em diálise comprovadamente acelera o processo de calcificação de tecidos moles, principalmente dos tecidos vasculares (PHAN et al., 2008; MOE et al., 2009).

Em ensaios clínicos com pacientes crônicos em hemodiálise, a administração de quelantes à base de cálcio foi associada com a progressão acentuada da calcificação da aorta e com a mortalidade (BLOCK et al., 2005; BLOCK et al., 2007; DI IORIO, BELLASI, RUSSO, 2012). Além desses efeitos, em situações em que o

sulfato ferroso é administrado aos pacientes, os sais de cálcio (carbonato e acetato) reduzem a absorção de ferro no trato gastrointestinal (PRUCHNICKI et al., 2002).

2.5.4. Carbonato de lantânio

O carbonato de lantânio ($\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$) é um quelante potente capaz de formar um complexo insolúvel com o fósforo. Além disso, tem potencial para reduzir o número de comprimidos prescritos e aumentar a aderência do paciente em comparação com outros quelantes de fósforo (SPRAGUE et al., 2009; DAMMENT, 2011). No entanto, o lantânio é um metal raro e normalmente não é encontrado em abundância no organismo do ser humano. Estudos mostraram que a utilização crônica do carbonato de lantânio pode resultar em acúmulo deste metal no fígado, pulmões e rins (LOGHMAN-ADAHAM, 2003; SLATOPOLSKY; LIAPIS; FINCH, 2005).

Em um estudo experimental foi relatado que a administração do ($\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$) poderia reduzir o desenvolvimento de calcificação das artérias de ratos com DRC induzida por adenina, mas não foi capaz de atenuar a progressão do HPS (NEVEN et al., 2009; CICERI et al., 2013).

2.5.5. Cloridrato de sevelamer (Cl-Sev)

Dentre as tentativas de controlar os níveis de fósforo no soro de pacientes renais crônicos, o Cl-Sev é atualmente o principal medicamento disponível no mercado (SESSO; FERRAZ, 2003; NEGRI, 2010; RAGGI et al., 2010; SPAIA, 2011). Por ser um medicamento eficaz no tratamento da hiperfosfatemia e livre de cálcio, atenua os riscos de CV (SESSO; FERRAZ, 2003). Além disso, estudos mostraram a redução do colesterol total e LDL com uso do Cl-Sev, porém, sugeriu-se a possibilidade de redução de vitaminas, micronutrientes e o sequestro de ácidos biliares liberando moléculas de ácido clorídrico no intestino (HERGESELL; RITZ, 1999; BREZINA; QUNIBI; NOLAN, 2004).

O Cl-Sev é uma resina capaz de quelar o fósforo e liberar cloreto no intestino (CHERTOW; BURKE; RAGGI, 2002). Uma molécula de cloridrato é liberada por cada molécula de fosfato ligado no intestino, entretanto, pode haver trocas aniônicas entre cloridrato e bicarbonato levando à perda de bicarbonato nas fezes. Tal perda contribui para o agravamento da acidose metabólica que é comum em pacientes na pré-diálise (BREZINA; QUNIBI; NOLAN, 2004; DE SANTO et al., 2006). Ainda assim, o Cl-Sev é o quelante de fósforo, livre de cálcio, que apresenta melhores resultados em pacientes renais crônicos, tendo seu uso limitado principalmente pelo custo elevado (LOCATELLI et al., 2002; QUERFELD, 2005).

2.5.6. Quitosana Ferro(III) Reticulada (QTS-Fe(III)R)

A quitosana (QTS), também conhecida como quitina desacetilada e poli-d-glucosamina, é um polissacarídeo composto de copolímeros de glucosamina e N-acetilglucosamina (Figura 5) (ANDERSON; NICOLOSI; BORZELLECA, 2005). Derivada da desacetilação parcial da quitina a partir de conchas de crustáceos, a QTS apresenta um par de elétrons livres no nitrogênio servindo como suporte aos compostos metálicos adsorventes de fosfato (ILLUM, 1998; JONES; MAWHINNEY, 2006).

Na literatura, foi relatada a possibilidade de sua utilização como agente redutor do colesterol em estudos com ratos que receberam a droga incluída na dieta (SUGANO et al., 1978; SUGANO et al., 1980; SUGANO et al., 1988). Embora não tenha sido totalmente compreendida, a capacidade de redução do colesterol pela QTS parece estar relacionada às cargas positivas deste composto, que resultam em sua ligação com os ácidos graxos livres (liberados a partir da gordura consumida) e sais (componentes da bile), o que interrompe a absorção de lipídeos no intestino (ILLUM, 1998).

A modificação da estrutura química da QTS já havia sido relatada por Shimizu et al. (2008) que sintetizaram novos derivados de QTS complexados à íons metálicos capazes de quelar o fósforo. Outros estudos mostraram que os compostos férricos seriam capazes de formar complexos com o fósforo no intestino (HSU; PATEL; YOUNG, 1999; MCINTYRE et al., 2009). Sais de ferro como o cloreto férrico e citrato férrico foram desenvolvidos e testados em ratos urêmicos como possíveis quelantes de fósforo e apresentaram resultados satisfatórios (HSU; PATEL; YOUNG,

1999). Atualmente quelante a base de ferro foram descritos como capazes de prevenir as complicações do hiperparatiroidismo secundário e da CV (IIDA et al., 2013, PHAN et al., 2013).

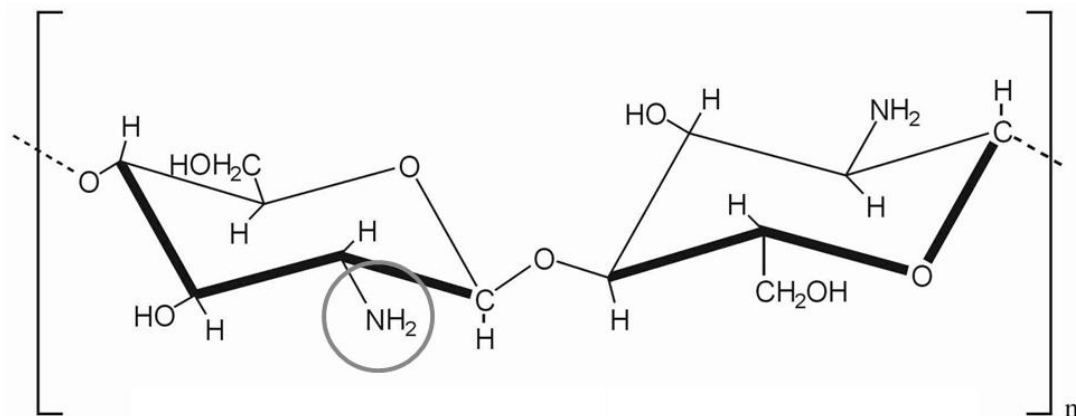


Figura 5. Polímero QTS. Destaque para a terminação NH_2 onde houve modificação para síntese da QTS-Fe(III)R.

O papel da QTS-Fe(III) (Figura 6) como agente quelante também foi descrito e essa capacidade vem sendo investigada ao longo dos anos (BAXTER et al., 2000; BÜRGER et al., 2001; SHIMIZU, 2008; VALCARENGHI, 2006; SCHONINGER et al., 2010).

Estudos experimentais mostraram que a QTS-Fe(III) reticulada com glutaraldeído (QTS-Fe(III)R) é capaz de baixar os níveis de fósforo no soro devido a sua capacidade de reduzir a absorção intestinal do mesmo, em condições normais (BAXTER et al., 2000). Além disso, a utilização QTS-Fe(III)R manteve normais as concentrações de cálcio e ferro séricos em ratos com hiperfosfatemia induzida pela adição de fósforo na água (BÜRGER et al., 2001).

Em uma avaliação toxicológica crônica da administração da QTS-Fe(III)R em ratos, não foi relatado nenhum sinal de toxicidade ou interferência no comportamento dos animais e o tratamento não interferiu na função renal dos mesmos (VALCARENGHI, 2006).

A QTS-Fe(III)R diminuiu a absorção intestinal de fósforo em ratos com diabetes induzida por aloxano, sem sinais bem definidos de desenvolvimento de insuficiência renal (SCHONINGER et al., 2010). Não há estudos, porém sobre uso da QTS-Fe(III)R em animais com hiperfosfatemia e DRC.

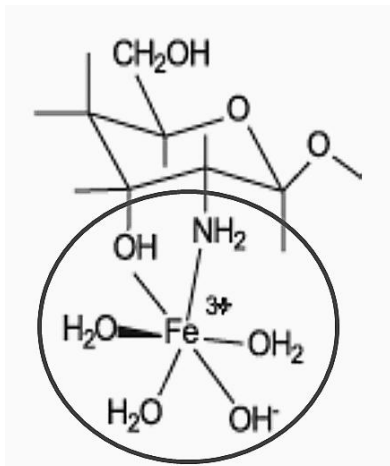


Figura 6. Monômero da QTS-Fe(III).

2.6. MODELO EXPERIMENTAL

O modelo de nefrite túbulo intersticial causada pela adenina vem sendo o mais utilizado quando se objetiva estudar o DMO, pois o mesmo não requer cirurgia e os animais apresentam perda progressiva da função renal, hiperfosfatemia e

depósito de cálcio nos vasos (PASCH et al., 2008; NEVEN et al., 2009; IIDA et al., 2013; DE SCHUTTER et al., 2013). O modelo foi proposto por Yokozawa et al. (1986) com o objetivo de avaliar o metabolismo do ácido úrico e, posteriormente, avaliar o efeito da adenina sobre a função e histologia renal. A suplementação com 0,75% de adenina na dieta de ratos por um período de 30 dias mostrou perda progressiva da função renal, depósito de cristais na luz tubular e no interstício, necrose do epitélio tubular e fibrose intersticial (YOKOZAWA et al., 1986).

Estudos posteriores utilizando a suplementação com adenina (0,75%) por um período de 4 semanas confirmaram tais achados, evidenciados pelo aumento das concentrações de creatinina e fósforo séricos, presença de anemia, aumento das concentrações de PTH e calcificações na artéria aorta e coronárias (PASCH et al., 2008; NEVEN et al., 2009). Price et al. (2006), em um estudo semelhante já haviam demonstrado calcificação da túnica média da aorta dos ratos utilizados em seu estudo.

Estudos recentes analisaram os determinantes da CV em ratos com DRC induzida pela dieta com 0,75% de adenina por 4 semanas, incluindo atividade óssea e o papel de quelantes de fósforo (IIDA et al., 2013; DE SCHUTTER et al., 2013).

Em uma avaliação dos efeitos quelantes de fósforo em ratos com DRC, foi utilizada ração com 0,75% de adenina por duas semanas e ração com 0,50% de adenina nas duas semanas seguintes. Este estudo não avaliou a CV desses animais, porém, demonstrou redução dos níveis de FGF-23, PTH e fósforo após o tratamento (NAGANO et al., 2006).

Outro aspecto importante deste modelo é que, diferentemente de outros modelos, não requer procedimento cirúrgico, o que leva a alta taxa de sobrevida ao final do estudo, e principalmente, porque os animais apresentam perda progressiva

e gradual da função renal, semelhante à maioria das causas de DRC (PASCH et al., 2008; NEVEN et al., 2009). A principal desvantagem é a perda de peso dos ratos, observa-se que os animais que comem ração contendo adenina têm menor ingestão de ração e reduzem excessivamente de peso (PASCH et al., 2008; NGUY, 2012).

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

O presente estudo testou a hipótese de que a intervenção terapêutica com QTS-Fe(III)R apresenta efeito quelante de fósforo em ratos Wistar com DRC induzida pela adição de adenina na dieta. E ainda, de que o tratamento com a QTS-Fe(III)R é capaz de amenizar a CV destes animais, quando comparada aos animais tratados com CaCO_3 e Cl-Sev.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito quelante de fósforo da QTS-Fe(III)R sobre a CV de um modelo animal de uremia induzida por adição de adenina à dieta e, comparar aos efeitos dos quelantes CaCO_3 e Cl-Sev.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Acompanhar a progressão da DRC e avaliar os marcadores do DMO: fósforo, fosfatúria, fosfatase alcalina, cálcio, PTH, FGF-23 e densidade óssea no modelo de adenina.
2. Comparar o conteúdo de cálcio presente na aorta abdominal de animais com DRC tratados e não tratados.
3. Avaliar as alterações vasculares presentes no arco da aorta dos animais com DRC tratados e não tratados.

4. Avaliar a presença de cálcio depositado no tecido do arco da aorta de animais com DRC tratados e não tratados.
5. Comparar a presença de Angioll e α -actina no tecido do arco da aorta de animais com DRC tratados e não tratados.
6. Avaliar os efeitos dos quelantes de fósforo: QTS-Fe(III)R, CaCO_3 e Cl-Sev sobre os marcadores do DMO na DRC: fósforo, fosfatúria, fosfatase alcalina, cálcio, PTH, FGF-23.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

Foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com idade de 8 a 12 semanas, pesando de 200g a 300g. Os animais foram obtidos a partir das colônias do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde os experimentos foram conduzidos. Após o desmame, os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha e alojados em estantes climatizadas (Alesco Indústria e comércio Ltda., Monte Mor, Brasil). A água e a ração foram oferecidas *ad libitum* e a temperatura mantida ao redor de 22°C, com iluminação mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – controladas automaticamente para acenderem às 6h e apagarem às 18h.

Os procedimentos necessários para a realização do trabalho estiveram de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme protocolo nº 031/2013.

5.2. MODELO EXPERIMENTAL DE DRC

Optou-se pelo modelo de DRC induzido por adenina devido às características já citadas e principalmente por apresentarem calcificação dos vasos, ideal para a avaliação deste estudo. Divergindo do modelo original, no qual se relata a indução de DRC com o emprego de dieta com adenina a 0,75% durante quatro semanas, foram acrescentadas mais três semanas de dieta suplementada com adenina a 0,1%. O objetivo seria não só induzir a lesão renal, mas também de manter o animal com grave disfunção renal durante o período do estudo, reproduzindo melhor o DMO e suas consequências vasculares. Esta modificação foi motivada por um estudo piloto, realizado por este grupo de pesquisa, que encontrou recuperação importante da função renal três semanas após a suspensão da dieta com 0,75% de adenina oferecida durante três semanas.

Portanto, neste estudo, os animais dos grupos com DRC receberam ração suplementada com adenina a 0,75% durante quatro semanas e suplementada com adenina a 0,1% por mais três semanas (Figura 7). A ração foi produzida em um único lote (Pragsoluções S.A., Jaú, Brasil).

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para os objetivos descritos, os animais foram randomicamente divididos em 5 grupos (Figura 7):

CONTROLE (n=24): Os ratos receberam ração padrão e nenhum tipo de tratamento, somente 1mL de água destilada/150g de peso a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais ao final da terceira, quarta e sétima semanas.

DRC (n=24): Os ratos foram submetidos à indução da DRC conforme foi descrito e não foram tratados, somente receberam 1mL/100g de água destilada a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais ao final da terceira, quarta e sétima semanas.

DRC-QTS (n=8): Neste grupo os animais foram submetidos à indução da DRC conforme foi descrito e foram tratados com QTS-Fe(III)R a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais ao final de sete semanas.

DRC-CaCO₃ (n=8): Neste grupo os animais foram submetidos à indução da DRC conforme descrito e foram tratados com CaCO₃ a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais ao final de sete semanas.

DRC-SEV(n=8): Neste grupo os animais foram submetidos à indução da DRC conforme descrito e foram tratados com CI-Sev a partir da terceira semana do estudo. Foram realizadas eutanásias de 8 animais ao final de sete semanas.

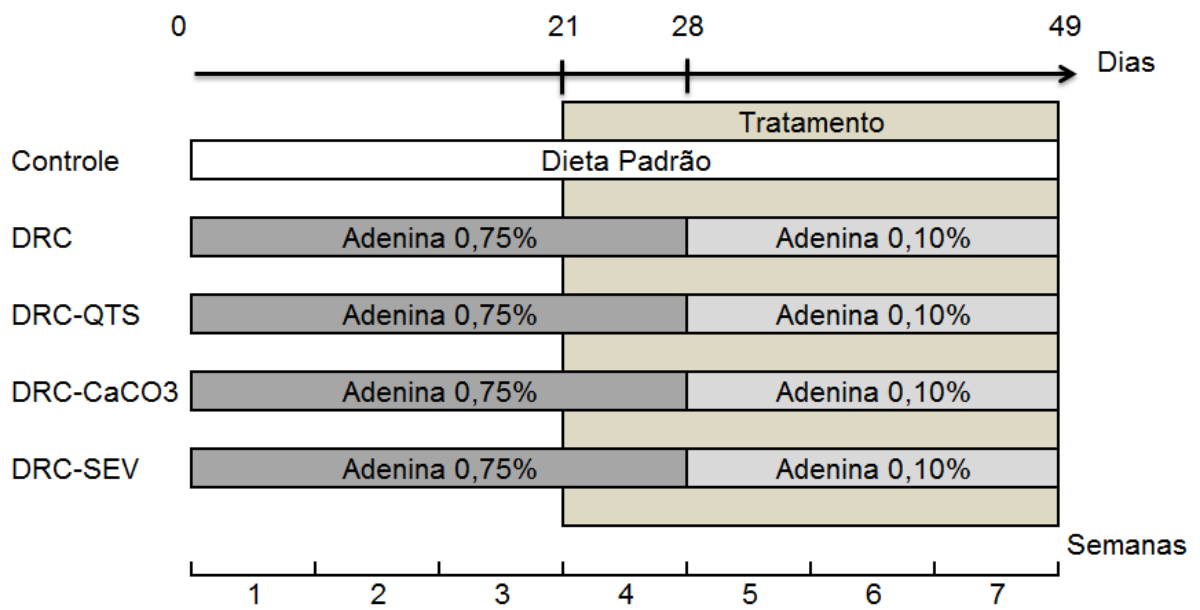


Figura 7. Desenho Experimental.

Durante o experimento foram avaliados semanalmente o consumo de ração e as medidas de peso. No dia anterior às eutanásias, os animais ficaram mantidos em gaiolas metabólicas, onde foi mensurado o consumo de água e o volume total de diurese através da coleta de urina de 24 horas. Antes da coleta de sangue os animais foram pesados e anestesiados com a associação de xilazina (König S.A, Avellaneda, Argentina) na dose de 10mg/kg e cetamina (König S.A, Avellaneda, Argentina) na dose de 90mg/kg, aplicados por via intraperitoneal. Foi realizada punção cardíaca para obtenção de sangue e em seguida os animais foram eutanasiados por ruptura do diafragma (WOLFENSOHN; LLOYD, 1994).

As amostras de urina, centrifugadas à 3.000rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA). O sangue também foi centrifugado sob as mesmas condições para separação do soro. Ambas as amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos sob refrigeração a -80°C em ultra freezer vertical (Thermo Scientific, Suwanee, EUA) para posterior análise.

A aorta torácica foi retirada e fixada, um segmento da aorta abdominal foi armazenado em tubos criogênicos e mantido sob refrigeração a -80°C para posterior avaliação do conteúdo de cálcio. O fêmur esquerdo de cada animal foi retirado e fixado em álcool 100% e posteriormente submetido à captura de imagens utilizando raios-x.

5.4. TRATAMENTO COM QUELANTES DE FÓSFORO

A administração dos quelantes foi realizada após a terceira semana de experimento conforme desenho experimental (Figura 7), uma vez ao dia por via intragástrica. Os animais dos grupos CONTROLE e DRC receberam diariamente 1mL de água destilada para cada 100g.

5.4.1. QTS-Fe(III)R

A QTS-Fe(III)R foi sintetizada e fornecida pela Universidade Federal do Vale do Itajaí (UNIVALE) sob responsabilidade do Prof. Dr. Clovis Antônio Rodrigues. A concentração de Ferro no polímero é de 80mg/g. A droga foi suspensa em água destilada, na concentração de 5mg/mL, e administrada na dose de 30mg/kg/dia aos animais do grupo DRC-QTS (BÜRGER et al., 2001).

5.4.2. CaCO₃

Conforme o desenho do estudo, o grupo DRC-CaCO₃ foi tratado com CaCO₃ (Os-cal, 500mg/comp, Sanofi, São Paulo, Brasil) na dose de 500mg/Kg/dia. A dose foi calculada com base no consumo mínimo diário e em resultados encontrados na literatura utilizando 3% de CaCO₃ adicionado à dieta (PHAN et al., 2008; PHAN et al., 2013). O comprimido foi triturado e suspenso em água destilada, na concentração de 60mg/mL.

5.4.3. Cl-Sev

O grupo DRC-SEV foi tratado com Cl-Sev (Renagel, 800mg/comp, Genzyme Ireland Ltd., Waterford, Irlanda) na dose de 500mg/Kg/dia (BEHETS et al., 2005). O comprimido foi dissolvido em água destilada, na concentração de 60mg/mL.

5.5. PARÂMETROS AVALIADOS

5.5.1. Pesos

Foi realizada avaliação das alterações de peso registrando-se semanalmente o peso em gramas de cada animal, em balança analítica (Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, Brasil).

5.5.2. Avaliações no soro e urina

Foram realizados os testes para dosagens de creatinina sérica e urinária (Creatinina K), fósforo sérico e urinário (Fósforo UV Liquiform), cálcio sérico total (Cálcio Liquiform) e fosfatase alcalina (Fosfatase Alcalina Liquiform) de todos os

grupos (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil). O equipamento utilizado para tais análises foi o analisador automático Labmax Progress (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil).

Além disso, foram realizadas as dosagens de PTH (Rat Intact PTH ELISA Kit, Immotopics, San Clemente, EUA) e FGF-23 (FGF-23 ELIZA Kit, Cloud-Clone Corp. Houston, EUA) no soro dos animais em leitora de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

5.5.3. Função renal

A função renal foi avaliada seguindo técnicas laboratoriais de rotina (CASTRO et al., 2014), pela creatinina sérica e pela depuração da creatinina (Clcr), calculada pela diferença entre o produto da creatinina urinária e o fluxo urinário de 24 horas, divididos pelo valor da creatinina sérica. Os valores do Clcr foram corrigidos para 100g de peso do animal e expressos em mL/min/100g:

$$\text{Clcr} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dL)} \times \text{fluxo urinário (mL/min)}}{\text{creatinina sérica (mg/dL)}}$$

5.5.4. Eficiência quelante

A eficiência do quelante foi mensurada pelas dosagens de fósforo sérico e pela estimativa da fração de excreção urinária de fósforo (FeP). A FeP é estimada pela seguinte fórmula:

$$\text{FeP\%} = \frac{\text{fósforo urinário (mg/dL)} \times \text{creatinina sérica (mg/dL)}}{\text{fósforo sérico (mg/dL)} \times \text{creatinina urinária (mg/dL)}} \times 100$$

5.5.5. Densidade óssea

O fêmur esquerdo de 6 animais dos grupos CONTROLE E DRC foram fixado em álcool 100% e posteriormente foram capturadas imagens de Raio-x utilizando o sistema de imageamento in vivo Kodak Image Station PRO (Carestream Health Inc., Rochester, NY, EUA) equipado com uma câmera CCD. As imagens de raio-x foram obtidas utilizando os seguintes parâmetros: 60 segundos de tempo de exposição, binning de 2 x 2, KVP de 35, filtro de alumínio de 0,8 mm, f-stop 2,8 e campo de visão (FOV) de 80 mm, através do software Carestream MI Application versão 5.0.2.30 (Carestream Health Inc.) (BARBOSA et al., 2011). As imagens foram convertidas em densidade óptica e a média de intensidade foi obtida a partir da área total do fêmur, a qual foi delimitada utilizando a ferramenta de seleção automática. As medições são realizadas em unidades arbitrárias (u.a.).

5.5.6. Calcificação vascular (CV)

Para avaliação da CV, o conteúdo de cálcio na aorta abdominal foi quantificado, foram avaliadas as alterações vasculares no arco da aorta com coloração de Hematoxilina-eosina e o depósito de cálcio pela coloração de Von Kossa. Foram utilizados anticorpos específicos para identificação da expressão da Angioll e α -actina pela técnica de imuno-histoquímica. Tais avaliações foram realizadas ao final de 4 semanas para os grupos CONTROLE e DRC e ao final do experimento (7 semanas) para todos os grupos.

5.5.6.1. Conteúdo de cálcio na aorta

Uma porção da artéria abdominal foi armazenada em criotubos e mantida em freezer (-80°C) para a determinação do conteúdo de cálcio. O fragmento foi desidratado em estufa a 60°C por 24 horas e posteriormente triturado, pesado e solubilizado em uma solução de ácido clorídrico (HCl) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) a 0,6N (40 mL HCl/g de tecido) por 48 horas. A solução resultante foi centrifugada a 3.000rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada, obtendo-se o sobrenadante para a dosagem da concentração de cálcio (Calcium Dry – Reagent Set, Pointe Scientific, Inc. Canton, EUA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em luz visível com comprimento de onda de 570nm. O teor de

cálcio da aorta abdominal foi expresso como mg de cálcio por g de peso seco e foram avaliados 6 animais de cada grupo (FERRARI, 2012; MACCABE et al., 2013).

5.5.6.2. Avaliação da parede das artérias

5.5.6.2.1. Alterações vasculares e depósito de cálcio

Após a eutanásia e a retirada dos órgãos, a aorta torácica foi fixada em formol 10% e posteriormente submetida ao processamento histológico. Durante procedimento, o órgão foi desidratado por banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%), diafanizado por xilol (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), e impregnado em parafina (Erviagas, São Paulo, Brasil) fundido à temperatura de 56°C a 58°C, usando-se três banhos (TOLOSA et al., 2003). Os fragmentos da aorta de cada animal foram dispostos transversalmente no mesmo bloco.

Os blocos foram cortados em micrótomo de rotação (Microm, Walldorf, Alemanha) obtendo-se cortes de cinco micrômetros, alocando-se 2 cortes em cada lâmina. Foram utilizadas lâminas histológicas para microscopia (Easypath, Indaiatuba, Brasil) e lâminas silanizadas para a imuno-histoquímica (Easypath, Indaiatuba, Brasil). As lâminas histológicas foram submetidas às colorações de Hematoxilina-eosina e Von Kossa.

Na coloração de Hematoxilina-eosina (Synth, Diadema, SP), a hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas (como

porções do citoplasma ricas em RNA e a matriz da cartilagem hialina). A eosina por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em rosa. Com o auxílio de um microscópio óptico (Axiophot HBO50, Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha), sob aumento de 400x, avaliamos a aorta torácica (em média 20 campos por lâmina) de 8 animais de cada grupo, atribuindo os seguintes escores (CUSTÓDIO et al., 2012):

(0) normal: sem alterações;

(1) lesão leve: descontinuidade parcial ou total de íntima ou fibras elásticas;

(2) lesão moderada: descontinuidade parcial ou total da íntima ou fibras elásticas e desorganização da camada média;

(3) lesão grave: descontinuidade parcial ou total da íntima ou fibras elásticas, desorganização da camada média e calcificações.

Animais com escores 0 e 1 foram classificados como sem lesão ou lesão vascular inicial e aqueles com escores 2 ou 3 como lesão vascular estabelecida. A coloração de Von Kossa foi utilizada para identificar pontos de calcificação no arco da aorta (Figura 8). As lâminas foram tratadas pela solução de nitrato de prata a 5% (Sigma Chemical, St Louis, EUA) e expostas à lâmpada ultravioleta. Em seguida tratadas com tiosulfato de sódio a 5% (Sigma Chemical, St Louis, EUA) e contracoradas com eosina. O nitrato de prata exposto à luz ultravioleta marca de preto os sais de cálcio enquanto a eosina cora o citoplasma de rosa (NEVEN et al., 2009; SETO; HAMADA; TOMINO, 2014).

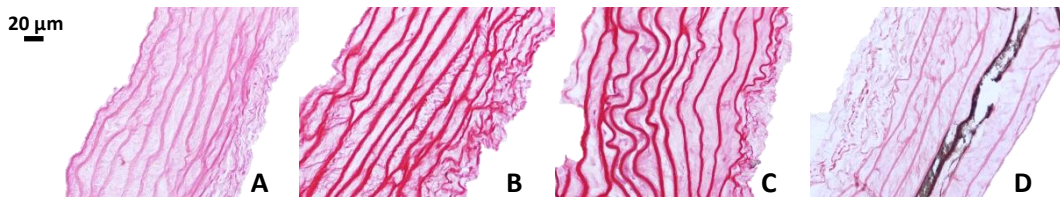


Figura 8. Coloração de Von Kossa para avaliação semi-quantitativa. Imagem representativa de cortes de tecido da aorta torácica para avaliação das alterações vasculares: (A) Sem lesão. (B) lesão leve. (C) lesão moderada. (D) lesão grave.

5.5.6.3. Imuno-histoquímica

Utilizamos anticorpos específicos para identificação da expressão de Angioll, para avaliação da inflamação pré calcificação e de α -actina, para avaliação da integridade da estrutura constitutiva do vaso. O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos omitindo-se o anticorpo primário específico.

As lâminas foram desparafinizadas conforme técnicas laboratoriais de rotina:

1. 30' em estufa a 60°C
2. 3 banhos em xilol por 9'
3. 2 banhos em álcool 100% por 5'
4. 1 banho em álcool 90% e 80% por 3' cada.

Após a desparafinização as lâminas foram hidratadas e em seguida, para exposição antigênica, foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico mono hidratado dissolvido em 1000mL de água destilada, ajustando o pH=6,0 com NaOH) e lavadas ao forno de micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts. Este procedimento foi realizado duas vezes durante 10 minutos cada, e após resfriadas, as lâminas foram lavadas em tampão preparado na proporção de 1:10

(Wash buffer - Tris-salino tamponado (10x) contendo Tween 20, pH 7,6± 0,1) (Dako, Glostrup, Dinamarca). As reações de imuno-histoquímica, para identificação da expressão de Angioll e α -actina foram realizadas pela técnica avidina-biotina/fosfatase alcalina.

Após a exposição antigênica, foi realizado o bloqueio da avidina e da biotina endógena (Dako, Glostrup, Dinamarca) 15 minutos cada um, seguido de bloqueio inespecífico com soro não imune (Protein Block Serum-Free: 0,25% de caseína em PBS contendo proteína de estabilização e 0,015mol/L de azida de sódio) (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos (CUSTÓDIO et al., 2012).

Para avaliação da Angioll, os cortes foram então incubados com anticorpo primário policlonal de coelho anti-Angioll (Península, Belmont, EUA) na diluição de 1:400 *overnight*, em temperatura controlada de 4°C, em câmara úmida. A etapa seguinte consistiu na incubação com imunoglobulina biotinilada de cabra anti-coelho (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1000, durante 45 minutos e em seguida com o complexo avidina-biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. O tempo de revelação com o substrato cromogênico (Fast red - Sigma Chemical, St Louis, EUA) foi de aproximadamente 8 minutos e a contra coloração realizada com hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha). As células que expressaram a Angioll apresentaram cor vermelha.

Os cortes para avaliação de α -actina foram incubados *overnight* com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- α -actina de músculo liso (Sigma Chemical, St Louis, EUA) na diluição 1:800, com temperatura de 4°C, em câmara úmida. A seguir os cortes, foram incubados com imunoglobulina biotinilada anti-camundongo adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:200 durante 45 minutos, seguida de nova incubação com o complexo avidina-

biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. O tempo de revelação com o substrato cromogênico (fast red) variou de 2 a 3 minutos e a contra-coloração foi feita com hemalumbre de Mayer. As células que expressavam α -actina apresentavam cor vermelha.

5.5.6.3.1. Quantificação da expressão de Angioll e α -actina

Na avaliação da expressão de Angioll, foi utilizada a técnica de contagem direta de células marcadas em cada campo. Um microscópio óptico (Axiophot HBO50, Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) dotado de câmera para captura das imagens acoplado ao computador (Axiocam ICc3, Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) foi utilizado para fotografar e analisar 25 campos consecutivos e não sobrepostos, sob aumento de 400x. Em cada campo foi mensurado o número total de células, este valor foi dividido pela área do tecido naquele campo, obtendo-se a relação de células marcadas (expressão de Angioll) por micrômetro quadrado (μ^2) (Figura 9).

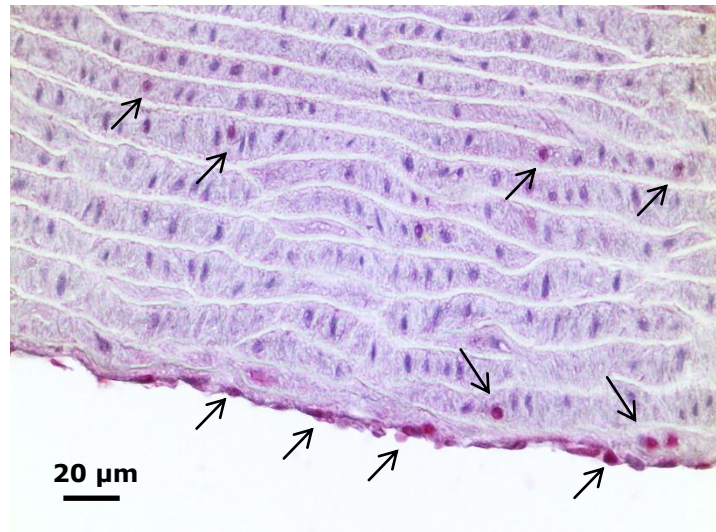


Figura 9. Avaliação da expressão de Angioll. Imagem representativa de um corte de tecido da aorta torácica com destaque para as células marcadas expressando Angioll (setas).

A quantificação da expressão de α -actina foi realizada com avaliação semi-quantitativa, empregando-se o seguinte escore: (1) marcação fraca ou ausente, restrita a poucas áreas da camada média; (2) marcação moderada, irregular e dispersa na camada média; (3) marcação intensa e uniformemente distribuída na camada média (Figura 10). Em cada grupo avaliamos 5 animais e 2 fragmentos por indivíduo (CUSTÓDIO et al., 2012).

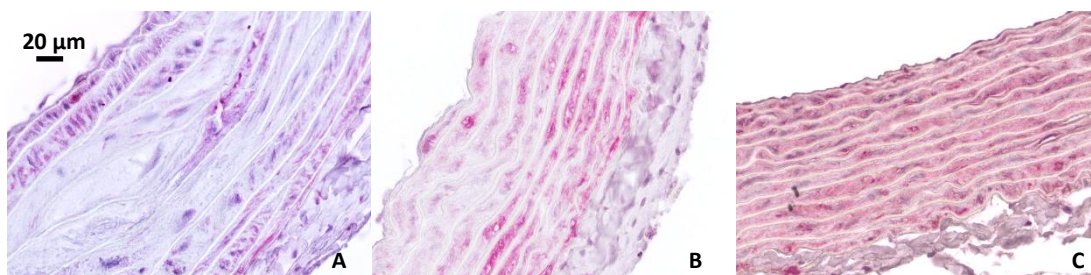


Figura 10. Avaliação semi-quantitativa da expressão de α -actina. Imagem representativa de um corte de tecido da aorta torácica. (A) Marcação fraca (<25%) ou ausente. (B) marcação moderada (25% a 75%). (C) marcação intensa (>75%).

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores estão expressos como média e desvio padrão ou mediana com mínimo e máximo, caso não apresentassem distribuição normal. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis. A comparação entre os grupos Controle e DRC foi realizada utilizando o teste T de Student. A comparação de todos os grupos foi feita usando ANOVA seguida do teste de Tukey para variáveis de distribuição normal e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnet para as variáveis não paramétricas. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram realizados no programa SPSS 13,1® (Chicago, EUA).

6. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos. O primeiro: Digital radiography as an alternative method in the evaluation of bone density in uremic rats dos autores: Bárbara Bruna Abreu de Castro, Wander Barros do Carmo, Jasmin, Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, Vera Maria Peters, Hélydy Sanders-Pinheiro, que foi submetido à revista *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. O segundo: Efeito do quelante de fósforo Quitosana-Fe(III) reticulada sobre a calcificação vascular em ratos urêmicos.

Title:

DIGITAL RADIOGRAPHY AS AN ALTERNATIVE METHOD IN THE EVALUATION OF BONE DENSITY IN UREMIC RATS

Barbara Bruna Abreu de Castro^{1,2,3}, Wander Barros do Carmo M.D., MSc^{1,2,3}, Jasmin Jasmin PhD.³, Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, PhD.³, Vera Maria Peters, PhD.³, Helady Sanders-Pinheiro M.D., PhD.^{1,2,3}.

1. Laboratory of Experimental Nephrology and Nucleus of Animal Experimentation (NIDEAL), Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brazil.
2. Nephrology Division and Interdisciplinary Nucleus of Studies and Research in Nephrology (NIEPEN), Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brazil.
3. Center of Reproductive Biology, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brazil.

Short title: X Ray and bone density in uremic rats

Author for correspondence:

Helady Sanders-Pinheiro M.D., PhD. Rua Benjamin Constant, 1044/1001, Juiz de Fora, Brazil. ZIP CODE 36015-400. Telephone: 55-32-9982-8439, Fax: 55-32-3217-1065. E-mail: heladysanders@gmail.com

ABSTRACT

Densitometry measures with Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) and Quantitative Computed Tomography (QCT) are frequently used to evaluate bone density (BD). Digital radiography (DRx) may provide a suitable alternative to investigate bone mineral disorder (BMD) and loss of bone density (BD) in rodent models of chronic kidney disease (CKD). The objective of this study was to use DRx to evaluate BD in CKD rats, and to evaluate the correlation between DRx findings and serum markers of BMD. Uremia was induced by feeding Wistar rats an adenine-enriched diet (0.75% for 4 weeks/0.10% for 3 weeks) and comparing outcomes to a control group at experimental weeks 3, 4, and 7. The following biochemical markers were measured: creatinine clearance (CrC), phosphorus (P), calcium (Ca), fractional excretion of phosphorus (FeP), alkaline phosphatase (ALP), fibroblast growth factor-23 (FGF-23) and parathyroid hormone (PTH). DRx imaging was performed on the left femur using a Kodak In vivo Image Station PRO. As expected, at week 7, uremic rats presented with reduced CrC and higher levels of P, FeP, AP compared to controls. DRx confirmed inferior BD in uremic animals (0.57 ± 0.07 vs. 0.68 ± 0.06 a.u.; $p=0.016$), compared to controls, at the end of week 7, when BMD was more prominent. BD measured on DRx correlated to P ($r = -0.81$; $p=0.002$), ALP ($r= -0.69$, $p=0.01$) and PTH ($r = -0.83$, $p=0.01$). In conclusion, in this uremic model, BD quantified by DRx was associated with the typical complications of BMD in CKD.

Key words: Bone Mineral Density; Diagnostic X-Ray; Experimental Models; Kidney Failure, Chronic; Renal Osteodystrophy.

INTRODUCTION

The human skeleton is composed of about 80% compact cortical bone and 20% trabecular, or spongy, bone. Due to its higher surface area to volume ratio, trabecular bone has a turnover rate which is approximately 8 times faster than that of compact bone, as well as being highly responsive to metabolic stimuli (1). This high rate of turnover makes trabecular bone the primary site for the detection of early bone loss that precedes fractures, as well as for monitoring the efficacy of different treatments aiming to prevent, or slow down, bone loss in clinical populations (2,3). Thus, the evaluation of bone density (BD) is considered as a major clinical tool for the detection of pathologies affecting bone structure (4).

Density is defined as the relationship between the mass and the volume of a particular structure. In bone, density is assessed using densitometry methods which are based on the principle of differential absorption of photons by tissues of different radiodensities, as well as by different regions of varying radiodensities within the same tissue. For bone, the absorption of photons is directly related to the thickness and composition of the bone tissue. Therefore, as BD decreases, less photons are absorbed, resulting in less attenuation of the radiographic signal (5-9).

Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) is the most widely used densitometry method to evaluate BD in the general population, as it is non-invasive, uses low doses of radiation, and provides high precision and good sensitivity and specificity to BD (7,10). Increasingly, quantitative computed tomography (QCT) is being used as an alternative method, sharing the same attributes as DXA but with the added advantage of providing separate assessment of the BD of cortical and trabecular bone (5,6).

In patients with chronic kidney disease (CKD), histomorphometry is considered as the gold standard for the assessment of BD. As histomorphometry is highly invasive, alternative, non-invasive, methods are being studied, combining imaging techniques with analysis of biomarkers of bone turnover in order to assess the risk for fracture in patients with CKD (9,11,12).

However, in experimental studies, the digital radiography (DRx) has also been used for the evaluation of BD (13-15). With DRx, digital images are obtained electronically, converted to numerical data using custom software, sampled, and stored for off-line analysis. For analysis, the digital image is divided into pixels, and the grey scale tone for each pixel is numerically coded. So, each pixel is associated with a number representing the color of this area of the image or the intensity of gray tones. In this way, the image is converted into a set of numbers and can be visualized on computer screen or be printed for analysis (16-18). To date, DRx has not been used for analysis of bone mineral disorder (BMD) in experimental models of CKD.

The objective of this study was to evaluate BD in uremic rats by using DRx, and to evaluate the association of image-based measures with the biochemical markers of renal BMD.

RESULTS

Mortality and Metabolic Parameters

Only one animal died in the Uremic group at week 3. Food intake was low for animals in the Uremic group over the first 3 weeks of the experiment, but increased after the week 4 when the concentration of adenine was changed from 0.75% to 0.10%. Maximum body weight loss (47%) in animals in the Uremic group occurred at

week 4, with no significant change in weight for the animals in the Control group. Diuresis was significantly increased in the Uremic group, reaching levels 3 to 4 times higher than in animals from the Control group; as well, water intake was higher for the Uremic group at all time-points of measurement (Figure 1).

Biochemical Parameters

The effects of the adenine enriched diet on creatinine clearance (CrC) are shown in Figure 2A. CrC was markedly decreased in the Uremic group at week 4, following the initial diet with 0.75% adenine enrichment for 4 weeks, with levels of 0.11 ± 0.04 mL/min/100 g compared to 0.75 ± 0.44 mL/min/100 g for animals in the Control group ($p=0.016$). This renal dysfunction in the Uremic group persisted 3 weeks after the reduction of dietary adenine concentration to 0.1%, with CrC levels at week 7 of 0.16 ± 0.06 mL/min/100 g compared to 0.62 ± 0.29 mL/min/100 g for the Control group ($p=0.01$).

The renal dysfunction was associated with BMD characterized by specific biochemical abnormalities. Hyperphosphatemia was found in the Uremic animals at the 3 time-points of measurement (Figure 2B). Serum phosphorus (P) levels in the Uremic group doubled, compared to animals in the Control group, at week 4, with levels of 14.70 ± 4.87 mg/dL and 7.11 ± 0.71 mg/dL, respectively ($p=0.01$). P levels remained high at week 7, with values of 10.61 ± 2.49 mg/dL and 6.82 ± 0.53 mg/dL for the Uremic and Control groups, respectively ($p=0.001$) (Figure 2B). There were significant differences between the groups in CrC and P in all evaluated points, confirming renal dysfunction and hyperphosphatemia.

Alkaline phosphatase (ALP), a marker of bone dysfunction, was statistically higher in the Uremic group, compared to the Control group, at all 3 time-points of

measurement (Figure 2C). In the Uremic group, ALP gradually increased to 383.14 ± 109.55 u/L at week 3, 452.71 ± 153.43 u/L at week 4, and 561 ± 90.90 u/L at the end-point of the experiment, week 7. The fractional excretion of phosphorus (FeP) increased while the renal function worsened. The FeP levels were elevated for animals in the Uremic group, compared to the Control group, at the 3 time-points of measurement (Figure 2D). FeP levels in Uremic animals increased to $34.21 \pm 8.63\%$ and $71.59 \pm 20.23\%$ at weeks 3 and 7, respectively, compared levels of $20.06 \pm 16.83\%$ at week 7 for animals in the Control group. While serum calcium (Ca) levels were comparable between both animal groups at weeks 3 and 4, levels were elevated for animals in the Uremic group at week 7 (Figure 2E).

An increase in fibroblast growth factor-23 (FGF-23) levels was expected to parallel the increase in renal dysfunction. In our animal model, however, levels of FGF-23 presented a tendency to be higher only at week 3 (Figure 2F). While parathyroid hormone (PTH) levels were widely variable in the Uremic group, levels were consistently higher compared to the Control group at weeks 3 and 4 (Figure 2G). Comparative values were of $2,659.20 \pm 392.57$ pg/dL vs. 214.84 ± 53.31 pg/dL ($p=0.001$), respectively, for the Uremic and Control groups, at week 3, and $3,769.40 \pm 1693.62$ pg/dL vs. 214.84 ± 53.31 pg/dL ($p=0.01$), respectively, at week 4. At week 7 there was only a tendency to the PTH levels in Uremic group to be higher ($5,940.2 \pm 5,740.35$ pg/dL vs. 272.3 ± 192.22 pg/dL; $p=0.09$) (Figure 2G).

Evaluation of BD by DRx

Comparative qualitative analysis of the BD images of the left femurs of animals from the Uremic and Control groups are shown in Figure 3A,B. The left femur of Uremic animals showed several areas of severe bone reabsorption,

indicative of bone rarefaction. Areas of diminished cortical bone thickness and expansion of trabecular bone were identified surrounding regions of rarefaction (Figure 3A"). Mean optical density analysis of the entire femur, shown in Figure 3B, indicated significantly lower BD in the Uremic group, with BD values of 0.57 ± 0.08 a.u., compared to 0.73 ± 0.10 a.u. for the Control group ($p=0.01$) at week 4, and 0.58 ± 0.07 a.u. vs 0.68 ± 0.06 a.u., respectively, at week 7 ($p=0.016$).

Association Between BD by DRx And Biochemical Parameters At Week 7

Results of Pearson's correlation analysis, evaluating the association between BD, measured by DRx, and selected biochemical parameters of BMD in CKD, are shown in Figure 4. The analysis revealed a significant inverse correlation with between BD and P ($r = -0.81$; $p = 0.002$), ALP ($r = -0.69$, $p = 0.01$), and PTH ($r = -0.83$, $p = 0.01$).

DISCUSSION

Changes in biochemical markers of BMD in CKD correlated with reduced BD measured by DRx, providing evidence of the application of DRx as a valid method for the evaluation of BD in uremic experimental models. CKD induces significant change in bone remodelling mechanisms, resulting in an imbalance between bone formation and reabsorption. The resulting changes in mineral organic content of bone can be measured by various methods (9,19). To our knowledge, the application of DRx for analysis of BD in uremic experimental models has not been previously evaluated. Recently, the analysis of BD in patients with CKD has gained importance in clinical practice because of its association with increased risk for fractures, and increased overall and cardiovascular mortality (20).

The adenine model was first described in the 70s and 80s by Yokozawa (21). In our study, we adapted their methods to maintain the induced deterioration in renal function over a longer period of time; our adapted methods have been previously described (22). Damment et al. modified the original protocol of feeding animals with 0.75% adenine for 4 weeks, by adding a maintenance phase consisting of a 0.1% adenine diet for 18 weeks (22). In our study, we used the initial 4 weeks of 0.75% adenine feeding and added 3 weeks of 0.1% adenine feeding. Our adapted adenine feeding protocol aimed to extend the period of renal dysfunction while reducing negative effects of the adenine-enriched diet on weight loss and mortality (21,22). In fact, our data at week 7 indicate that animals with adenine-induced CKD presented a partial weight recovery and a normalized food intake after changing the adenine supplementation from 0.75% to 0.10% at week 4. In our experimental Uremic group, only one animal did not survive.

Our experimental model produced renal injury predominantly to the tubulointerstitial compartment of the kidney, with resulting polyuria, and polydipsia (21,23) which were confirmed by findings of typical histological changes (data not shown). Glomerular filtration rate (GFR), estimated by CrC, was reduced by 75%, from normal values, in the Uremic group at the end of the experiment, week 7. The Kidney Disease: Global Improving Outcomes (KDIGO) classifies CKD into five categories of progressively decreasing function based on the GFR (24). Extrapolating our data to this classification of renal dysfunction in humans, we can infer that the reduction in GFR of the animals in the Uremic group was equivalent to patients with category 4 CKD.

Abnormalities in BMD are commonly evident at this category of CKD (25). However, CKD BMD is already present early in the course of CKD, with abnormal

serum levels of P, Ca, FGF-23, PTH, and calcitriol concentrations preceding identifiable changes in BD. These early changes were demonstrated by Pereira et al., who reported increased FGF-23 production by osteocytes in patients with category 2 CKD (25-28). In the transition from CKD category 2 to 3, reduction of GFR promotes a P overcharging, which stimulates the secretion of FGF-23 and increases phosphaturia (29-31). As CKD progresses, increased levels of FGF-23 reduce calcitriol levels and, consequently, increase levels of PTH in an attempt to maintain P homeostasis (27,32). The biochemical changes, mainly hyperphosphatemia, are most evident when patients progress to category 4 CKD (33,34).

In addition to the reduction in CrC, our data reproduced the kinetics of both early and late biochemical indicators of CKD BMD; early biochemical markers included a rise in FeP and FGF-23 levels, with elevation of PTH levels and hyperphosphatemia as late markers. In experimental models, these biochemical changes, and hyperphosphatemia more specifically, have been correlated to an increased prevalence of vascular calcification, bone disorders and mortality (35-37). ALP is another biochemical marker of CKD that has traditionally been linked to bone remodelling and to cardiovascular risk in uremic patients, also augmented as the renal function decreases (38-40).

In animal models, bone abnormalities have predominantly been associated to elevated levels of PTH. Classical features of bone histomorphometry (bone fibrosis, porosity and osteoid formation) and DXA imaging findings paralleled increasing levels of PTH in uremic rats (41,42). In our model, PTH levels increased during the experiment, but reached statistical difference to levels in the Control group only at the early time-points of measurement. The absence of between-group differences at later time-points of measurement likely reflects the large between-animal variability in PTH

levels. Such high variability in PTH levels have previously been described in rodent models of CKD (23,41,43).

A high prevalence of fractures is described in patients with CKD, when compared to the general population, showing that renal dysfunction carries additional risk for this condition (44-46). After the 2012 KDIGO guidelines, the evaluation of BD has increasingly been included as a component of the clinical investigation of CKD patients, justified by the importance of early diagnosis of fracture risk, as well as by the need to evaluate new therapies aiming to preserve bone mass in this population (12,47). The risk of bone fracture is defined as a bone's capacity to maintain its structure under an applied force. This capacity of bone is directly related to BD, bone quality and also to bone remodelling (48,49). BD is the fraction of bone that can be quantified. While commonly evaluated by DXA, BD has more recently been evaluated by QCT, which discriminates cortical and trabecular bone (9,47,50). However, rapid and less expensive techniques, like DRx, can also be applied to assess trabecular bone mass, as well as the more general features of disease-related changes in BD. DRx has the advantage of being less complicated to use than DXA and QCT and is more feasible to use in basic research (11,18,51). DRx has increasingly been used to provide surrogate measures of BD in small animals (52,53,13-15,18). DRx imaging was reported to be comparable to other imaging techniques (DXA and QCT), biochemical markers and histological patterns for differentiating normal and developing bone (13,14,18), as well as for identifying effects of various conditions on bone health, including diabetes mellitus (53), titanium implants (52), disease-induced bone loss (15), and osteoporosis (54). Our review of existing research did not identify whole bone assessment of BMD in experimental models of CKD. In our experiments, lower BD was identified in uremic animals at all

time-points of measurement. Bone changes, identified by DRx, correlated to changes in markers of BMD featured by the elevation of PTH, P, and ALP. Therefore, there was a direct link between bone loss identified on DRx imaging and bone disease high turnover found in CKD (39,55-57). However, we reported an inverse correlation between PTH, P and ALP and BD at the end of our study.

The specific limitations of our study should be acknowledged. While previous studies in rodents have demonstrated a good correlation between DRx and DXA and QCT, as well as parallels between DRx and serum markers of bone disease, inclusion of another imaging technique for comparison would have strengthened the findings of our study (13,58). As well, concurrent histological assessment would be necessary to correlate findings on imaging to the phenotype of bone disease.

In conclusion, the DRx was able to demonstrate the reduction of BD in femurs of uremic rats associating with biochemical markers of high turnover bone disease of CKD. Thus, we consider DRx helpful tool in the study of BD in animal models of CKD.

METHODS

Statement of Ethics

All procedures were performed in accordance with the Brazilian Federal Law, (11,794, October 8th 2008) and the guidelines of the National Council for the Control of Animal Testing. The study was approved by the Ethics Committee of Animal Use of Federal University of Juiz de Fora, Protocol number 031/2013.

Experimental Protocol and Diets

Sixty-four Wistar rats (*Rattus norvegicus*), males, 8 to 12 weeks old, and weighing between 200 g and 300 g, were obtained from the colonies at the Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora, where the experiments were conducted. After weaning, the animals were placed in polypropylene cages with shavings, and housed in air-conditioned racks (Alesco Industria e Comercio Ltda., Monte Mor, Brazil). The temperature and humidity were controlled at 22° C and 25%, respectively, and the rats were exposed to a light/dark cycle of 12 hr/12 hr, with ad libitum access to water.

After a week of acclimatization to the environment, the rats were divided into two groups, the Uremic group and the Control. The 32 animals in the Uremic group were fed an adenine enriched-diet (0.75% and 0.10% adenine, Pragsoluções SA, Jau, Brazil). The diet with 0.75% adenine was offered for 4 weeks, followed by the 0.10% in the following 3 weeks. The 32 animals in the Control group were fed a standard diet (Pragsoluções S.A., Jaú, Brazil) over the 7 weeks of the experiment (Figure 5).

To monitor disease progression, euthanasia was performed in 8 animals from each group at experimental weeks 3, 4 and 7. Body weight, food and water intake were recorded weekly. The day before euthanasia, animals were housed in metabolic cages for a 24-hr collection of urine. The animals were anesthetized with a dose of 10 mg/kg of xylazine (König SA Avellaneda, Argentina) and a dose of 90 mg/kg of ketamine (König SA Avellaneda, Argentina), administered intraperitoneally. Blood samples were collected by cardiac puncture followed by rupturing of the diaphragm.

Urine samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, in an automatic refrigerated centrifuge, for the separation of the supernatant (Sorvall, Suwanee, USA). Blood was centrifuged under the same conditions for serum separation. Both samples were stored in cryogenic tubes and refrigerated at -80 °C, for later analysis. Left femurs were removed for DRx analysis.

Biochemical Parameters

At weeks 3, 4 and 7, serum creatinine, P, ALP and Ca, and urinary creatinine and P levels were determined using an automatic analyzer, LabMax Progress (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Brazil). Additionally, serum parathyroid hormone (PTH) (Rat Intact PTH ELISA kit, Immutopics, San Clemente, USA) and fibroblast growth factor-23 (FGF-23) (FGF-23 ELISA kit, Clone Cloud Corp. Houston, USA) assays were performed by ELISA (R & D Systems, Minneapolis, USA).

Evaluation of BD by DRx

For DRx analysis, the left femur of 6 animals per group was fixed in 100% ethanol. Images of the whole bone were then captured using a Kodak In vivo Image Station PRO, equipped with a CCD camera (Carestream Health Inc., Rochester, NY). The DRx images were obtained using the following parameters: 60 s exposure time, 2 x 2 binning, KVP 35, 0.8 mm aluminium filter, 2.8 f-stop, and 80 mm field of vision. The acquired images were analysed using the Carestream MI Application software (version 5.0.2.30, Carestream Health Inc., Rochester, NY). After image calibration to optical density, the bone area was delimited using the automatic selection tool in the Carestream software, and the mean intensity of grey scale for each pixel in the delimited area quantified in arbitrary units, a.u. (15,18,59).

Statistical Analysis

The data were expressed as mean \pm standard deviation or median, with minimum and maximum, as appropriate for the data distribution evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test of normality. Comparisons between biochemical parameters of CKD BMD for the Uremic and Control groups were performed using Student's *t*-test. Pearson's correlation coefficient was used to evaluate the relationship between BD, measured by DRx, and biochemical parameters at week 7. Statistical significance was set at a *p*-value < 0.05 , and all analyses were performed using SPSS statistical software (Version 21; IBM Corporation, Chicago, IL).

ACKNOWLEDGEMENTS

Bárbara Bruna Abreu de Castro is supported by funding from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Fundação Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisas em Nefrologia (IMEPEN), and the Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; research grants: Rede Mineira de Bioterismo (0009/14) and Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos (0008/14).

COMPETING INTERESTS

The authors declare that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 3: S131–S9.
2. Popp AW, Meer S, Krieg MA, Perrelet R, Hans D, Lippuner K. Bone mineral density (BMD) and vertebral trabecular bone score (TBS) for the identification of elderly women at high risk for fracture: the SEMOF cohort study. *Eur. Spine. J.* 2015; ([In press]).
3. Harvey NC, Glüer CC, Binkley N, et al. Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice. *Bone.* 2015; 78: 216-24. Epub 16 May 2015; doi: 10.1016/j.bone.2015.05.016.
4. Fitzpatrick LA. Secondary causes of osteoporosis. *Mayo Clin. Proc.* 2002; 77:453-68.
5. Ibáñez, R. Bone mineral density measurement techniques. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2003; 26 (Suppl 3): 19-27.
6. Brunader R, Shelton DK. Radiologic bone assessment in the evaluation of osteoporosis. *Am. Fam. Physician.* 2002; 65: 1357-64.
7. Bouxsein M. New advances in non-invasive evaluation bone resistance. *Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2005; 1: 1-5.
8. Cosman F, Herrington B, Himmelstein S, Lindsay R. Radiographic absorptiometry: a simple method for determination of bone mass. *Osteoporosis Int.* 1991; 2: 34-8.
9. Moorthi RN, Moe SM. Recent Advances in the Non-invasive Diagnosis of Renal Osteodystrophy. *Kidney Int.* 2013; 84 (5): 886-94.
10. Jergas M, Genant HK. Current methods and recent advances in the diagnosis of osteoporosis. *Arthritis Rheum.* 1993; 36: 1649-62.

11. Arifin AZ, Asano A, Taguchi A, et al. Computer-aided system for measuring the mandibular cortical width on dental panoramic radiographs in identifying postmenopausal women with low bone mineral density. *Osteoporos. Int.* 2006; 17:753-9.
12. West SL, Lok CE, Langsetmo L, et al. Bone Mineral Density Predicts Fractures in Chronic Kidney Disease. *J. Bone Miner. Res.* 2015; 30:913-9.
13. Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp. Med.* 2011; 61:76-85.
14. Tian H, Bi X, Li CS, Zhao KW, et al. Secreted Phosphoprotein 24 kD (Spp24) and Spp14 Affect TGF- β Induced Bone Formation Differently. *PLoS One.* 2013; 8:e72645.
15. Mabileau G, Mieczkowska A, Libouban H, Simon Y, Audran M, Chappard D. Comparison between quantitative X-ray imaging, dual energy X-ray absorptiometry and microCT in the assessment of bone mineral density in disuse-induced bone loss. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 2015; 15:42-52.
16. Syriopoulos K, Sanderink GC, Velders XL, van der Stelt PF. Radiographic detection of approximal caries: comparison of dental films and digital imaging systems. *Dentomaxillofac. Radiol.* 2000; 29:312-8.
17. Friedlander LT, Love RM, Chandler NP. A comparison of phosphor-plate digital images with conventional radiographs for the perceived clarity of fine endodontic files and periapical lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2002; 93:321-7.

18. Jimenez-Mendoza D, Espinosa-Arbelaez DG, Giraldo-Betancur AL, Hernandez-Urbiola MI, Vargas-Vazquez D, Rodriguez-Garcia ME. Single x-ray transmission system for bone mineral density determination. *Rev. Sci. Instrum.* 2011; 82:125105.
19. Malluche HH, Davenport DL, Cantor T, Monier-Faugere MC. Bone Mineral Density and Serum Biochemical Predictors of Bone Loss in Patients with CKD on Dialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 9:1254-62.
20. Nickolas TL, Leonard MB, Shane E. Chronic kidney disease and bone fracture: a growing concern. *Kidney Int.* 2008; 74:721-31.
21. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron.* 1986; 44: 230-4.
22. Damment SJ. Pharmacology of the Phosphate Binder, Lanthanum Carbonate. *Ren. Fail.* 2011; 33: 217-24.
23. Ferrari GO, Ferreira JC, Cavallari RT, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC Nephrol.* 2014; 15:69.
24. Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl.* 2013; 3:136–150.
25. Moe SM, Radcliffe JS, White KE, Gattone VH 2nd, Seifert MF, Chen X, Aldridge B, Chen NX. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease–mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat. *J. Bone Miner. Res.* 2011; 26:2672-81.

26. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, et al. Patterns of FGF-23, DMP1 and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone*. 2009; 45: 1161-8.
27. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011; 79:1370-8.
28. Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, et al. Early chronic kidney disease—mineral bone disorder stimulates vascular calcification. *Kidney Int*. 2014; 85:142-50.
29. Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 2009; 24:17-25.
30. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2005; 16:2205-15.
31. Ketteler M. Phosphate metabolism in CKD Stages 3–5: Dietary and pharmacological control. *Int. J. Nephrol*. Epub 23 May, 2011; doi: 10.4061/2011/970245.
32. Hamdy NA, Kanis JA, Beneton MN, et al. Effect of alfacalcidol on natural course of renal bone disease in mild to moderate renal failure. *BMJ*. 1995; 310:358-63.
33. Levin A, Bakris GL, Molitch M, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int*. 2007; 71:31-8.
34. Llach F, Massry SG, Koffler A, et al. Secondary hyperparathyroidism in early renal failure: Role of phosphate retention. *Kidney Int*. 1977; 12:459.

35. Lau WL, Linnes M, Chu EY, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013; 28:62-9.
36. El-Abbadi MM, Pai AS, Leaf EM, et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int.* 2009; 75:1297-307.
37. Finch JL, Lee DH, Liapis H, et al. Phosphate restriction significantly reduces mortality in uremic rats with established vascular calcification. *Kidney Int.* 2013; 84:1145-53.
38. Kalantar-Zadeh K, Shah A, Duong U, Hechter RC, Dukkipati R, Kovesdy CP. Kidney bone disease and mortality in CKD: revisiting the role of vitamin D, calcimimetics, alkaline phosphatase, and minerals. *Kidney Int. Suppl.* 2010; Aug.(117):S10-21.
39. Nickolas TL, Cremers S, Zhang A, et al. Discriminants of Prevalent Fractures in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 22:1560-72.
40. Taliercio JJ, Schold JD, Simon JF, et al. Prognostic Importance of Serum Alkaline Phosphatase in CKD Stages 3–4 in a Clinical Population. *Am. J. Kidney Dis.* 2013; 62:703-10.
41. Iida A, Kemmochi Y, Kakimoto K, et al. Ferric citrate hydrate, a new phosphate binder, prevents the complications of secondary hyperparathyroidism and vascular calcification. *Am. J. Nephrol.* 2013; 37:346-58.
42. Meng Y, Zhang H, Li Y, Li Q, Zuo L. Effects of unfractionated heparin on renal osteodystrophy and vascular calcification in chronic kidney disease rats. *Bone.* 2014; 58:168-76.

43. Seto T, Hamada C, Tomino Y. Suppressive effects of iron overloading on vascular calcification in uremic rats. *J Nephrol.* 2014; 27:135-42.
44. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2000; 58:396-9.
45. Fried LF, Biggs ML, Shlipak MG, et al. Association of kidney function with incident hip fracture in older adults. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18:282-6.
46. Nickolas TL, McMahon DJ, Shane E. Relationship between moderate to severe kidney disease and hip fracture in the United States. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17:3223-32.
47. Jamal S, Cheung AM, West S, Lok C. Bone mineral density by DXA and HR pQCT can discriminate fracture status in men and women with stages 3 to 5 chronic kidney disease. *Osteoporos. Int.* 2012; 23:2805-13.
48. Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin. Ther.* 2005; 27:1-11.
49. Unnanuntana A, Rebolledo BJ, Khair MM, DiCarlo EF, Lane JM. Diseases affecting bone quality: beyond osteoporosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2011; 469:2194-206.
50. Hind K, Oldroyd B, Truscott JG. In vivo precision of the GE Lunar iDXA densitometer for the measurement of total-body, lumbar spine, and femoral bone mineral density in adults. *J. Clin. Densitom.* 2010; 13:413-7.
51. Kavitha MS, Asano A, Taguchi A, Kurita T, Sanada M. Diagnosis of osteoporosis from dental panoramic radiographs using the support vector machine method in a computer-aided system. *BMC Med. Imaging.* 2012;12:1.

52. Sakakura CE, Neto RS, Bellucci M, et al. Influence of homeopathic treatment with comfrey on bone density around titanium implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin. Oral Implants Res.* 2008;19:624-8.
53. de Moraes JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin. Oral Implants Res.* 2009; 20:796-801.
54. Beier EE, Maher JR, Sheu TJ, et al. Heavy Metal Lead Exposure, Osteoporotic-like Phenotype in an Animal Model, and Depression of Wnt Signaling. *Environ. Health Perspect.* 2013; 121:97-104.
55. Rix M, Andreassen H, Eskildsen P, Langdahl B, Olgaard K. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999; 56:1084-93.
56. Okuno S, Inaba M, Kitatani K, Ishimura E, Yamakawa T, Nishizawa Y. Serum levels of C-terminal telopeptide of type I collagen: A useful new marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Osteoporos. Int.* 2005; 16:501-9.
57. Bacchetta J, Boutroy S, Guebre-Egziabher F, et al. The relationship between adipokines, osteocalcin and bone quality in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24: 3120-5.
58. Esapa CT, Bassett JH, Evans H, Croucher PI, Williams GR, Thakker RV. Bone Mineral Content and Density. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2012; 2:365-400.
59. Jasmin, Jelicks LA, Tanowitz HB, Peters VM, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho AC, Spray DC. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect.* 2014; 16:923-35.

FIGURE LEGENDS

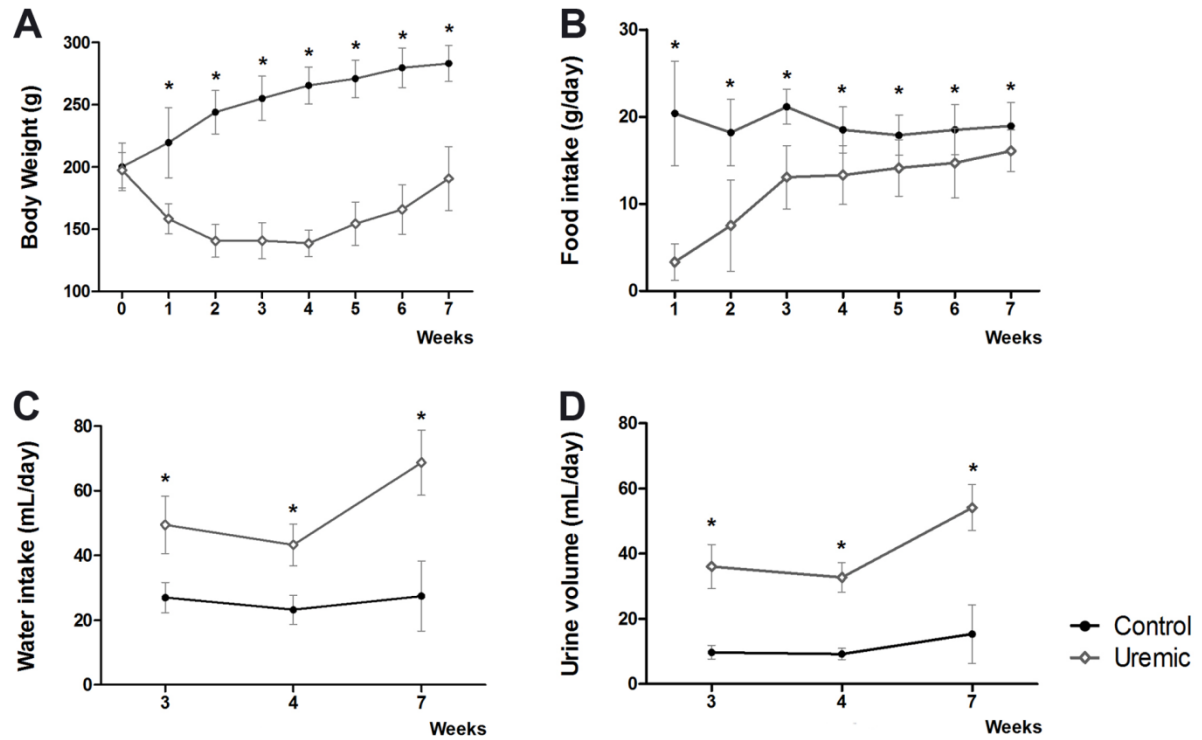


Figure 1. Metabolic parameters of Uremic and Control groups collected once a week during the 7 weeks of the experiment: (A) Body weight (g), and (B) Food intake (g). Metabolic Parameters collected at weeks 3, 4 and 7, (C) Water intake (mL) and (D) Urine Volume (mL). Data are expressed as mean \pm SD for each group, and Student's *t*-test used to compare data at each week, * $p < 0.05$.

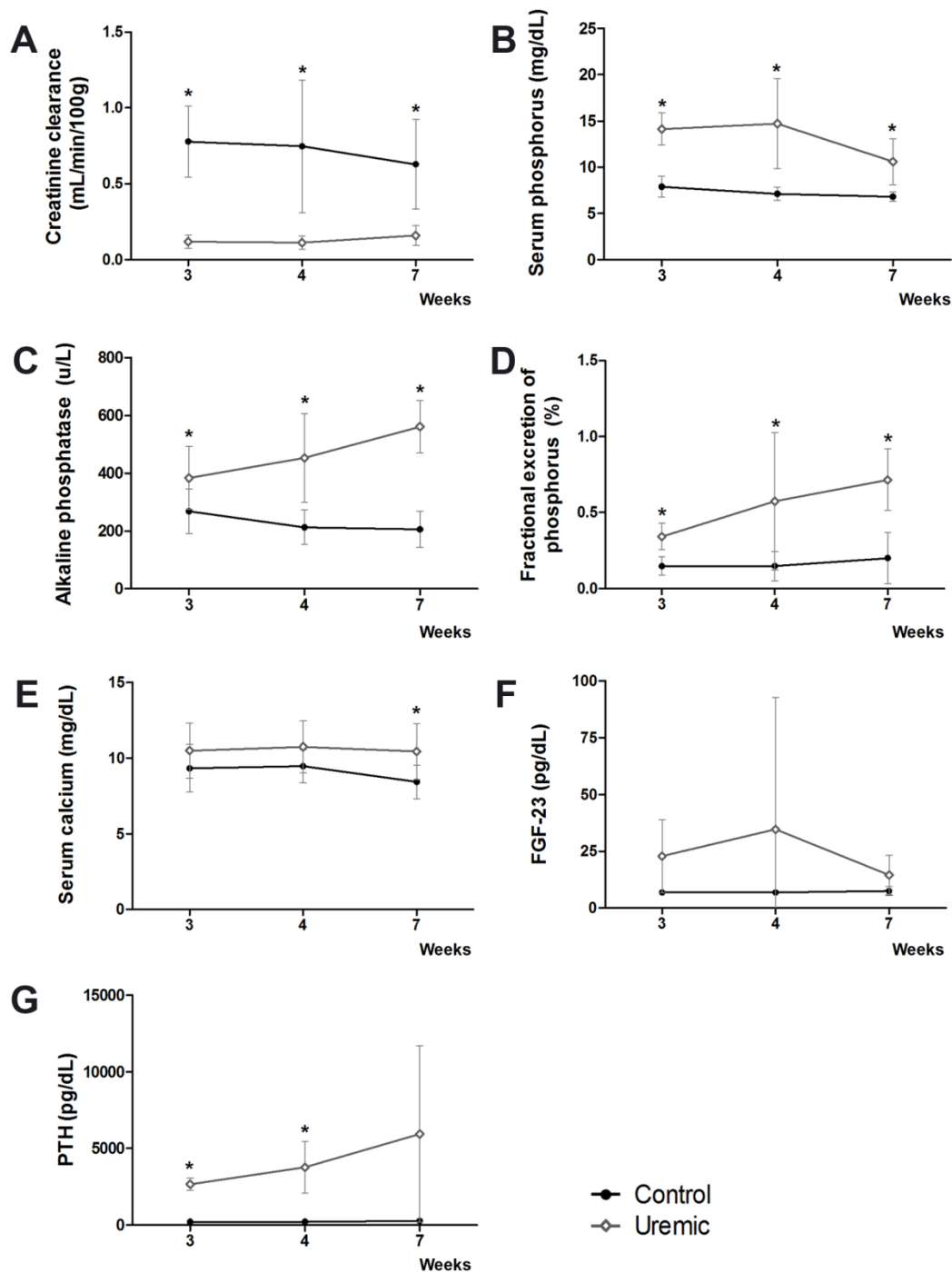


Figure 2. Biochemical parameters collected at weeks 3, 4 and 7: (A) Creatinine clearance (mL/min/100g), (B) Serum phosphorus (mg/dL), (C) Alkaline phosphatase (u/L), (D) Fractional excretion of phosphorus (%), (E) Serum Calcium (mg/dL), (F) fibroblast growth factor-23 (FGF-23) (pg/dL) and (G) Parathyroid hormone (PTH) (pg/dL). Data are expressed as mean \pm SD for each group, and Student's *t*-test used to compare data at each week, **p*<0.05.

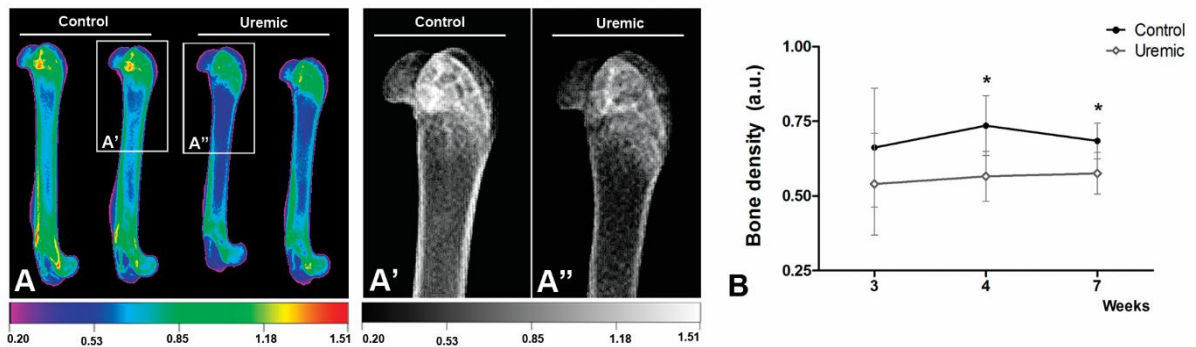


Figure 3. (A) Representative Digital Radiography (DRx) of left femurs from each group, presented in colour scale. (A') Representative DRx in grey tones for the femur of an animal in the Control group, and (A'') Representative DRx grey tones for the femur of an animal from the Uremic group. (B) Bone density calculated from the mean intensity of grey tones (a.u.). Data are expressed as mean \pm SD in each group and Student's *t*-test used to compare data at each week, * $p < 0.05$.

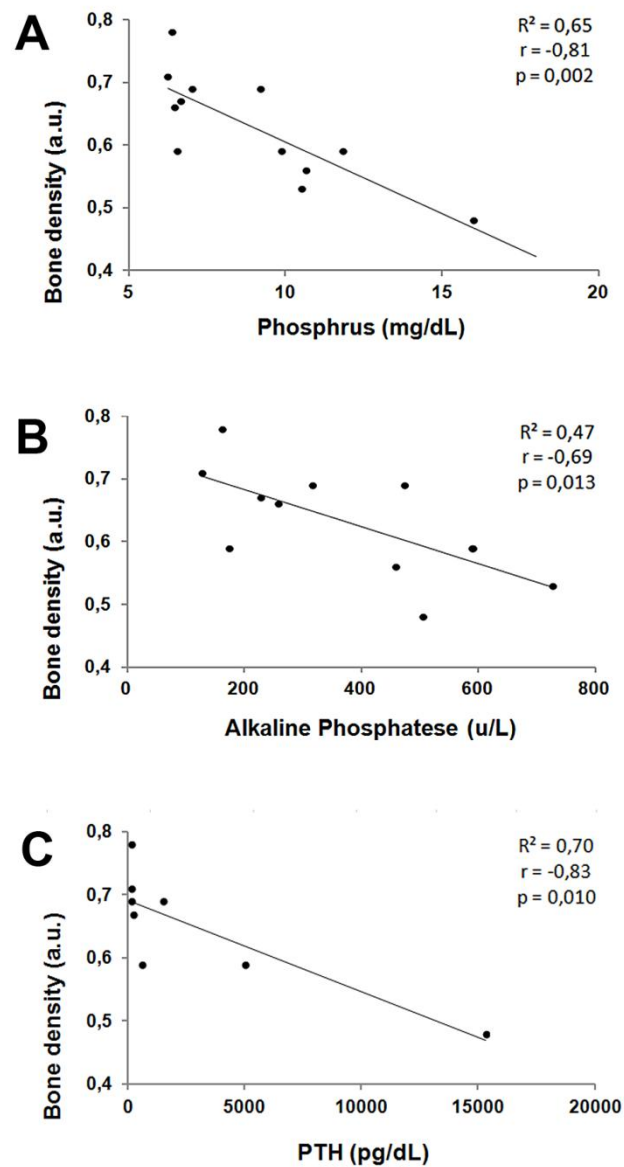


Figure 4. Pearson's correlation between bone density measured by Digital Radiography (DRx) and biochemical parameters at week 7: (A) Correlation between bone density (BD) and phosphorus; (B) Correlation between BD and alkaline phosphatase; and (C) Correlation between BD and Parathyroid hormone (PTH).

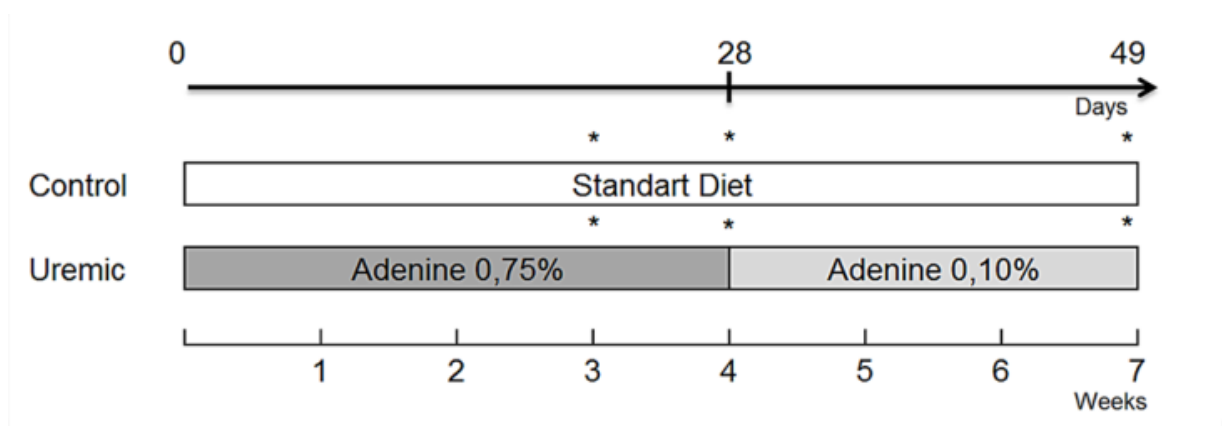


Figure 5. From day 0 to day 49 (7 weeks), standard diet was administered to the Control group. From day 0 to day 28 (4 weeks), 0.75% adenine diet was administered to the Uremic group. At the day 28, the 0.75% adenine diet was stopped, and from day 28 to day 49 (i.e., 3 weeks), a 0.1% adenine diet was administered to the Uremic group. Body weight, food and water intake were measured once a week. Stars indicate the time-points of measurement of water intake, urine volume, and euthanasia (N = 8).

Bárbara Bruna

De: onbehalfof+cepp+wiley.com@manuscriptcentral.com em nome de cepp@wiley.com
Enviado em: terça-feira, 7 de julho de 2015 18:11
Para: barbarabac@yahoo.com.br
Assunto: manuscript submitted - CEPP-15-0259

Dear Miss CASTRO

Ms: CEPP-15-0259

Title: DIGITAL RADIOGRAPHY AS AN ALTERNATIVE METHOD IN THE EVALUATION OF BONE DENSITY IN UREMICRATS

The above manuscript has been submitted by HELADY SANDERS-PINHEIRO to Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/cepp>

User ID: barbarabac@yahoo.com.br

PASSWORD: To set your password please click the link below. Clicking the link will take you directly to the option for setting your permanent password.

https://mc.manuscriptcentral.com/cepp?URL_MASK=9fc877a13b5143499c2a8cc909667265

Logging into the site will allow you to check the status of papers you have authored/co-authored.

Thank you for your participation.

Best regards,

CEPP Editorial Office
cepp@wiley.com

Artigo Original

Título:

EFEITO DO QUELANTE DE FÓSFORO QUITOSANA-FE(III) RETICULADA SOBRE A CALCIFICAÇÃO VASCULAR EM RATOS URÊMICOS

Autores:

Barbara Bruna Abreu de Castro^{1,2,3}, Wander Barros do Carmo^{1,2,3}, Helady Sanders-Pinheiro^{1,2,3}

1. Laboratório de Nefrologia Experimental (LABNEX) e Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Animais de Laboratório (NIDEAL), Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brasil.

2. Núcleo Interdisciplinar de Estudos e Pesquisas em Nefrologia (NIEPEN), Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brasil.

3. Centro de Biologia da Reprodução (CBR), Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brasil.

Autor para correspondência:

Helady Sanders-Pinheiro. Rua Benjamin Constant, 1044/1001, Juiz de Fora, Brasil.

CEP: 36015-400. Telefone: (32) 9982-8439. Fax: (32) 3217-1065.

E-mail: heladysanders@gmail.com

Agradecimentos:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisas em Nefrologia (IMEPEN), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Rede Mineira de Bioterismo (0009/14) e Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos (0008/14).

RESUMO

A Quitosana-Fe(III) reticulada (QTS-Fe(III)R) é um polímero derivado da quitina, que apresenta potencial efeito quelante de fósforo, porém ainda não testado no contexto da doença renal crônica. Nosso objetivo foi avaliar a capacidade desse composto em reduzir a hiperfosfatemia e seu efeito sobre a calcificação vascular em ratos com uremia induzida por dieta com adenina e rica em fósforo. Os ratos urêmicos foram divididos em 4 grupos tratados diariamente com veículo, QTS-Fe(III)R; carbonato de cálcio ou sevelamer durante 4 semanas. Foram mensurados: creatinina, fósforo, cálcio, fosfatase alcalina, paratormônio e fator de crescimento de fibroblasto-23. A calcificação vascular foi avaliada pelo conteúdo de cálcio na aorta e pelas colorações de Von Kossa e Hematoxilina-eosina. A expressão da angiotensina II e alfa-actina do músculo liso foram quantificadas por imuno-histoquímica. A QTS-Fe(III)R parece ter ação sobre a sobrecarga de fósforo e níveis de paratormônio nos animais urêmicos. O conteúdo de cálcio na aorta foi diminuído em 77% no grupo tratado com QTS-Fe(III)R e 59% com sevelamer. QTS-Fe(III)R limitou a expressão de angiotensina II na camada íntima da aorta e a utilização dos tratamentos não apresentou benefícios sobre a integridade da camada média quando avaliamos a expressão de alfa-actina. Em conclusão, neste modelo, a QTS-Fe(III)R apresentou

efeito quelante de fósforo semelhante aos demais já utilizados na prática clínica e aparentemente possui ação sobre a calcificação vascular na aorta.

Palavras-chave: calcificação vascular, distúrbio mineral ósseo, hiperfosfatemia, quitosana, quelantes de fósforo

Introdução

A calcificação vascular (CV) é uma grave consequência dos distúrbios metabólicos causados pela doença renal crônica (DRC) e está associada ao aumento do risco cardiovascular e da mortalidade [1]. Previamente, era considerada uma condição relacionada ao envelhecimento envolvendo na sua fisiopatologia a aterosclerose, hipertensão e diabetes [2]. Atualmente, sabe-se que é resultado da modificação fenotípica das células musculares regulada por processos ativos associados ao distúrbio mineral e ósseo (DMO) da DRC, principalmente à hiperfosfatemia [3,4]. Em estudos *in vitro* foi observado aumento da deposição de cálcio em células de músculo liso vascular em meio com níveis elevados de fósforo [5,6]. Observou-se também aumento da expressão de proteínas normalmente encontradas em tecidos mineralizados, como fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina, em células vasculares calcificadas [7]. Além disto, animais urêmicos, sob dieta com alto teor de fósforo, apresentaram calcificação da camada média arterial, concomitante com achados de níveis elevados do hormônio fosfatúrico fator crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23) e osteopontina [4,8].

Outro efeito direto da hiperfosfatemia na célula muscular lisa é a redução da expressão de genes comuns a essas células, como por exemplo, o ACTA2, que

codifica a proteína alfa-actina (α -actina) [9,10], assim como surgimento da expressão de genes da fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina [11]. Além da perda de componentes tradicionais do tecido, estudos recentes envolvem a inflamação na patogênese da lesão vascular e associam este processo com o aumento da atividade da Angiotensina II (AngiII). A AngiII promove crescimento celular e sua elevação pode provocar alterações estruturais na matriz extracelular. Tais alterações precedem o aparecimento dos mecanismos que desencadeiam produção de mediadores inflamatórios, sobretudo em células do músculo liso vascular [12,13,14].

Os quelantes de fósforo são compostos que tentam restaurar a homeostase do fósforo nos pacientes com DRC, impedindo sua absorção e eliminando-o nas fezes [15]. É relatada em ensaios clínicos que o uso de quelantes à base de cálcio associou-se com a piora da progressão da CV e maior mortalidade, criando a necessidade de se desenvolver novas drogas quelantes efetivas e sem estes efeitos deletérios [16,17,18]. Novas formulações vêm utilizando compostos a base de ferro com potencial quelante de fósforo e livres de cálcio [19,20,21]. A quitosana é um polímero derivado da quitina que apresenta um par de elétrons livres no nitrogênio que servem de suporte aos compostos metálicos adsorventes de fósforo. Estudos anteriores demonstraram eficácia da Quitosana Ferro(III) (QTS-Fe(III)) como quelante em estudos *in vitro* e também *in vivo* em modelos de sobrecarga de fósforo por dieta. Ainda não foi avaliado o efeito quelante de fósforo da QTS-Fe(III) em modelo de hiperfosfatemia induzida por insuficiência renal [22,23,24].

Após o estabelecimento do modelo, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da QTS-Fe(III) em um modelo de uremia, seu efeito sobre a CV, sobre os outros marcadores do DMO na DRC e comparar seu potencial terapêutico com outros quelantes de fósforo.

Material e métodos

Animais e desenho experimental

Foram utilizados 56 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com idade de 8 a 12 semanas, pesando de 200g a 300g. Os animais foram obtidos a partir das colônias do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde os experimentos foram conduzidos. Após o desmame, os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha e alojados em estantes climatizadas (Alesco Indústria e comércio Ltda., Monte Mor, Brasil). A água e a ração foram oferecidas *ad libitum* e a temperatura mantida ao redor de 22°C, com iluminação mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – controladas automaticamente para ciclo claro/escuro de 12h.

Os procedimentos necessários para a realização do estudo estiveram de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme protocolo nº 031/2013.

Após uma semana de aclimação, os animais foram divididos em 5 grupos (Figura 1). No protocolo 1 (estudo do modelo), comparamos o grupo CONTROLE, alimentado com dieta padrão, com o grupo DRC, alimentado com dieta enriquecida em adenina a 0,75% por 4 semanas e a 0,10% nas 3 semanas seguintes [25]. Avaliamos 8 animais de cada grupo nas semanas 4 (dia 28) e 7 (dia 49).

No protocolo 2 (estudo do tratamento), comparamos os grupos tratados com o grupo DRC. Ratos com uremia induzida conforme protocolo 1 foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n = 8 para cada grupo) e tratados por via intragástrica

durante 4 semanas, a partir da semana 3: (1) DRC-QTS tratado com 30mg/kg/dia de QTS-Fe(III), [23] (2) DRC-CaCO₃ tratado com 500mg/kg/dia de carbonato de cálcio [17,19] e (3) DRC-SEV tratado com 500mg/kg/dia de sevelemer [26]. A ração foi produzida em um único lote e continha 1% de fósforo (Pragsoluções S.A., Jaú, Brasil) (Figura 1). Os grupos CONTROLE e DRC receberam 1mL água/100g durante o período de tratamento.

No dia anterior às eutanásias, os animais foram pesados, mantidos em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas e avaliação do consumo de ração. Antes da coleta de sangue os animais foram pesados e anestesiados com a associação de xilazina (König S.A, Avellaneda, Argentina) na dose de 10mg/kg e cetamina (König S.A, Avellaneda, Argentina) na dose de 90mg/kg, via intraperitoneal. Foi realizada punção cardíaca para obtenção de sangue e em seguida os animais foram eutanasiados por ruptura do diafragma. As amostras de urina foram centrifugadas à 3.000rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA). O sangue também foi centrifugado sob as mesmas condições para separação do soro.

Parâmetros bioquímicos

Foram dosados creatinina sérica e urinária, fósforo sérico e urinário (para cálculo da fração excretada de fósforo - FeP), cálcio sérico total e fosfatase alcalina (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) no analisador automático Labmax Progress (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil). Além disso, foram realizadas as dosagens de PTH (Rat Intact PTH ELISA Kit, Immutopics, San Clemente, EUA) e FGF-23 (FGF-23 ELIZA Kit, Cloud-Clone Corp., Houston, EUA) pela técnica de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA) no soro.

Calcificação vascular

Quantificação do conteúdo de cálcio na aorta

Após a eutanásia uma porção de aproximadamente 1,5cm da aorta abdominal foi armazenada a -80°C. O fragmento foi desidratado em estufa (MCP) a 60°C por 24 horas e posteriormente triturado, pesado e solubilizado em solução de ácido clorídrico (HCl) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) a 0,6N (40mL HCl/g de tecido) por 48 horas. A solução resultante foi centrifugada a 3.000rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada, obtendo-se o sobrenadante para a dosagem da concentração de cálcio (Calcium Dry – Reagent Set, Pointe Scientific Inc., Canton, EUA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em luz visível com comprimento de onda de 570nm. O teor de cálcio da aorta abdominal foi expresso como mg de cálcio por g de peso seco e foram avaliados 6 animais de cada grupo [27,28].

Avaliação morfológica semi-quantitativa do vaso

Foram avaliadas as alterações morfológicas no arco da aorta e o depósito de cálcio. A aorta torácica foi dividida em 2 fragmentos, fixada em formol 10% e posteriormente submetida ao processamento histológico de rotina. Os fragmentos da aorta de cada animal foram dispostos transversalmente no mesmo bloco. Cortes de 5µm foram submetidas às colorações de Hematoxilina-eosina e Von Kossa. Sob aumento de 400x, avaliamos a aorta torácica, 20 campos por lâmina, 8 animais de cada grupo, atribuindo a cada animal o seguinte escore [29]:

- (0) normal: sem alterações;
- (1) lesão leve: descontinuidade parcial ou total da íntima ou das fibras elásticas;
- (2) lesão moderada: descontinuidade parcial ou total da íntima ou das fibras elásticas e desorganização da camada média;

(3) lesão grave: descontinuidade parcial ou total da íntima ou das fibras elásticas e desorganização da camada média e calcificações.

Animais com escores 0 e 1 foram classificados como sem lesão ou lesão vascular inicial e aqueles com escores 2 ou 3, como lesão vascular estabelecida.

Imuno-histoquímica

Utilizamos anticorpos específicos para identificação da expressão de Angioll e α -actina de músculo nos fragmentos da aorta torácica. O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos omitindo-se o anticorpo primário específico. As lâminas foram desparafinizadas conforme técnicas laboratoriais de rotina, após a desparafinização, foram hidratadas e em seguida, para exposição antigênica, foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico monohidratado dissolvido em 1.000mL de água destilada, ajustando o pH=6,0 com NaOH) (MCP do ácido cítrico e NaOH) e lavadas ao forno de micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts. Este procedimento foi realizado duas vezes durante 10 minutos cada, e após resfriadas, as lâminas foram lavadas em tampão preparado na proporção de 1:10 (Wash buffer - Tris-salino tamponado (10x) contendo Tween 20, pH 7,6 \pm 0,1) (Dako, Glostrup, Dinamarca). As reações de imuno-histoquímica, para identificação da expressão de Angioll e α -actina foram realizadas pela técnica avidina-biotina-fosfatase alcalina. Após a exposição antigênica, foi realizado o bloqueio da avidina e da biotina endógena (Dako, Glostrup, Dinamarca) 15 minutos cada um, seguido de bloqueio inespecífico com soro não imune (Protein Block Serum-Free: 0,25% de caseína em PBS contendo proteína de estabilização e 0,015mol/L de azida de sódio) (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos [29].

Os cortes foram então incubados com anticorpo primário policlonal de coelho anti-Angioll (Península, Belmont, EUA) na diluição de 1:400 e com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- α -actina de músculo liso (Sigma Chemical, St Louis, EUA) na diluição 1:800, *overnight*, em temperatura controlada de 4°C, em câmara úmida. A etapa seguinte consistiu na incubação com imunoglobulina biotinilada de cabra anti-coelho (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1.000, durante 45 minutos e com imunoglobulina biotinilada anti-camundongo adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:200 durante 45 minutos, respectivamente. Em seguida, nova incubação com o complexo avidina-biotina/fosfatase alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. O tempo de revelação com o substrato cromogênico (fast red) para Angioll foi de aproximadamente 8 minutos e para α -actina variou de 2 a 3 minutos. A contra coloração foi realizada com hemalumbre de Mayer. As células que expressaram a Angioll e α -actina apresentaram cor vermelha. As imagens de 25 campos consecutivos e não sobrepostos, sob aumento de 400x, foram capturadas por microscópio óptico (Axiophot HBO50, Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) dotado de câmara acoplado ao computador (Axiocam ICc3, Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha). Em cada grupo avaliamos 5 animais e 2 fragmentos por indivíduo [29].

Os resultados para Angioll foram apresentados em número de células positivas por área da parede da aorta (μ^2). Para cada animal foi calculada a média dos valores encontrados. A quantificação da expressão de α -actina foi realizada com avaliação semi-quantitativa, empregando-se o seguinte escore para cada campo: (1) marcação fraca (<25%) ou ausente, restrita a poucas áreas da camada média; (2) marcação moderada (25 a 75%), irregular e dispersa na camada média; (3)

marcação intensa (>75%) e uniformemente distribuída na camada média. Para cada animal foi calculada a média dos escores dos campos avaliados [29].

Análise estatística

Os valores foram expressos como média e desvio padrão. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis. A comparação entre os grupos Controle e DRC foi realizada utilizando o teste T de Student. A comparação entre grupo DRC e grupos DRC tratados foi feita usando ANOVA seguida do teste de Tukey. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram realizados no programa SPSS 13.1® (IBM Corporation, Chicago, EUA).

Resultados

Mortalidade, parâmetros metabólicos e bioquímicos dos grupos CONTROLE e DRC (Protocolo 1)

Não observamos nenhum óbito no estudo do modelo (Protocolo 1). A comparação entre os parâmetros metabólicos dos grupos CONTROLE e DRC, nas semanas 4 e 7 e parâmetros bioquímicos obtidos a partir do soro e urina de ambos os grupos, estão apresentados na Tabela 1. O grupo DRC apresentou menor peso e menor consumo de ração em ambos os pontos avaliados quando comparado ao CONTROLE. Em relação aos controles, o grupo DRC apresentou aumento da creatinina sérica, hiperfosfatemia, hiperfosfatúria e aumento da fosfatase alcalina na semana 4. Observamos recuperação parcial da função renal na semana 7, após a redução da concentração da adenina da dieta. Porém as diferenças entre os animais controles e DRC foram mantidas, com aumento progressivo da FeP e fosfatase

alcalina. O cálcio sérico do grupo DRC foi maior que do grupo CONTROLE na semana 7. Já o PTH do grupo DRC foi maior do que o grupo CONTROLE na semana 4.

Calcificação vascular dos grupos CONTROLE e DRC (Protocolo 1)

Para avaliação da CV, o conteúdo de cálcio na aorta abdominal foi quantificado nos dois pontos avaliados. Não houve diferenças na semana 4. Os animais do grupo DRC apresentaram valores elevados de conteúdo de cálcio na aorta na semana 7, porém quando comparado ao grupo CONTROLE essa elevação não foi significativa ($1,89 \pm 3,10$ vs $0,39 \pm 0,29$ mg/g, $p=0,29$) (Figura 2A).

O grupo CONTROLE não apresentou alterações morfológicas na avaliação vascular em nenhum ponto avaliado. O grupo DRC apresentou alterações do tipo vascular estabelecida (escores 2 e 3) na semana 4 apenas em 1 animal (12,5%) e maior prevalência dessas alterações (62,5%) na semana 7, incluindo áreas calcificadas (Figura 2B).

Imuno-histoquímica para Angioll e α -actina dos grupos CONTROLE e DRC (Protocolo 1)

Utilizamos anticorpos específicos para identificação da expressão da Angioll e α -actina pela técnica de imuno-histoquímica. Não houve diferença da expressão de Angioll e α -actina entre os grupos DRC e CONTROLE, nos dois pontos avaliados. Ainda assim, percebemos, que a expressão de Angioll do grupo DRC foi aumentada na camada média na semana 4 (Figura 2C) e na camada íntima na semana 7 (Figura 2D). Outra peculiaridade observada neste modelo é que mesmo sem

diferença estatística, a média do escore de intensidade da expressão de α -actina dos animais do grupo DRC diminuiu nos dois pontos avaliados (Figura 2E).

Mortalidade, parâmetros metabólicos e bioquímicos dos grupos DRC e DRC tratados (Protocolo 2)

Não observamos nenhum óbito no estudo do tratamento (Protocolo 2). A comparação entre os parâmetros metabólicos e bioquímicos dos grupos DRC e DRC tratados, ao final de 7 semanas, estão apresentados na Figura 3. Os tratamentos não diferiram entre si. Os grupos DRC-QTS, DRC-CaCO₃ e DRC-SEV não modificaram peso, consumo de ração, creatinina sérica, fósforo sérico, cálcio sérico e fosfatase alcalina quando comparados ao grupo DRC (Figura 3A, 3B, 3C, 3D, 3F, 3G, 3I). No grupo tratado com QTS-Fe(III)R e no grupo DRC encontramos FeP (51,24±33,76 vs. 71,57±20,22 %, p= 0,47), FGF-23 (9,62±2,85 vs. 14,50±8,70 pg/dL, p=0,68) e PTH (1.514,00±309,97 vs. 5.940,20±5.740,35 pg/dL, p=0,51), respectivamente, sugerindo que a QTS-Fe(III)R tenha ação quelante de P, porém, nenhuma diferença estatística foi observada (Figura 3E, 3H).

Calcificação vascular dos grupos DRC e DRC tratados (Protocolo 2)

O conteúdo de cálcio da aorta abdominal foi semelhante entre os vários tratamentos estudados, porém, os grupos DRC e DRC-CaCO₃, mostraram níveis muito elevados desse parâmetro. O grupo DRC-QTS foi o grupo que apresentou menor média de conteúdo de cálcio na aorta (0,43±0,10 vs. 1,89±3,10 mg/g do grupo DRC, p=0,69) (Figura 4). Avaliando as alterações vasculares de forma semi-quantitativa, 62,5% dos animais do grupo DRC e DRC-CaCO₃ apresentaram alterações vasculares, 75% dos animais do grupo DRC-SEV apresentaram lesão

vascular estabelecida, enquanto o grupo DRC-QTS apresentou somente 37,5% dos animais com alterações no vaso. O tratamento com QTS-Fe(III)R foi o único que reduziu a prevalência de lesões moderada e grave (Figura 5A).

Imuno-histoquímica para Angioll e α -actina dos grupos DRC e DRC tratados (Protocolo 2)

Não houve diferença da expressão de Angioll e α -actina entre os grupos DRC, DRC-QTS, DRC-CaCO₃ e DRC-SEV (Figura 5B, 5C, 5D). Porém, a expressão de Angioll na camada média dos grupos tratados estiveram acima do valor apresentado pelo grupo DRC e na camada íntima, os grupos DRC-QTS e DRC-CaCO₃ apresentaram valores mais baixos, apesar de não significativos (Figura 5B, 5C). Sobre a expressão de α -actina, a utilização dos tratamentos não apresentou benefícios sobre a integridade dos vasos (Figura 5D).

Discussão

Neste estudo reproduzimos o modelo de nefrite túbulo-intersticial crônica pela adição de adenina na dieta, com aumento dos níveis séricos de creatinina, fósforo, cálcio e fosfatase alcalina, elevação da FeP e PTH. Optamos pelo modelo de nefropatia causado pela adenina na dieta, que é o mais utilizado para avaliação das condições que envolvem o DMO da DRC. Neste modelo, a QTS-Fe(III)R, polímero derivado da quitina, teve efeito quelante de fósforo similar aos tratamentos disponíveis, com redução da CV.

A QTS-Fe(III)R é um polímero capaz de se ligar ao fósforo, que, testado em ratos com hiperfosfatemia induzida pelo acréscimo de fósforo na água e em ratos diabéticos, se mostrou eficaz na redução do fósforo desses animais [23,24]. Em

modelos de DRC, onde o fósforo é retido devido ao déficit de excreção, secundário a redução da massa renal funcionante, este quelante ainda não havia sido estudado. Além do baixo custo e da potencial efetividade em eliminar o fósforo, a QTS-Fe(III)R possui outras vantagens, como ausência de toxicidade e de não conter cálcio na composição [22], por isso, decidimos testá-la em modelo experimental de uremia.

Na indução da nefrite túbulo-intersticial administramos a dose utilizada por Yokozawa (1986) [30] seguida da adaptação sugerida por Damment (2011) [25]. Com o esquema de 4 semanas de adenina 0,75% seguida da alteração para 0,10% por 3 semanas, tentamos manter a lesão por mais tempo sem que os animais perdessem muito peso ou que houvesse aumento da mortalidade [31]. Sabe-se que o fósforo tem papel importante na progressão da DRC e na promoção da calcificação vascular, sendo assim, incluímos ainda concentração ligeiramente mais elevada de fósforo (1%) na ração oferecida aos animais [4,8,19]. Tanto a extensão do tempo de oferta de ração com adenina, quanto o aumento do aporte dietético de P tinham como objetivo aumentar a possibilidade de surgimento do DMO e de CV [25,32]. Com esta modificação na concentração de adenina, encontramos redução de peso e de consumo de ração no período de uso de adenina 0,75%, porém com menor perda de peso e aumento no consumo de ração ao final do experimento. Estes resultados são semelhantes aos descritos por outros autores [19,25,31]. Como descrito anteriormente, mostramos que, neste modelo, nenhum dos quelantes testados modificou a progressão da doença avaliada pela creatinina [19,25,33,34].

Optamos por iniciar o tratamento após 3 semanas de indução da DRC para mimetizar o tratamento conservador [35-37]. Apesar de o grupo DRC apresentar hiperfosfatemia, nenhum dos tratamentos reduziu os níveis de fósforo e FeP de forma significativa ao final do experimento. Ainda assim, os grupos com DRC

tratados apresentaram valores semelhantes de fósforo e FeP aos animais normais na semana 7, o que nos leva a crer que a lesão não foi acentuada o suficiente para que encontrássemos reduções significativas ou que haveria necessidade de um período maior de tratamento. Mesmo assim, neste contexto, a QTS-Fe(III)R se comportou da mesma forma que os outros quelantes já utilizados na prática. Apesar do cálcio sérico do grupo DRC ter sido mais elevado, o tratamento com os quelantes de fósforo não teve influência significativa sobre esse parâmetro [31].

Os níveis de fósforo são mantidos inicialmente pela ação do FGF-23 e do paratormônio (PTH) [38]. Uma das consequências do aumento do FGF-23 é a elevação da FeP, mecanismo subjacente que pode reduzir o fósforo sérico [33]. De fato, estudos anteriores com modelo de adenina, notaram que em 4 semanas, observa-se valores elevados de FGF-23 em associação à FeP elevada [19,36]. Encontramos este padrão no grupo DRC nos dois pontos de observação, porém, os tratamentos com os quelantes não reduziram os níveis de FGF-23. Entretanto a redução dos níveis de FGF-23 secundária ao uso de quelantes de fósforo nem sempre é observada [33,36].

Os marcadores bioquímicos fosfatase alcalina e PTH, apesar de tradicionalmente vinculados ao processo de remodelação óssea, podem estar associados com a ocorrência de CV [4,8]. Os níveis de PTH e fosfatase alcalina apresentaram-se elevados no grupo com DRC, enquanto os tratamentos com QTS e CaCO_3 tenderam a reduzi-los. A variação dos valores intra-grupo do PTH em modelos experimentais de DRC é frequente [20,27,36,37], o que pode ser responsável por não termos encontrado diferenças significativas após os tratamentos.

Apesar de frequente em pacientes, e associada a piores desfechos clínicos, a reprodução da CV em modelos experimentais de DRC é mais difícil de ser reproduzida [32]. Dentre os modelos em que se observa maior prevalência de CV, provavelmente devido a maior intensidade do DMO, é os que utilizam adenina. Porém, a extensão e ocorrência das lesões vasculares são diretamente relacionadas ao tempo e intensidade da disfunção renal e do excesso de fósforo na dieta [35,39]. Os animais com DRC apresentaram recuperação parcial da função renal, porém, ao final de 7 semanas, pudemos observar CV pela coloração de Von Kossa e elevado conteúdo de Ca na aorta. Em modelo de adenina 0,75%, há relatos CV importante de pelo Von Kossa num período de 8 semanas, porém os animais apresentavam valores de creatinina de 2 a 4 vezes superior ao do nosso modelo [34,35,37]. Esta ausência de lesão vascular mais estabelecida pode ser também responsável pela inexistência de aumento da expressão de Angioll e da redução da α -actina nos vasos.

Consideramos que neste contexto que ausência de alterações pronunciadas, a avaliação semi-quantitativa da morfologia vascular torna-se relevante. O grupo com DRC que foi tratado com QTS mostrou alterações da parede vascular menos acentuadas, evidenciadas pela maior frequência de animais com escores menos graves, e, portanto classificados com doença menos avançada. Este mesmo padrão foi encontrado na avaliação do conteúdo de cálcio na aorta.

Na tentativa de reduzir a mortalidade, as alterações induzidas pelo modelo foram provavelmente menos acentuadas para alcançar reproduzir as lesões vasculares necessárias para evidenciar o benéfico dos tratamentos. A recuperação da creatinina para valores apenas o dobro do normal é o melhor indicativo deste padrão. Esta limitação poderia ser corrigida com um maior tempo de experimento.

Frente à lesão pouco pronunciada, a coleta de todo o tecido da aorta para uma avaliação geral da calcificação, assim como realizado por outros autores [8,40], poderia ter aumentado o percentual de lesões encontradas. Ainda assim, tentamos padronizar o local de coleta do fragmento da aorta utilizado para a coloração de Von Kossa.

Concluimos que o modelo de DRC foi reproduzido, porém com menor disfunção renal. A QTS-Fe(III)R apresentou efeito quelante de fósforo neste contexto, semelhante aos demais já utilizados na prática clínica. Apesar da CV não ter sido tão acentuada, o tratamento com QTS reduziu o conteúdo de cálcio na aorta e as alterações morfológicas vasculares moderadas e graves.

Figuras e legendas

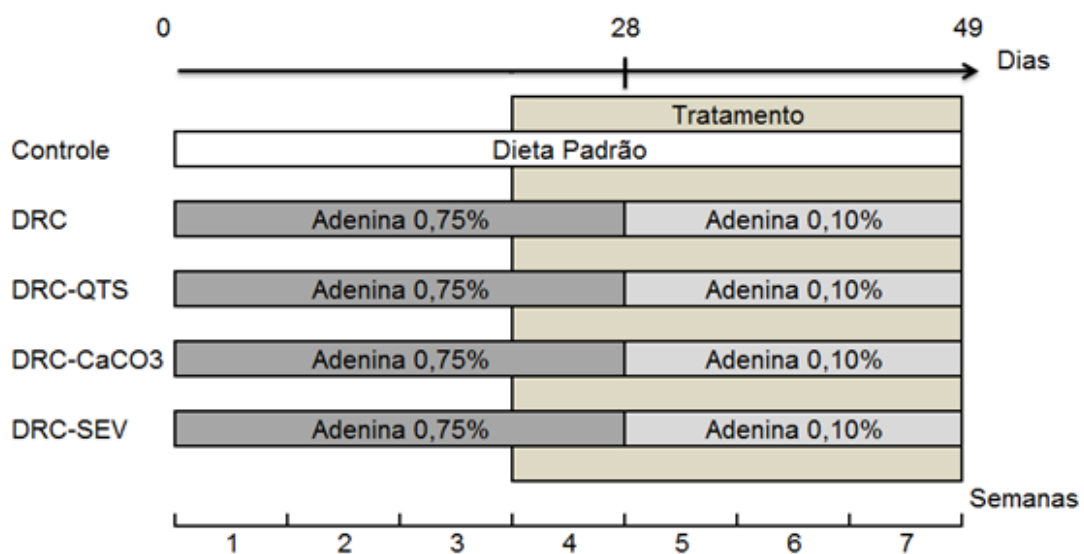


Figura 1. Desenho do estudo.

Tabela 1. Parâmetros metabólicos e bioquímicos dos grupos CONTROLE e DRC, nas semanas 4 e 7.

Parâmetros	Semana 4	Semana 7
Peso (g)		
CONTROLE	265,4±14,9	283,1±14,5
DRC	138,6±10,5*	190,7±25,8*
Consumo de ração (g)		
CONTROLE	18,5±2,6	18,9±2,7
DRC	13,3±3,4*	16,1±2,4*
Creatinina sérica (mg/dL)		
CONTROLE	0,41±0,21	0,47±0,26
DRC	1,64±0,26*	0,96±0,21*
Fósforo sérico (mg/dL)		
CONTROLE	7,11±0,71	6,82±0,53
DRC	14,70±4,87*	10,60±2,49*
Fração excretada de fósforo (%)		
CONTROLE	14,79±9,70	20,07±16,82
DRC	57,44±45,26*	71,57±20,22*
Cálcio sérico (mg/dL)		
CONTROLE	9,45±1,10	8,42±1,10
DRC	10,74±1,73	10,43±1,85*
Fosfatase Alcalina (U/L)		
CONTROLE	212,62±59,64	205,7±62,39
DRC	452,71±153,43*	561,0±90,90*
PTH (pg/dL)		
CONTROLE	214,84±53,31	272,30±192,22
DRC	3.769,40±1.693,62*	5.940,20±5.740,35
FGF-23 (pg/dL)		
CONTROLE	6,85±0,60	7,42±1,96
DRC	34,69±57,90	14,50±8,70

Dados mostrados como média ± desvio padrão (n=8). Teste t de Student para comparação entre os grupos. *p<0,05 vs. CONTROLE. As dosagens de PTH e FGF-23 foram realizadas em 5 animais de cada grupo.

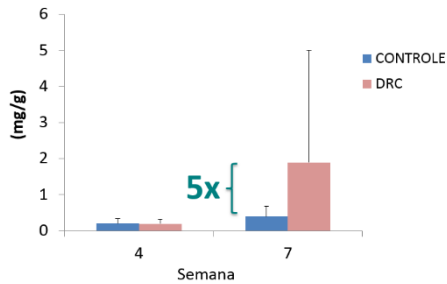
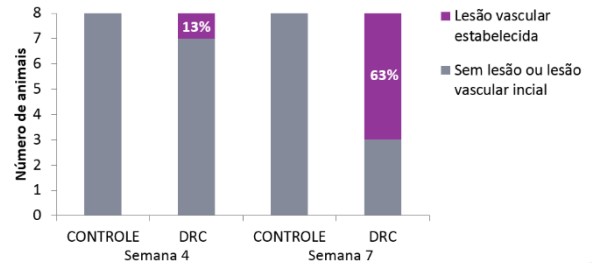
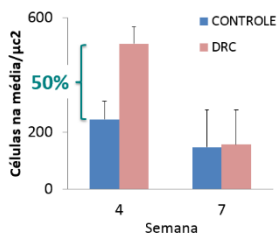
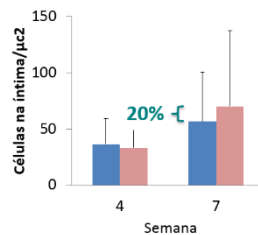
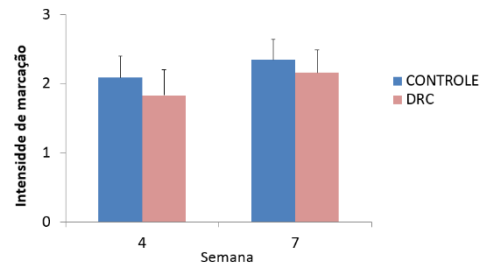
A Conteúdo de cálcio na aorta**B** Alterações vasculares e calcificações**C** Angioll na média**D** Angioll na íntima**E** α-actina do músculo liso

Figura 2. Avaliação da calcificação vascular dos grupos CONTROLE e DRC nas semanas 4 e 7. (A) Conteúdo de cálcio na aorta abdominal expresso em mg de cálcio/g de tecido. Média \pm desvio padrão (n=6). (B) Prevalência de alterações vasculares nos animais classificados como sem lesão ou lesão vascular inicial ou como lesão vascular estabelecida (n=8). (C) Média de células com expressão de Angioll na camada média por micrômetro quadrado. Média \pm desvio padrão (n=5). (D) Média de células com expressão de Angioll na camada íntima por micrômetro quadrado. Média \pm desvio padrão (n=5). (E) Média do escore de intensidade da expressão de α -actina. Média \pm desvio padrão (n=5).

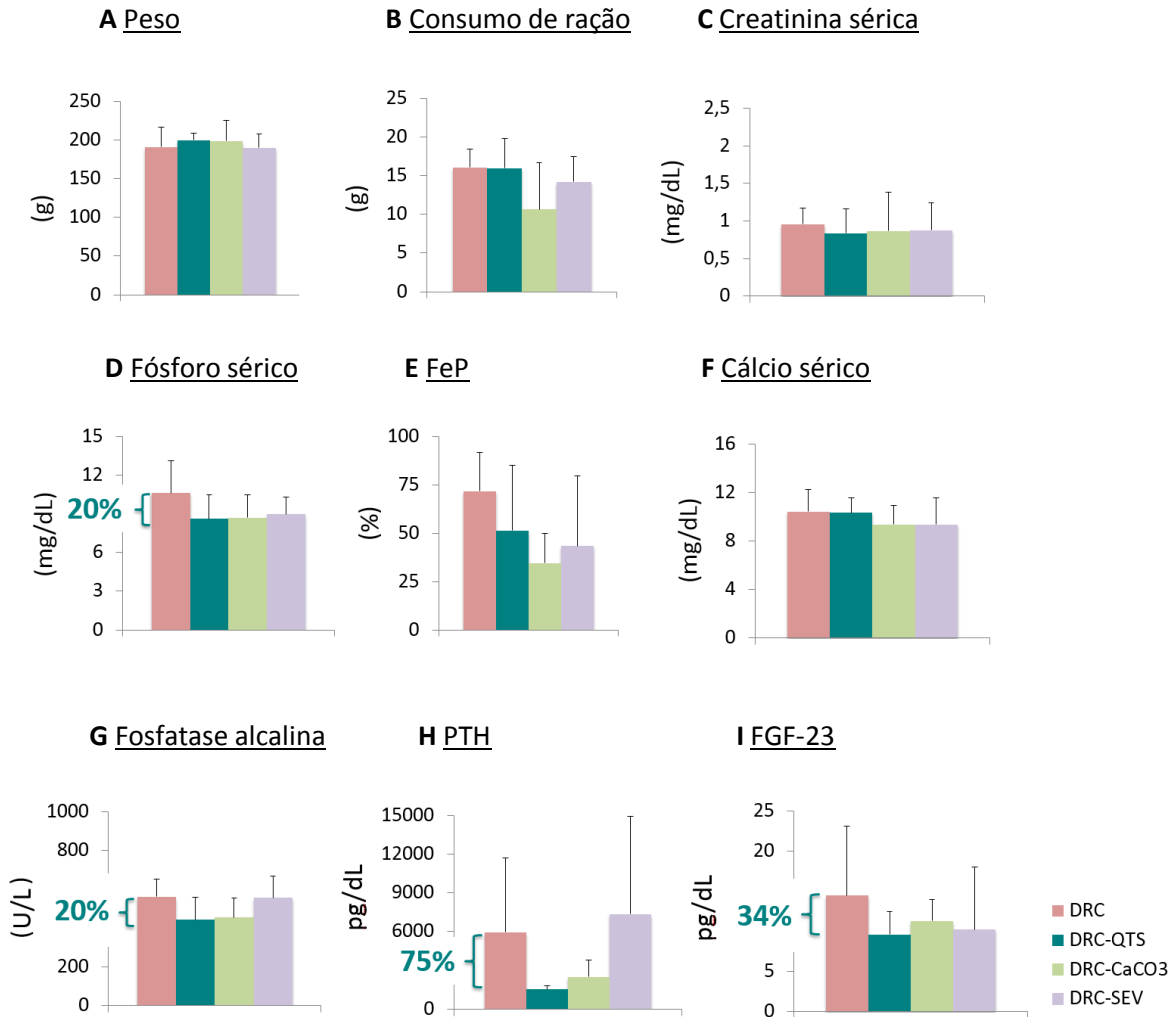


Figura 3. Parâmetros metabólicos e bioquímicos dos grupos DRC, DRC-QTS, DRC-CaCO₃ e DRC-SEV ao final de 7 semanas. (A) Peso (g). (B) Consumo de ração obtido em gaiola metabólica (g). (C) Creatinina sérica (mg/dL). (D) Fósforo sérico (mg/dL). (E) FeP (Fração excretada de fósforo) (%). (F) Cálcio sérico (mg/dL). (G) Fosfatase alcalina (U/L). (H) PTH (Paratormônio) (pg/dL). (I) FGF-23 (Fator de crescimento de fibroblastos-23) (pg/dL). Média ± desvio padrão (n=8).

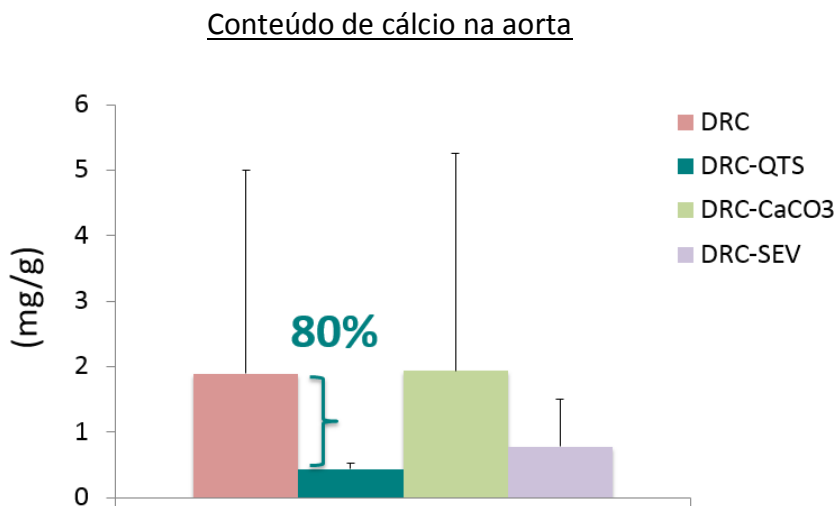
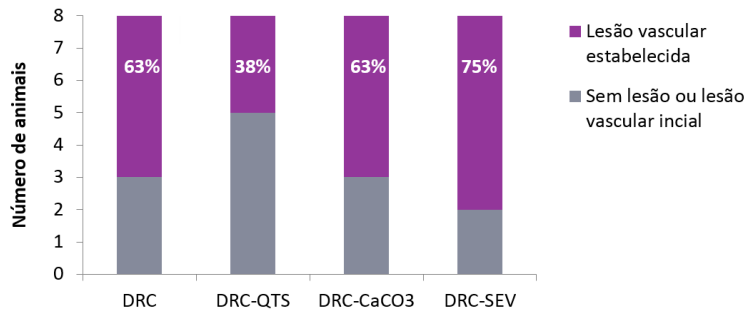
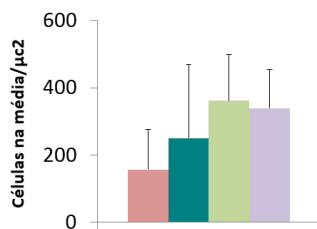


Figura 4. Conteúdo de cálcio na aorta abdominal expresso em mg de cálcio/g de tecido dos grupos DRC, DRC-QTS, DRC-CaCO₃ e DRC-SEV ao final de 7 semanas. Média \pm desvio padrão (n=6).

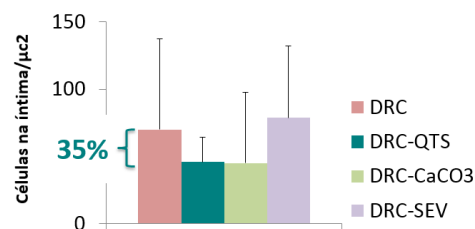
A Alterações vasculares e calcificações



B Angioll na média



C Angioll na íntima



D α-actina do músculo liso

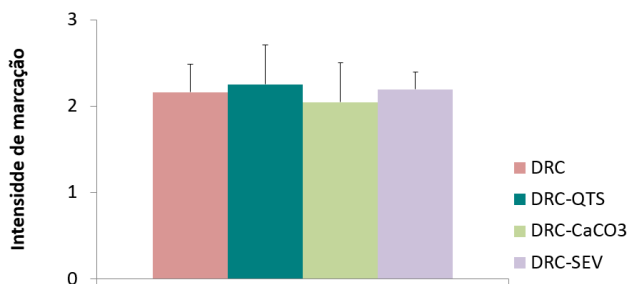


Figura 5. Parâmetros de avaliação da calcificação vascular dos grupos DRC, DRC-QTS, DRC-CaCO₃ e DRC-SEV ao final de 7 semanas. (A) Prevalência de alterações vasculares nos animais classificados como sem lesão ou lesão vascular inicial ou como lesão vascular estabelecida. Média ± desvio padrão (n=6). (B) Média de células com expressão de Angioll na camada média por micrômetro quadrado. Média ± desvio padrão (n=5). (C) Média de células com expressão de Angioll na camada íntima por micrômetro quadrado. Média ± desvio padrão (n=5). (D) Média do escore de intensidade da expressão de α-actina. Média ± desvio padrão (n=5).

Referências

1. CHEN, J. Y. et al. Increased aortic stiffness and attenuated lysyl oxidase activity in obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 4, p. 839-846, 2013.
2. SAGE, A. P.; TINTUT, Y.; DEMER, L. L. Regulatory mechanisms in vascular Calcification. **Nature Reviews Cardiology**, v. 7, p. 528-536. 2010.
3. STAUDE, H. et al. Cardiovascular Risk and Mineral Bone Disorder in Patients with Chronic Kidney Disease. **Kidney Blood Pressure Research**, v. 37, p. 68-83. 2013.
4. LAU, W.L. et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, p. 62-69. 2013.
5. JONO, S. et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. **Circulation Research**, v. 87, p. 10-17. 2000.
6. MUNE, S. Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis. **Clinical and Experimental of Nephrology**, v. 13, p. 571–577. 2009.
7. TINTUT, Y. et al. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells: potential signaling pathway for vascular calcification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 7547-7553. 1998.
8. EL-ABBADI, M. M. et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. **Kidney International**, v. 75, p. 1297–1307. 2009.
9. GIACHELLI, C. M. Vascular Calcification: In Vitro Evidence for the Role of Inorganic Phosphate. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, Suppl. 4, p. S300-S304. 2003.
10. ASKAR, A.M. Hyperphosphatemia. The hidden killer in chronic kidney disease. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 1, p. 13-19. 2015.
11. STEITZ, S.A. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification. **Circulation Research**, v. 89, p. 1147-1154. 2001.
12. PARK, S.; LAKATTA, E.G. Role of inflammation in the pathogenesis of arterial stiffness. **Yonsei Medical Journal**, v. 53, n. 2, p. 258-61. 2012.
13. MONTEZANO, A.C. et al. Angiotensin II and Vascular Injury. **Current Hypertension Reports**, v. 16, p. 431. 2014.
14. PACURARI, M. et al. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. **International Journal of Inflammation**, v. 2014, p. 1-13. 2014.

15. KDIGO 2009 - Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease – KDIGO on line – Disponível em www.kdigo.org. Acessado em 18/03/2013.
16. DI IORIO, B.; BELLASI, A.; RUSSO, D. Mortality in Kidney Disease Patients Treated with Phosphate Binders: A Randomized Study. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, p. 487–493. 2012.
17. PHAN, O. et al. Effect of oral calcium carbonate on aortic calcification in apolipoprotein E-deficient (apoE^{-/-}) mice with chronic renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 1, p. 82-90. 2008.
18. HILL K.M. et al. Oral calcium carbonate affects calcium but not phosphorus balance in stage 3-4 chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 83, p. 959–966. 2013.
19. PHAN, O. et al. PA21, a New Iron-Based Noncalcium Phosphate Binder, Prevents Vascular Calcification in Chronic Renal Failure Rats. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 346, p. 281–289. 2013.
20. IIDA, A. et al. Ferric citrate hydrate, a new phosphate binder, prevents the complications of secondary hyperparathyroidism and vascular calcification. **American Journal Nephrology**, v. 37, p. 346-358. 2013.
21. WILHELM, M. et al. The iron-based phosphate binder PA21 has potent phosphate binding capacity and minimal iron release across a physiological pH range in vitro. **Clinical Nephrology**, v. 81, p. 251-258. 2014.
22. BAXTER, J. et al. Effect of Iron (III) Chitosan on the Reduction of Serum Phosphorus in Rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, p.863-874. 2000.
23. BÜRGER, C. et al. Cross-linking chitosan-Fe(III), an oral phosphate binder: studies in vitro and in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 223, p. 29–33. 2001.
24. SCHONINGER, L. M. et al. Chitosan Iron(III) Reduces Phosphorus Levels in Alloxan Diabetes-Induced Rats with Signs of Renal Failure Development. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 467-471. 2010.
25. DAMMENT, S.J.P. Pharmacology of the Phosphate Binder, Lanthanum Carbonate. **Renal Failure**, v. 33, n. 2, p. 217–224. 2011.
26. BEHETS, G. J. et al. Effects of Efficient Phosphate Binding on Bone in Chronic Renal Failure Rats. **Renal Failure**, v. 27, p. 475–484. 2005.

27. FERRARI, S.L.; BONJOUR, J. P.; RIZZOLI, R. Fibroblast growth factor 23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 3, p. 1519–1524. 2005.
28. MACCABE et al. Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 83, p. 835-844. 2013.
29. CUSTÓDIO, M.R. et al. Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: impact on cardiovascular system. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, p. 1437-1445. 2012.
30. YOKOZAWA, T. et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. **Nephron**, v. 44, p. 230-234, 1986
31. YAMADA, S. et al. Phosphate Binders Prevent Phosphate-Induced Cellular Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Vascular Calcification in a Modified, Adenine-Based Uremic Rat Model. **Calcification Tissue International**, v. 96, p. 347–358. 2015.
32. SHOBEIRI, N.; ADAMS, M.A.; HOLDEN, R.M. Vascular Calcification in Animal Models of CKD: A Review. **American Journal of Nephrology**, v. 31, p. 471–481. 2010.
33. CHE, Y. et al. High phosphate feeding induced arterial medial calcification in uremic rats: Roles of Lanthanum carbonate on protecting vasculature. **Life Sciences**, v. 93, p. 646–653. 2013.
34. NEVEN, E. et al. Adequate phosphate binding with lanthanum carbonate attenuates arterial calcification in chronic renal failure rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, p. 1790–1799. 2009.
35. KATSUMATA, K. et al. Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. **Kidney International**, v. 64, p. 441–450. 2003.
36. DE SCHUTTER, T.M. et al. Effect of a magnesium-based phosphate binder on medial calcification in a rat model of uremia. **Kidney International**, advance online publication 13.Mar., p. 1-9. 2013.
37. SETO, T.; HAMADA, C.; TOMINO, Y. Suppressive effects of iron overloading on vascular calcification in uremic rats. **Journal of Nephrology**, v. 27, p. 135–142. 2014.
38. ISAKOVA, I. et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 79, p. 1370-1378. 2011.

39. TAMAGAKI, Keiichi et al. Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, p.651-659, 2006.
40. TERAJ, K. et al. Vascular calcification and secondary hyperparathyroidism of severe chronic kidney disease and its relation to serum phosphate and calcium levels. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 1267–1278. 2009.

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, reproduzimos o modelo de uremia por adição de adenina à dieta, ainda que com menor disfunção renal, os animais apresentaram hiperfosfatemia e hiperfosfatúria. Conseguimos demonstrar que a redução da densidade óssea dos animais com DRC, utilizando a técnica de radiografia digital, se correlaciona com o aumento de marcadores bioquímicos do DMO.

Concluimos também que a QTS-Fe(III)R apresenta efeito quelante de fósforo análogo aos quelantes CaCO_3 e Cl-Sev neste modelo. Apesar da CV não ter sido tão acentuada nos animais urêmicos, o tratamento com QTS-Fe(III)R reduziu o conteúdo de cálcio na aorta e as alterações morfológicas vasculares moderadas e graves.

A utilização de quelantes de fósforo não apresentou benefícios sobre a integridade dos vasos quando avaliamos a expressão de Angioll e α -actina.

REFERÊNCIAS

- ADENEY, K.L. et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, p. 381-387. 2009.
- ANDERSON, J. W.; NICOLOSI R. J.; BORZELLECA, J. F. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 187-201. 2005.
- ARAUJO et al., Novo perfil da osteodistrofia renal em amostras de pacientes de diferentes regiões do Brasil. In: **Atualidades em Nefrologia**, n. 6. 2000.
- ARAUJO, S. M. A. H. et al. The renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: an overview. **Kidney International**, v. 63, n. 85, p. S54–S56. 2003.
- ASBMR** - American Society for Bone and Mineral Research. Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed. Washington (DC): ASBMR; 2006.
- ASKAR, A.M. Hyperphosphatemia. The hidden killer in chronic kidney disease. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 1, p. 13-19. 2015.
- AYODELE, O. E., ALEBIOSU, C. O. Burden of Chronic Kidney Disease: An International Perspective. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 17, p. 215-224. 2010.
- BARBOSA, D. et al. Terapia laser no reparo ósseo em ratos: análise da densidade óssea óptica. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 71-74. 2014.
- BAXTER, J. et al. Effect of Iron (III) Chitosan on the Reduction of Serum Phosphorus in Rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, p.863-874. 2000.
- BEHETS, G. J. et al. Effects of Efficient Phosphate Binding on Bone in Chronic Renal Failure Rats. **Renal Failure**, v. 27, p. 475–484. 2005.
- BELLASI, A. et al. Chronic kidney disease progression and outcome according to serum phosphorus in mild-to-moderate kidney dysfunction. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 4, p. 883-891. 2011.
- BELLASI, A.; KOOIENGA, L.; BLOCK, G. A. Phosphate binders: New products and challenges. **Hemodialysis International**, v. 10, p. 225–234. 2006.
- BERNDT, T.J.; SCHIAVI, S.; KUMAR, R. “Phosphatonins” and the regulation of phosphorus homeostasis. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v. 289, p. 1170-1182. 2005.
- BLOCK G. A. et al. Association of serum phosphorus and calcium×phosphorus product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 31, p. 607–617. 1998.

BLOCK G.A. et al. Mineral metabolism, mortality and morbidity in maintenance hemodialysis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 2208–2218. 2004.

BLOCK, G. A. et al. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. **Kidney International**, v. 68, p. 1815–1824. 2005.

BLOCK, G. A. et al. Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients. *Kidney International*, v. 71, p. 438–441. 2007.

BRASIL. Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de homeostasis. **Ministério da Saúde**. Brasília, DF, 2011.

BREZINA, B.; QUNIBI, W. Y.;NOLAN, C. R. Acid loading during treatment with sevelamer hydrochloride: Mechanisms and clinical implications. **Kidney International**, v. 66, n. 90, p. S39–S45. 2004.

BÜRGER, C. et al. Cross-linking chitosan-Fe(III), an oral phosphate binder: studies in vitro and in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 223, p. 29–33. 2001.

BYON , C.H. et al. Oxidative Stress Induces Vascular Calcification through Modulation of the Osteogenic Transcription Factor Runx2 by AKT Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 22, p. 15319-15327. 2008.

CAI, Y. et al. Intermedin inhibits vascular calcification by increasing the level of matrix g-carboxyglutamic acid protein. **Cardiovascular Research**, v. 85, p. 864–873. 2010.

CAMPBELL, A. The potencial role of aluminium in Alzheimer disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 2, p. 17-20. 2002.

CANCELA, A. L. et al. Phosphorus Is Associated with Coronary Artery Disease in Patients with Preserved Renal Function. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e3688. 2012.

CARAVACA, F. et al. Relationship between serum phosphorus and the progression of advanced chronic kidney disease. **Nefrologia**, v. 31, n. 6, p. 707-715. 2011.

CARMONA et al. Induction of systemic inflammation and thickening of subepicardial arteries in an animal model of uremia. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 4, p. 408-412. 2011.

CARVALHO, A. B. et al. Adendo das Diretrizes Brasileiras de Prática Clínica para o Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica Capítulo 2. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 2, p. 199-205. 2012.

CASTRO, B.B.A. et al. Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 139-149. 2014.

CENSO SBN – Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia de 2012. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/pdf/publico2012.pdf> Acessado: 05/03/2014.

CHEN, J. Y. et al. Increased aortic stiffness and attenuated lysyl oxidase activity in obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 4, p. 839-846, 2013.

CHERTOW, G. M. et al. Determinants of progressive vascular calcification in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, p. 1489-1496. 2004.

CHERTOW, G. M.; BURKE, S. K.; RAGGI, P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 62, p. 245–252. 2002.

CHILLON, J. M. et al. Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications: role of uremic toxicity. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 67, p. 234-240. 2009.

CHUE, C. D. et al. Serum phosphate is associated with left ventricular mass in patients with chronic kidney disease: a cardiac magnetic resonance study. **Heart**, v. 98, p. 219-224. 2012.

CICERI, P. et al. Lanthanum Prevents High Phosphate-Induced Vascular Calcification by Preserving Vascular Smooth Muscle Lineage Markers. **Calcified Tissue International**, v. 95, p. 521–530. 2013.

CUSTÓDIO, M.R. et al. Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: impact on cardiovascular system. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, p. 1437-1445. 2012.

DAMMENT, S.J.P. Pharmacology of the Phosphate Binder, Lanthanum Carbonate. **Renal Failure**, v. 33, n. 2, p. 217–224. 2011.

DE SANTO N.G. et al. Sevelamer worsens metabolic acidosis in hemodialysis patients. **Journal of Nephrology**, v. 19, n. 9, p. S108-114. 2006.

DE SCHUTTER, T.M. et al. Effect of a magnesium-based phosphate binder on medial calcification in a rat model of uremia. **Kidney International**, advance online publication 13.Mar., p. 1-9. 2013.

DESJARDINS, L. et al. FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages. **Osteoporosis International**, v. 23, p. 2017–2025. 2012.

DHORE, C. R. et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 1998-2003. 2001.

DI IORIO, B.; BELLASI, A.; RUSSO, D. Mortality in Kidney Disease Patients Treated with Phosphate Binders: A Randomized Study. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, p. 487–493. 2012.

DUCY, P. et al. *Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation.* **Cell**, v. 89, p. 747-754. 1997.

EKNOYAN, G. et al. The burden of kidney disease: improving global outcomes. **Kidney international**, v. 66, p. 1310-1314. 2004.

EKNOYAN, G.; LEVIN, A.; LEVIN, N. W. Bone metabolism and disease in chronic kidney disease. **J. Kidney Dis.**, v. 42, p. S1-S201. 2003.

EL-ABBADI, M. M. et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. **Kidney International**, v. 75, p. 1297–1307. 2009.

FERRARI, G.O. Efeito da associação do carbonato de magnésio com acetato de cálcio (OSVAREN) no controle do fósforo, no hiperparatireoidismo secundário e no remodelamento ósseo em ratos urêmicos. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

FERRARI, S.L.; BONJOUR, J. P.; RIZZOLI, R. Fibroblast growth factor 23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 3, p. 1519–1524. 2005.

FERRARIO, C.M.; STRAWN, W.B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 1, p. 121-128. 2006.

FINK, H.A. et al. Screening for, Monitoring, and Treatment of Chronic Kidney Disease Stages 1 to 3: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force and for an American College of Physicians Clinical Practice Guideline. **Annals of Internal Medicine**, v. 156, n. 8, p. 570-581. 2012.

FOLEY, R.N. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, p. 397-404. 2009.

FOLEY, R.N.; PARFREY, P.S.; SARNAK, M.J. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, Suppl. 12, p. S16–S23. 1998.

FREEDMAN, B.I. et al. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) gene polymorphisms are associated with inverse relationships between vascular calcification and BMD: the Diabetes Heart Study. **J Bone Miner Res**, v. 24, p. 1719–1727. 2009.

- GANESH, S.K. et al. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 10, p. 2131-2138. 2001.
- GIACHELLI, C. M. Vascular Calcification: In Vitro Evidence for the Role of Inorganic Phosphate. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, Suppl. 4, p. S300-S304. 2003.
- GIACHELLI, C.M. The emerging role of phosphate in vascular calcification. **Kidney International**, v. 75, p. 890-897. 2009.
- GOLDSMITH, D. et al. Vascular calcification in long-term haemodialysis patients in a single unit: a retrospective analysis. **Nephron**, v. 77, p. 37-43. 1997.
- GOODMAN, W.G. et al. Vascular calcification in chronic kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 43, p. 572-579. 2004.
- GUÉRIN, A. et al. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 15, p. 1014-1021. 2000.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed. 2006.
- HERGESELL, O.; RITZ, E. Phosphate binders on iron basis: a new perspective? **Kidney International**, v. 56, p. 42-45. 1999.
- HILL K.M. et al. Oral calcium carbonate affects calcium but not phosphorus balance in stage 3-4 chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 83, p. 959–966. 2013.
- HOSAKA, N. et al. Elastin Degradation Accelerates Phosphate-Induced Mineralization of Vascular Smooth Muscle Cells. **Calcified Tissue International**, v. 85, p. 523–529. 2009.
- HOUSTON, J. et al. Associations of dietary phosphorus intake, urinary phosphate excretion and fibroblast growth factor 23 with vascular stiffness in CDK. **Journal of Renal Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 12-20. 2013.
- HSU, C. H., PATEL, S. R., YOUNG, E. W. New phosphate binding agents: ferric compounds. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, p. 1274–80. 1999.
- IIDA, A. et al. Ferric citrate hydrate, a new phosphate binder, prevents the complications of secondary hyperparathyroidism and vascular calcification. **American Journal Nephrology**, v. 37, p. 346-358. 2013.
- ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 326-31. 1998.
- IMANISHI, Y. et al. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. **Kidney International**, v. 65, p. 1943–1946. 2004.

IR, A.S. et al. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1296-1305. 2004.

JEAN, G. et al. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF-23) are associated with increased mortality in long hemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, p. 2792–2796. 2009.

JEAN, G. et al., Peripheral vascular calcification in long-haemodialysis patients: associated factors and survival consequences. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, p. 948–955. 2009a.

JIA, G. et al. Role of matrix Gla protein in angiotensin II-induced exacerbation of vascular calcification. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, n. 5, p. H523– H532. 2012.

JIMBO, R. et al. Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. **Kidney International**, v. 85, p. 1103–1111. 2014.

JONES, D. S.; MAWHINNEY, H. J. (2006) Chitosan. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S.C. (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, fifth ed. American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Press, p. 159–162. London, p. 15–36 (Capítulo 3).

JONO, S. et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. **Circulation Research**, v. 87, p. 10-17. 2000.

K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **American Journal Kidney Disease**, v. 39, n. 2, p. 1-246. 2002.

KALANTAR-ZADEH, K. et al. Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 70, p. 771-780. 2006.

KANBAY, M. et al. Phosphate: the silent stealthy cardiorenal culprit in all stages of chronic kidney disease: a systematic review. **Blood Purification**, v. 27, p. 220-230. 2009.

KDIGO 2009 - Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease – KDIGO on line – Disponível em www.kdigo.org. Acessado em 18/03/2013.

KESTENBAUM, B. et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 2, p. 520-528. 2005.

KETELLER, M.; GIACHELLI, C. Novel insights into vascular calcification. **Kidney International**, v. 70, p. 5–9. 2006.

KETTELER, M. Phosphate metabolism in CKD Stages 3–5: Dietary and pharmacological control. **International Journal of Nephrology**, v. 2011, p. 1-6. 2011.

KOVESDY, C.P.; ANDERSON, J.E.; KALANTAR-ZADEH, K. Outcomes associated with serum phosphorus level in males with non-dialysis dependent chronic kidney disease. **Clinical Nephrology**, v. 73, n. 4, p. 268-275. 2010.

KRASINSKI, K. et al. In vivo blockade of tumor necrosis factor- α accelerates functional endothelial recovery after balloon angioplasty. **Circulation**, v. 104, n. 15, p. 1754–1756. 2001.

LARSSON, T. et al. Circulating concentration of FGF-23 increases as a renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. **Kidney International**, v. 64, p. 2272–2279. 2003.

LAU, W.L. et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, p. 62-69. 2013.

LEVEY, A.B.S. et al. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 2, p. 137-147, 2003.

LEVEY, A.B.S.; CORESH, J. Chronic kidney disease. **The Lancet**, v.379, n. 14, p. 165-180. 2012.

LI, X., YANG, H.Y., GIACHELLI, C.M. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. **Circulation Research**. v. 98, n. 7, p. 905–912. 2006.

LOCATELLI, F. et al. Management of disturbances of calcium and phosphate metabolism in chronic renal insufficiency with emphasis on the control of hyperphosphatemia. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 723-731. 2002.

LOGHMAN-ADHAM, M. Safety of new phosphate binders for chronic renal failure. **Drug Safety**, v. 26, n. 15, p. 1093-1115. 2003.

LONDON, G. et al. Arterial structure and function in end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 17, p. 1713-1724. 2002.

LÓPEZ, I. et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. **Kidney International**, v. 80, p. 475–482. 2011.

LUNDGREN E, et al. Increased cardiovascular mortality and normalized serum calcium in patients with mild hypercalcemia followed up for 25 years. **Surgery**, v. 130, p. 978-985. 2001.

MACCABE et al. Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 83, p. 835–844. 2013.

MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E.L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 7, p. 367-374. 2008.

MCINTYRE, C. W. et al. Iron-magnesium hydroxycarbonate (fermagate): a novel non-calcium-containing phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic hemodialysis patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.4, n. 2, p. 401-409. 2009.

MITTMAN, N. et al. Treatment of secondary hyperparathyroidism in ESRD: a 2-year, single-center crossover study. **Kidney International**, v. 78, Suppl. 117, p. S33-S36. 2010.

MOE, S. M. et al. A Rat Model of Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder (CKD-MBD) and the Effect of Dietary Protein Source. **Kidney International**, v. 75, n. 2, p. 176-184. 2009.

MOE, S.M. et al. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease–mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, p. 2672–2681. 2011.

MOE, S.M.; CHEN, N. X. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19. p. 213-216. 2008.

MONTEZANO, A.C. et al. Angiotensin II and Vascular Injury. **Current Hypertension Reports**, v. 16, p. 431. 2014.

MUNE, S. Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis. **Clinical and Experimental of Nephrology**, v. 13, p. 571–577. 2009.

NAGANO, N. et al. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF12 in renal failure rats. **Kidney International**, v. 69, p. 531–537. 2006.

NAKAI, K.; KOMABA, H.; FUKAGAWA, M. New insights into the role of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. **Journal of Nephrology**, v. 23, n. 6, p. 619-625. 2010.

NAKANO, T. et al. Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama Study. **American Journal of Kidney Diseases**, v.55, n.1, p. 21-30. 2010.

- NEGRI, A.L. Phosphate binders, cardiovascular calcifications and mortality: do we need another survival study with sevelamer? **Journal of Nephrology**, v. 23, n. 6, p. 653-657. 2010.
- NEVEN, E. et al. Adequate phosphate binding with lanthanum carbonate attenuates arterial calcification in chronic renal failure rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, p. 1790–1799. 2009.
- NEVES, K. R. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. **Kidney International**, v. 66, n. 6, p. 2237-2244. 2004.
- NEVES, M.F. et al. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, n. 11, p. 999-1006. 2005.
- NGUY, L. et al. Vascular function in rats with adenine-induced chronic renal failure. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, p. 1426-1435. 2012.
- NGUYEN, G. et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 11, 1417-1427. 2002.
- O'NEILL, W. C.; HARDCASTLE, K. I. The chemistry of thiosulfate and vascular calcification. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, p. 521–526. 2012.
- OHNISHI, M.; RAZZAQUE, M. Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging. **FASEB J.** v. 24, p. 3562–3571. 2010.
- OLIVEIRA, R. B. et al. Early Control of PTH and FGF23 in Normophosphatemic CKD Patients: A New Target in CKD-MBD Therapy? **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, p. 286-291. 2010.
- OLIVEIRA, R.B. et al. Calcificação vascular em doença renal crônica: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 2, p. 147-161. 2013.
- OMS. World health statistics 2013. **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS.** 2013 Disponível em: <http://www.who.int/en/> Acesso em 02/03/2013
- OSAKO, M.K. et al. A Signaling With Renin–Angiotensin System in Vascular Calcification. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, p. 1287-1296. 2013.
- OSAKO, M.K. et al. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. **Circulation Research**, v. 107, p. 466–475. 2010.

PACURARI, M. et al. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. **International Journal of Inflammation**, v. 2014, p. 1-13. 2014.

PANIZO, S. et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. **Circulation Research**, v. 104, p. 1041-1048. 2009.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 20, n. 2, p. 87-103. 2010.

PARK, S.; LAKATTA, E.G. Role of inflammation in the pathogenesis of arterial stiffness. **Yonsei Medical Journal**, v. 53, n. 2, p. 258-61. 2012.

PASCH, A. et al. Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. **Kidney International**, v. 74, p. 1444–1453. 2008.

PEACOCK, M. Calcium Metabolism in Health and Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, p. 23–30. 2010.

PELISEK, J. et al. Multiple biological predictors for vulnerable carotid lesions. **Cerebrovascular Diseases**, v. 28, n. 6, p. 601-610. 2009.

PENIDO, M.G.; ALON, U. S. Phosphate homeostasis and its role in bone health. **Pediatric Nephrology**, v. 27, p. 2039-2048. 2012.

PHAN, O. et al. Effect of oral calcium carbonate on aortic calcification in apolipoprotein E-deficient (apoE $^{-/-}$) mice with chronic renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 1, p. 82-90. 2008.

PHAN, O. et al. PA21, a New Iron-Based Noncalcium Phosphate Binder, Prevents Vascular Calcification in Chronic Renal Failure Rats. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 346, p. 281–289. 2013.

PIERIDES, A.M. et al. Hemodialysis encephalopathy with osteomalatic fractures and muscle weakness. **Kidney International**, v. 8, p. 115-124. 1980.

PRICE, P. A.; ROUBLICK, A. M.; WILLIAMSON, M. K. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. **Kidney International**, v. 70, p. 1577–1583. 2006.

PRUCHNICKI, M. et al. Effect of phosphate binders on supplemental iron absorption in healthy subjects. **Journal Clinical Pharmacology**, v.42, p.1171-1176. 2002.

PUEYO, M.E. et al. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 3, p. 645-651. 2000.

QUERFELD, U. The therapeutic potential of novel phosphate binders. **Pediatric Nephrology**, v. 20, p. 389-392. 2005.

QUINN, S.J.; WILLIAMS, G.H. Regulation of aldosterone secretion. **Annual Review of Physiology**, v. 50, p. 409-426. 1988.

RAGGI, P. et al. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients. A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, p. 695-701. 2002.

RAGGI, P. et al., Ten-Year Experience with Sevelamer and Calcium Salts as Phosphate Binders **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, p. S31–S40. 2010.

RAZZAQUE, M.S. Osteo-Renal Regulation of Systemic Phosphate Metabolism. **IUBMB Life**, v. 63, n. 4, p. 240–247. 2012.

RAZZAQUE, M.S. The FGF23–Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 11, p. 611–619. 2009.

REMUZZI, G.; BENIGNI, A.; REMUZZI, A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 288–296. 2006.

RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 4^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

RIZZOLI, R.; BONJOUR, J. P. Physiology of calcium and phosphate homeostasis. In: SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. **Dinamics of bone and cartilage metabolism**. Elsevier Inc. 2006.

RUSSO, D. et al. The progression of coronary artery calcification in predialysis patients on calcium carbonate or sevelamer. **Kidney International**, v. 72, n. 10, p. 1255-1261. 2007.

RUSSO, G.; LEOPOLD, J.A.; LOSCALZO, J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 259-269. 2002.

SAGE, A. P.; TINTUT, Y.; DEMER, L. L. Regulatory mechanisms in vascular Calcification. **Nature Reviews Cardiology**, v. 7, p. 528-536. 2010.

SARNAK, M.J. Cardiovascular complications in chronic kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 41, n. 6, p. 11-17. 2003.

SCHONINGER, L. M. et al. Chitosan Iron(III) Reduces Phosphorus Levels in Alloxan Diabetes-Induced Rats with Signs of Renal Failure Development. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 467-471. 2010.

SCHUCKER, J. J.; WARD, K. E. Hyperphosphatemia and phosphate binders. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, p. 2355-2361. 2005.

SCIALLA, J. J. et al. Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. **Kidney International**, v. 83, p. 1159–1168. 2013.

SCIALLA, J. J.; WOLF, M. Roles of phosphate and fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. **Nature Reviews/Nephrology**, v.10, p. 268-278. 2014.

SESSO, R. C. C. et al. Diálise Crônica no Brasil - Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2011. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 3, p. 272-277. 2012.

SESSO, R.; FERRAZ, M. B. Avaliação crítica do sevelamer no tratamento da hiperfosfatemia em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 103-108. 2003.

SETO, T.; HAMADA, C.; TOMINO, Y. Suppressive effects of iron overloading on vascular calcification in uremic rats. **Journal of Nephrology**, v. 27, p. 135–142. 2014.

SHANAHAN, C. M. et al. Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. **Circulation Research**, v. 109, p. 697-711. 2011.

SHANAHAN, C.M. et al. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. **Circulation**, v. 100, p. 2168-2176. 1999.

SHANAHAN, C.M. Vascular calcification. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 14, p. 361-367. 2005.

SHAO, J. et al. Inflammation and the Osteogenic Regulation of Vascular calcification: Review e Perspective. **Hypertension**, v. 55, n. 3, p. 579–592. 2010.

SHIGEMATSU, T. et al. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 44, n. 2, p. 250-256. 2004.

SHIMIZU, Y. et al. Removal of Phosphate Ions with a Chemically Modified Chitosan/Metal-Ion Complex. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, p. 1578-1583. 2008.

SHIOI, A. et al. Mönckeberg's medial sclerosis and inorganic phosphate in uremia. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 4, Suppl. 1, p. S47-S49. 2001.

SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y. Roles of hyperphosphatemia in vascular calcification. **Clinical calcium**, v. 19, p. 180–185. 2009.

SHOBEIRI, N. et al. Cardiovascular disease in an adenine-induced model of chronic kidney disease: the temporal link between vascular calcification and haemodynamic consequences. **Journal of Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 160–168. 2013.

SLATOPOLSKY et al. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic experimental renal insufficiency in the dog. **Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 3, p. 492–499. 1971.

SLATOPOLSKY et al. The control of phosphate excretion in uremia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 5, p. 672–677. 1966.

SLATOPOLSKY, E.; LIAPIS, H.; FINCH, J. Progressive accumulation of lanthanum in the liver of normal and uremic rats. **Kidney International**, v. 68, p. 2809-2813. 2005.

SPAIA, S. Phosphate binders: Sevelamer in the prevention and treatment of hyperphosphataemia in chronic renal failure. **Hippokratia**, v. 15, n. 1, p. 22-26. 2011.

SPIEGEL, D. M, BRADY, K. Calcium balance in normal individuals and in patients with chronic kidney disease on low- and high-calcium diets. **Kidney International**, v. 81, p. 1116-1122. 2012.

SPIEGEL, D. M. The role of magnesium binders in chronic kidney disease. **Seminars in Dialysis**, v. 20, n. 4, p. 333-336. 2007.

SPRAGUE, S. M. et al. Lanthanum Carbonate Reduces Phosphorus Burden in Patients with CKD Stages 3 and 4: A Randomized Trial. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 1, p. 178–185. 2009.

STAUDE, H. et al. Cardiovascular Risk and Mineral Bone Disorder in Patients with Chronic Kidney Disease. **Kidney Blood Pressure Research**, v. 37, p. 68-83. 2013.

STEITZ, S.A. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification. **Circulation Research**, v. 89, p. 1147-1154. 2001.

SUGANO, M. et al. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.33, p.787-793. 1980.

SUGANO, M. et al. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. **Lipids**, v.23, p.187-191. 1988.

SUGANO, M. et al. Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats. **Nutrition Reports international**, v.18, p.531-537. 1978.

SUZUKI, Y. et al. Inflammation and angiotensin II. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 881-900. 2003.

TADDEI, S. et al. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. **Drugs**, v. 62, n. 2, p. 265-284. 2002.

TENTORI, F. et al. Mortality Risk for Dialysis Patients With Different Levels of Serum Calcium, Phosphorus, and PTH: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). **American Journal of Kidney Diseases**, v. 52, n. 3, p. 519-530. 2008.

TINTUT, Y. et al. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells: potential signaling pathway for vascular calcification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 7547-7553. 1998.

TOLOSA, E. M. C. et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ed. São Paulo: Manole; 2003.

TONELLI, M. et al. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. **Circulation**, v. 112, p. 2627-2633. 2005.

TONELLI, M.; PANNU, N.; MANNS, B. Oral phosphate binders in patients with kidney failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 14, p. 1312-1324. 2010.

TORRES; P. A. U.; BRAWERE, D. P. D. Three feedback loops precisely regulating serum phosphate concentration. **Kidney International**, v. 80, p. 443-445. 2011.

TZANAKIS, I. P.; OREOPOULOS, D. G. Beneficial effects of magnesium in chronic renal failure: a foe no longer. **International Urology and Nephrology**, v. 41, p. 363-371. 2009.

VALCARENGHI, D. Avaliação toxicológica crônica do polímero Quitosana Ferro (III) solúvel. [dissertação]. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2006

VICENTE-RODRIGUEZ, G. et al. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 416-24. 2008.

VOORMOLEN, N. et al. High plasma phosphate as a risk factor for decline in renal function and mortality in pre-dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, n. 10, p. 2909-2916. 2007.

WATANABE, R. et al. Impact of cardiovascular calcification in nondialyzed patients after 24 months of follow-up. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 2, p. 189-194. 2010.

WEBER, T. J. et al. Serum FGF-23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 7, p. 1227-1234. 2003.

WESTENFELDA, R. et al. Vascular Calcification and Fetuin-A Deficiency in Chronic Kidney Disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 17, n. 4, p. 124-128. 2007.

WEXLER, L. et al. Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 94, p. 1175-1192. 1996.

WILHELM, M. et al. The iron-based phosphate binder PA21 has potent phosphate binding capacity and minimal iron release across a physiological pH range in vitro. **Clinical Nephrology**, v. 81, p. 251-258. 2014.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of laboratory animal management and welfare**. New York: Oxford University Press Inc, 1994. 304p.

YAO, Y. et al. A Role for the Endothelium in Vascular Calcification. **Circulation Research**, v. 113, n. 5, p. 495-504. 2013.

YOKOZAWA, T. et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. **Nephron**, v. 44, p. 230 – 234, 1986

ZHOU, S. et al. Osteoprotegerin Inhibits Calcification of Vascular Smooth Muscle Cell via Down Regulation of the Notch1-RBP-Jk/Msx2 Signaling Pathway. **Plosone**, v. 8, n. 7. 2013.

ZIEMAN, S.J.; MELENOVSKY, V.; KASS, D.A. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, p. 932-943. 2005.

ZOCCALI, C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: An epidemiologic perspective. **Kidney International**, v. 70, p. 26-33. 2006.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Castro, Bárbara Bruna Abreu de.
EFEITO DA QUITOSANA-FE(III) RETICULADA SOBRE A
CALCIFICAÇÃO VASCULAR EM UM MODELO DE UREMIA / Bárbara Bruna
Abreu de Castro. -- 2015.
136 f. : il.

Orientadora: Hêlady Sanders Pinheiro
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação
em Saúde Brasileira, 2015.

1. Doença renal crônica. 2. Distúrbio mineral ósseo. 3.
Calcificação vascular. 4. Hiperfosfatemia. 5.
Hiperparatireoidismo secundário. I. Sanders Pinheiro, Hêlady,
orient. II. Título.