

EFEITOS DA VITAMINA D NO MODELO 2R–1C

Effects of Vitamin D in model 2R– 1C

DANIELE BL SILVA^{1,2}, Clévia S. Passos², Daniele B. Vidotti^{1,2}, Elizabeth Oliveira-Sales², Luciana G. Pereira², Vanessa M. Ferreira², Mirian A. Boim².

¹Centro Universitário Faculdades Metropolitanas Unidas, Avenida Santo Amaro, 1239, São Paulo – SP, Brasil

²Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 781, São Paulo – SP, Brasil

Resumo

A Hipertensão Arterial Renovascular (HARV) é causada por estenose crônica da artéria renal resultando em lesões renais isquêmicas caracterizadas por lesões glomerulares e tubulares, inflamação e fibrose. Além disso, a redução do fluxo sanguíneo do rim ativa uma complexa resposta neuro-hormonal iniciada pela ativação do Sistema Renina Angiotensina-Aldosterona (SRAA), pelo aumento na liberação de renina pelo rim estenótico e que por sua vez estimula a atividade simpática renal resultando na elevação da pressão arterial. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da vitamina D na evolução da PAS e os possíveis efeitos renoprotetores em consequência à HARV, em modelo 2R - 1C. Foram utilizados ratos Wistar, no qual foram submetidos à cirurgia para indução da hipertensão. A vitamina D foi administrada por 3 semanas. A pressão arterial sistólica (PAS) de cauda foi monitorada semanalmente. Os animais foram submetidos à eutanásia, o córtex e a medula do rim foram separados para avaliar a expressão gênica e proteica de renina, o sangue e a urina de 24 hs foram coletados para dosagens bioquímicas. A vitamina D não reduziu a PAS dos ratos hipertensos e os valores bioquímicos não sofreram alteração. A vitamina D melhorou o processo fibrótico cortical e medular e consequentemente atenuou a inflamação renal.

Palavras-Chave: Modelo de Goldblatt, Vitamina D, hipertensão renovascular.

Abstract

The Renovascular Hypertension (HARV) is caused by chronic renal artery stenosis resulting in ischemic renal injury characterized by glomerular and tubular injury, inflammation and fibrosis. Moreover, reduction of renal blood flow activates a complex neurohumoral response initiated by activation of the renin angiotensin-aldosterone system (RAAS) by an increase in the release of renin by the stenotic kidney and which in turn stimulates the activity resulting in renal sympathetic elevation of blood pressure. The objective of this study was to evaluate the effects of vitamin D in the development of PAS and the possible protective effects consequently the HARV in Model 2R – 1C. We used Wistar rats, which were subjected to surgical induction of hypertension. Vitamin D was administered for 3 weeks. Systolic blood pressure (SBP) tail was monitored weekly. The animals were euthanized, the cortex and medulla of the kidney were separated to assess gene and protein expression of renin, the blood and urine of 24 hours were collected for biochemical. Vitamin D did not reduce SBP of hypertensive rats and biochemical values were unchanged. Vitamin D improved the fibrotic process cortical and medullary and consequently attenuated renal inflammation. Key-words: Model the Goldblatt; vitamin D; renovascular hypertension.

Introdução

A Hipertensão Arterial Renovascular (HARV) é causada por uma isquemia renal, geralmente em consequência a uma lesão obstrutiva parcial ou completa de uma ou ambas artérias renais (1). O modelo experimental mais utilizado de HARV foi desenvolvido por Goldblatt, em 1934, o qual consiste na colocação de um clipe de prata na artéria renal esquerda, também conhecido como modelo 2 Rins - 1 Clipe (2R-1C). O objetivo deste modelo é reduzir o fluxo sanguíneo e ativar o Sistema Renina Angiotensina-Aldosterona (SRAA), cujo principal função é elevar a pressão arterial (PA) com o intuito de melhorar a perfusão renal (2-5). Nas fases iniciais a hipertensão é altamente dependente do SRAA, porém com a isquemia renal crônica e a consequente lesão renal propicia a perpetuação da HARV (6-10). Assim, o controle desta patologia ainda é crítico.

O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que o tratamento com vitamina D poderia ser útil na minimização da HARV baseando-se nos seguintes critérios: 1 – A HARV é dependente de ativação do SRAA (11); 2 – A vit D tem capacidade de diminuir a atividade do gene codificador da renina (12, 13); 3 – A vit D tem efeito reno-protetor, com ação anti inflamatória.

Métodos

Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (processo número: 0248/12). Foram utilizados ratos Wistar (n= 33, 150-180g) provenientes do Biotério Central da UNIFESP (CEDEME). Os animais foram alojados em gaiolas de tamanho dos grupos de 5-6 ratos com relação ao seu grupo (controle ou hipertenso), com acesso livre à ração e água da torneira. Os animais foram mantidos num ambiente com temperatura controlada (23°C) sobre uma luz 12h / ciclo escuro. A droga Paricacitol (Abbott) foi diluída em água MiliQ. Todos os animais foram estudados durante seis semanas após a cirurgia para indução da hipertensão renovascular pelo modelo de Goldblatt (2 rins - 1 clipe) ou cirurgia fictícia.

A vit D foi administrada na forma ativa 0,05 µg/kg 5 vezes por semana. Os grupos foram divididos em controle (CT) (n=5); controle tratado (CTV) (n=5); hipertenso (H) (n=10); hipertenso tratado (HV) (n=8); hipertenso tratado simultaneamente (HVS) (n=5). Todos os grupos iniciarão o tratamento 3 semanas após a cirurgia durante 3 semanas, com exceção do grupo HVS que foi tratado por 6 semanas.

A indução da hipertensão renovascular foi realizada de acordo com a literatura (Oliveira-Sales). A medida da PAS por plestimografia foi realizada uma semana após a cirurgia durante 6 semanas. Para avaliar a função renal, os animais foram submetidos à gaiola metabólica (GM) antes e no final do protocolo, no período de 48h, sendo as primeiras 24h para adaptação dos animais. Foi coletada a urina de 24h dos animais, e o seu volume foi anotado juntamente com a quantidade ingerida de água.

No final do protocolo, os animais foram eutanasiados e o rim esquerdo foi retirado e dessecado em córtex e medula, foram aliquoteados em eppendorf e congelados no freezer -80°C. A análise molecular foi realizada na medula renal para avaliar a expressão de mRNA de renina por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (14) e a expressão proteica da renina por western blotting. Outra parte do rim foi armazenada em formol para futura coloração de hematoxilina e eosina (HE) para avaliar a morfologia renal e picrossirius para estudar a presença de colágeno.

O sangue foi coletado através de uma punção direta na aorta e armazenado à temperatura de -20°C para realizar parâmetros bioquímicos. Foram utilizados Kits da Labtest Diagnóstica[®] para obter as dosagens de proteína (método de ensaio enzimático colorimétrico) e creatinina (método do picrato). Foram dosados no soro creatinina, sódio e potássio através do Analisador de Eletrólitos[®] 9180 - Rocher. Os valores do *clearance* de creatinina foram calculados pela fórmula UV/P (onde U = valores de creatinina urinária em mg/dL, V = volume urinário de 24 horas em mL/minutos e P = valores de creatinina plasmática em mg/dL).

A fração de excreção (FE) de Na⁺ e K⁺ foi calculada a partir da fórmula abaixo (onde U = valores urinários, P = valores plasmáticos).

Os resultados foram expressos em média \pm Erro Padrão e analisados usando ANOVA one-way seguidos do pós-teste de Tukey's quando apropriado por meio do software GraphpadPrism 5.0. Apenas foram considerados estatisticamente significantes valores de $P < 0,05$.

Resultados

Efeito da vitamina D na Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Como pode ser observado na **Figura 1A**, a PAS não se modificou ao longo das 6 semanas nos animais do grupo controle bem como nos tratados com vit D. Os animais do grupo hipertenso, no entanto, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da PAS já na 1ª. semana após o clampeamento da artéria renal. A PAS aumentou progressivamente e se estabilizou a partir da 3ª semana. O tratamento com vit D iniciado após o estabelecimento da hipertensão (3ª. semana) não modificou este perfil pressórico. Da mesma forma, a administração de vit D, mesmo antes do estabelecimento da hipertensão, logo após o clampeamento não impediu o aumento da PAS.

Clearance de creatinina, Fração de excreção urinária de sódio e Proteinúria

Os animais hipertensos não desenvolveram proteinúria significativa quando comparados com os animais controles ($22,2 \pm 1,6$ mg/dl vs $25,0 \pm 2,1$ mg/dl). Inesperadamente, o tratamento com vit D aumentou significativamente a proteinúria nos animais hipertensos ($25,0 \pm 2,1$ mg/dl vs $42,0 \pm 10,6$ mg/dl), porém somente quando o tratamento foi iniciado tardiamente. Quando iniciado simultaneamente observamos valores menores de proteinúria quando comparado ao grupo hipertenso tratado tardiamente ($22,4 \pm 1,0$ vs $42,6 \pm 10,6$ mg/dl). Esses valores estão apresentados na **Figura 1B**.

Em relação ao clearance de creatinina, não houve diferença entre o grupo controle e hipertenso ($0,95 \pm 0,09$ mg/dl vs $1,44 \pm 0,16$ mg/dl). Entretanto, podemos observar um aumento significativo no grupo hipertenso tratado simultaneamente com vit D em relação ao grupo controle ($0,95 \pm 0,09$ vs $1,8 \pm 0,2$ mg/dl) (**Figura 1C**).

Ao compararmos a taxa de excreção urinária de sódio do grupo controle com o grupo hipertenso, não observamos diferença significativa ($2,1 \pm 0,23$ vs $2,26 \pm 0,17$ %), em compensação, houve uma diminuição no grupo hipertenso tratado com vit D ($1,42 \pm 0,21$ vs $2,1 \pm 0,23$ %) e um maior aumento no grupo hipertenso tratado simultaneamente ($2,38 \pm 0,33$ %), como mostra a **Figura 1D**.

Avaliações da expressão gênica e proteica de renina

Como foi o esperado, o grupo hipertenso apresentou um maior aumento significativo na expressão gênica de renina quando comparado ao grupo controle ($1,0 \pm 0,15$ vs $3,2 \pm 0,4$ UA). Não houve significância entre os grupos hipertensos e hipertenso tratado com vit D ($3,2 \pm 0,4$ % para $3,5 \pm 0,1$ UA). Os valores estão representados na **Figura 2A**.

Em relação à expressão proteica de renina houve um comportamento diferente ao do RNAm, ou seja, houve uma diminuição no grupo hipertenso quando comparado ao grupo controle ($100 \pm 13,6$ vs $65,0 \pm 4,0$ %) e uma diminuição ainda maior no grupo tratado simultaneamente com vitamina D ($34,2 \pm 4,0$ %), como mostra na **Figura 2B**.

Parâmetros histológicos do córtex e medula renal

A marcação com picrossirius revelou presença de colágeno no córtex, mas principalmente na medula do rim clipado dos animais hipertensos, indicando presença de processo fibrótico quando comparados com o grupo Controle (**Figura 3C, 3H, 3A e 3F**). Os animais tratados com Vit D mostraram uma melhora expressiva tanto no córtex como na medula com menos marcação de colágeno em relação ao grupo Controle. Entretanto, houve uma diminuição significativa de marcação de colágeno no córtex e medula renal quando comparamos o grupo hipertenso com o grupo tratado com vit D simultaneamente (**Figura 3C, 3H, 3E, 3J**). As áreas marcadas com picrossirius foram quantificadas e os resultados então representados nos gráficos da **Figura 3**.

Nas lâminas coradas com HE, do rim clipado, os animais hipertensos demonstraram uma atrofia glomerular e células tubulares proximais muito

prejudicados quando comparados com o grupo controle (**Figura 3M e 3K**). Este prejuízo inclui perda dos limites, congestão dos capilares peritubulares e edema tanto no córtex como medula do rim clipado. Já os grupos hipertensos tratados, mostraram uma melhora na arquitetura do córtex e medula renal como pode ser visualizados nas **Figuras 3N, EO, 3S e 3T**.

Discussão

O presente estudo mostrou que a vit D não alterou os níveis pressóricos dos animais hipertensos. Sabe-se que há uma relação inversa entre os níveis plasmáticos de vit D e a elevação da pressão arterial (15-17), porém essa relação não foi observada nos nossos experimentos. DONG et al (2012), demonstrou que o Calcitriol (150 ng/kg) administrado via oral por 4 meses e meio foi capaz de diminuir a PAS em ratos SHR (18). Talvez nossos resultados tenham sido diferentes, pois o protocolo experimental utilizado foi diferenciado e perdurou por um período menor (6 semanas).

Os níveis de proteinúria não se alteraram nos animais hipertensos em relação ao controle, e o tratamento com vit D não modificou esses valores, entretanto, houve um aumento no grupo tratado. Alguns estudos na literatura confirmam que animais com hipertensão renovascular não apresentam aumento de proteinúria, entretanto isso não é um consenso (19). E em outros estudos realizados com humanos hipertensos, mostram que a administração de vit D foi eficaz em diminuir a proteinúria (20).

Em relação à função renal, os resultados obtidos de creatinina plasmática não se alteraram nos ratos hipertensos, sendo que esses resultados corroboram com o estudo de Ricther et al em 2004 (19). Da mesma forma, o clearance de creatinina não foi alterado nos animais hipertensos em relação aos animais controle. Os mesmos resultados foram obtidos por Ulrich *et al* (2004) em animais com hipertensão renovascular (22). Esses resultados sugerem que o rim contralateral seja capaz de compensar o déficit da função do rim clampeado mantendo a taxa de filtração glomerular (TFG) estável.

O modelo de hipertensão renovascular é dependente do SRA. Nossos resultados demonstram que a expressão de RNAm de renina no córtex renal dos animais hipertensos está aumentada quando comparado com o controle. Estudos de Reinhold *et al* corroboram com esses resultados (23). Tem sido sugerido que a vitamina D pode exercer seus efeitos benéficos através da inibição da expressão do gene da renina (12). Porém não obtivemos redução da expressão gênica de renina nos animais tratados. Apesar disso, houve uma diminuição na expressão proteica de renina em relação aos animais normotensos. Esses resultados podem indicar que no percurso da tradução do RNAm em proteína, houve uma modificação pós-transcricional que levou à diminuição na produção da proteína. Outra possibilidade para explicar a ausência de efeito da vit D seria um aumento no consumo da renina sendo esse efeito capaz de manter elevada a síntese de RNAm mesmo na presença de vitamina D.

Os resultados de histologia renal mostraram uma arquitetura prejudicada e presença de colágeno no rim clipado. Esses achados corroboram com os estudos de Ritcher *et al* (19). E o tratamento com vit D melhorou a arquitetura renal bem como o processo fibrótico tanto no córtex como na medula dos animais hipertensos. Esses achados sugerem a eficácia da vit D na promoção do efeito renoprotetor.

Conclusão

A vit D na dose utilizada neste estudo não foi suficiente para diminuir a PAS dos animais hipertensos e seu efeito sobre a expressão de renina não foi clara. Entretanto, houve uma melhora significativa na arquitetura renal com atenuação do processo fibrótico no córtex e medula renal dos animais hipertensos. Este mecanismo renoprotetor necessita de investigação adicional.

Referências Bibliográficas

1. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: In. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *The Journal of Experimental Medicine* 1934 March 1, 1934;59(3):347-79.
2. SBd C. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. 2010 [cited 1]; 17].
3. Goldblatt H. Studies on Experimental Hypertension : lii. The Production of Persistent Hypertension in Monkeys (Macaque) by Renal Ischemia. *J Exp Med* 1937 Apr 30;65(5):671-5.
4. MFTN WO. Sistema Renina -angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2000.
5. Goldblatt PJ. The GoldBlatt experiment: a conceptual paradigm. . 1995.
6. Wille Oigman MFTN. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens* 2000;7.
7. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol Sci* 1998 Aug;13:170-6.
8. DW P. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney one-clip renal vascular hypertension. *Am J Physiol* 1983;245:131-41.
9. LG MKN. Intrarenal actions of Angiotensin II in the pathogenesis of experimental hypertension. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management* 1995:1437- 50.
10. Lerman LO CA, Sica V, & Napoli C Animals models of hypertension:an overview. *J Lab Clin Med* 2005;146:160-73.
11. Chade AR, Zhu X, Lavi R, Krier JD, Pislaru S, Simari RD, et al. Endothelial progenitor cells restore renal function in chronic experimental renovascular disease. *Circulation* 2009 Feb 3;119(4):547-57.
12. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* 2007 Oct 12;282(41):29821-30.

13. Li YC KJ, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002;110(2):229-38.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
15. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 2009 Oct;6(10):621-30.
16. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol* 2008 Dec 9;52(24):1949-56.
17. Drechsler C, Pilz S, Obermayer-Pietsch B, Verduijn M, Tomaschitz A, Krane V, et al. Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. *Eur Heart J* Sep;31(18):2253-61.
18. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, et al. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J* Dec;33(23):2980-90.
19. Richter CM, Godes M, Wagner C, Maser-Gluth C, Herzfeld S, Dorn M, et al. Chronic cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats. *J Hypertens* 2004 Jan;22(1):191-8.
20. Hojs N, Bevc S, Balon BP, Hojs R, Ekart R. Paricalcitol reduces proteinuria in non-dialysis chronic kidney disease patients. *Ther Apher Dial* Aug;17(4):368-72.
21. Sporkova A, Kopkan L, Varcabova S, Huskova Z, Hwang SH, Hammock BD, et al. Role of cytochrome P-450 metabolites in the regulation of renal function and blood pressure in 2-kidney 1-clip hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* Jun;300(6):R1468-75.
22. Wenzel UO, Wolf G, Jacob I, Schwegler C, Qasqas A, Amann K, et al. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor

omapatrilat in renovascular hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2003 Oct;18(10):2005-13.

23. Reinhold SW, Uihlein DC, Boger CA, Kloiber S, Frolich K, Bergler T, et al. Renin, endothelial NO synthase and endothelin gene expression in the 2kidney-1clip Goldblatt model of long-term renovascular hypertension. *Eur J Med Res* 2009;14:520-5.

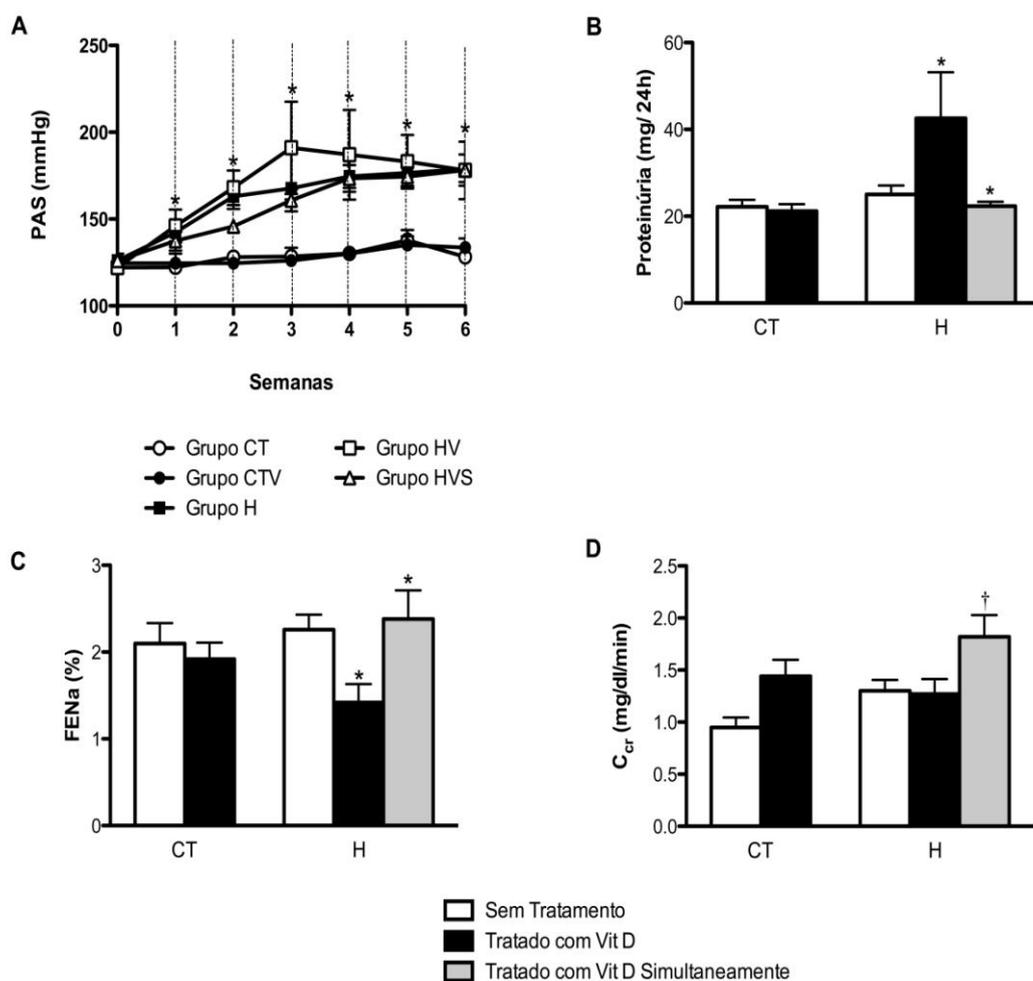


Figura 1A: Evolução da PAS. Valores de pressão arterial sistólica (PAS) registradas por plestimografia durante seis semanas no grupo controle (CT, n = 5), controle + Vit D (CTV, n = 5), hipertenso (H, n = 10), hipertenso + vit D (HV, n = 9) e hipertenso + vit D simultaneamente (HVS, n = 5). * $P < 0,05$ em relação ao CT e vs. H (ANOVA two-Way). **1B: Valores de proteinúria, 1C: Clearance de creatinina, 1D: Fração de excreção urinária de sódio (C).** Valores no grupo controle (CT, n = 5), controle + Vit D (CTV, n = 5), hipertenso (H, n = 10), hipertenso + vit D (HV, n = 9) e hipertenso + vit D simultaneamente (HVS, n = 5). * $p < 0,05$ vs H, † $p < 0,05$ vs CT (ANOVA One-Way).

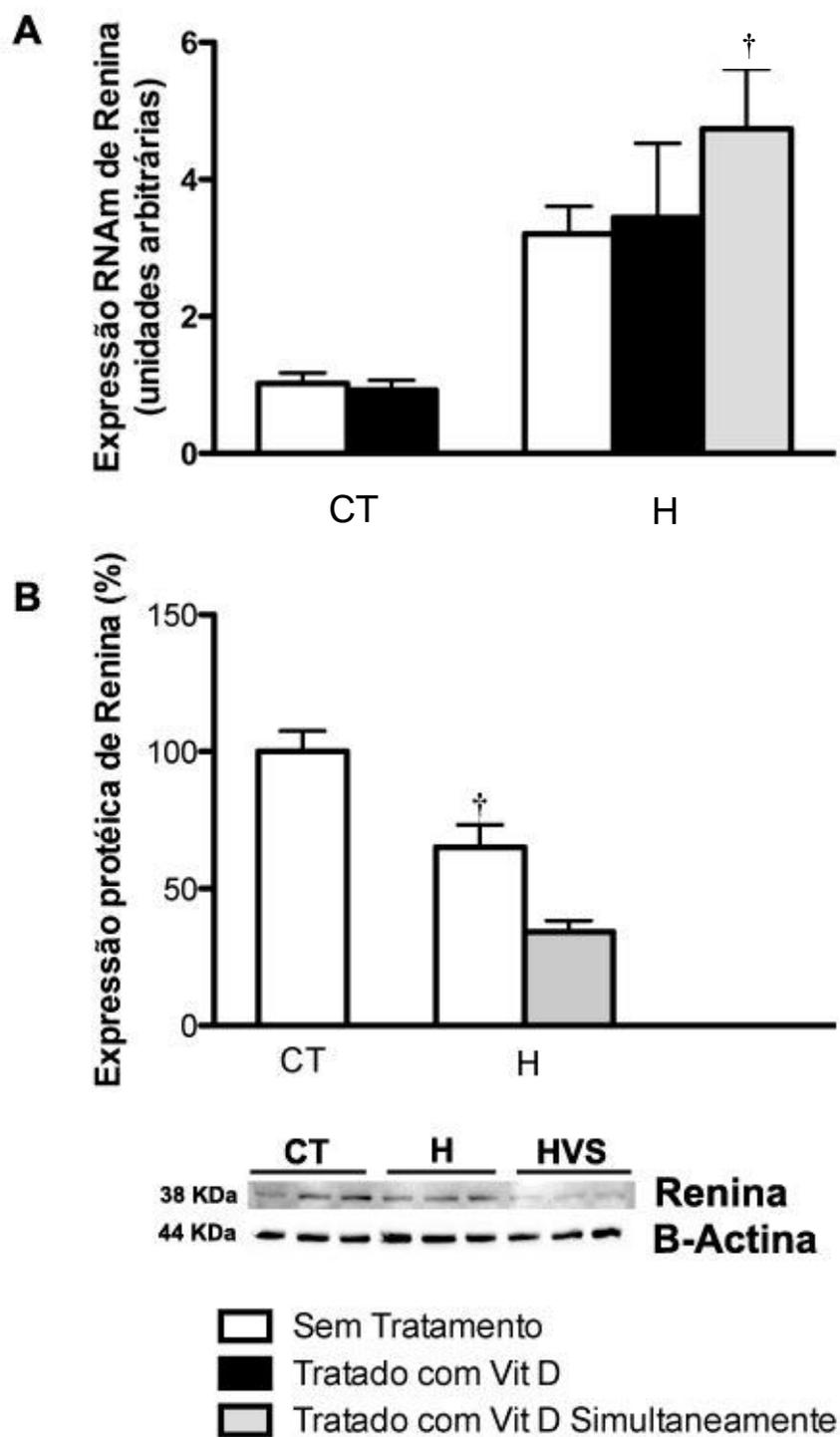


Figura 2: Expressão de mRNA de Renina (A) e Expressão Protéica de Renina (B). Valores no grupo controle (CT, n = 5), controle + Vit D (CTV, n = 5), hipertenso (H, n = 10), hipertenso + vit D (HV, n = 9) e hipertenso + vit D simultaneamente (HVS, n = 5). * $p < 0,05$ vs H, $p < 0,05$ vs CT (ANOVA One-Way).

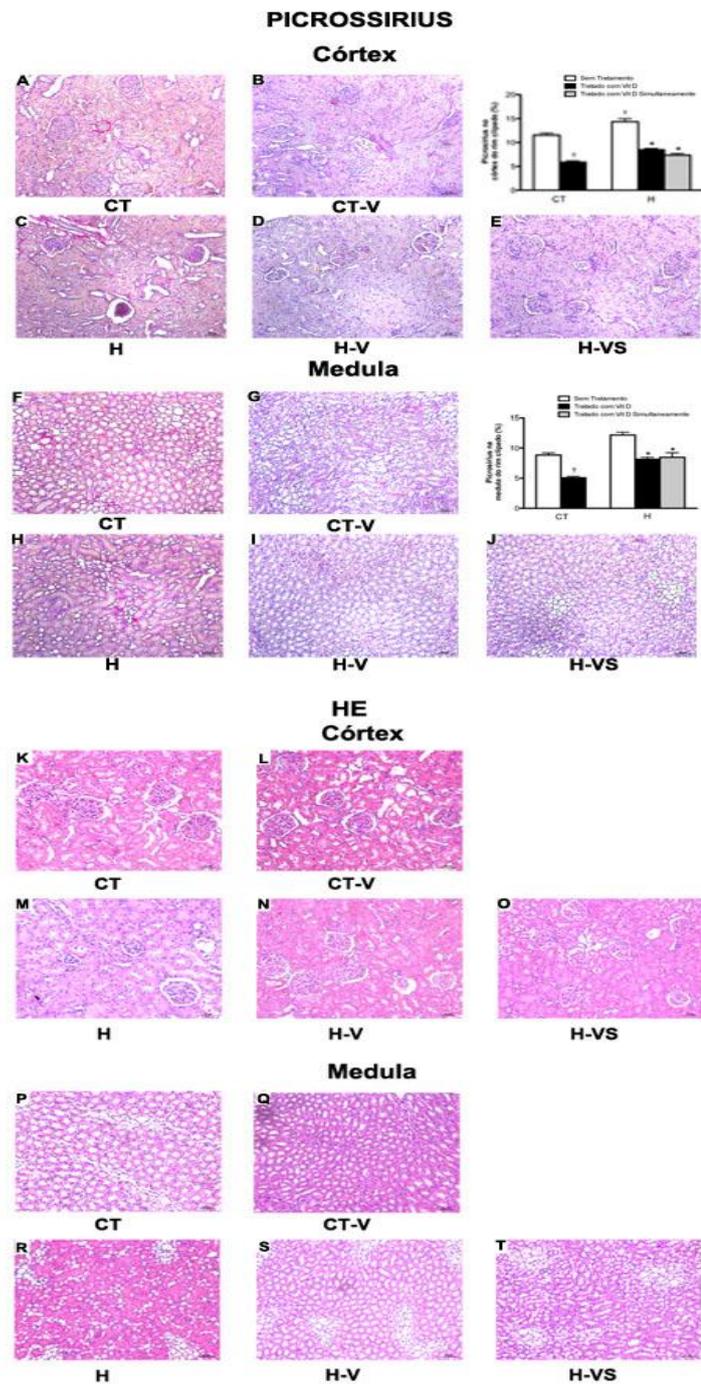


Figura 3 Marcação de Picrossirius (20X). Córtex do grupo controle (A), controle + Vit D (B), hipertenso (C), hipertenso + vit D(D) e hipertenso + vit D simultaneamente (E) e medula do grupo controle (F), controle + Vit D (G), hipertenso (H), hipertenso + vit D (I) e hipertenso + vit D simultaneamente (J). A área fibrótica foi quantificada através do programa Image Tool. * $p < 0,05$ vs H, † $p < 0,05$ vs CT(ANOVA One-Way). **Coloração de HE (20X)**. Córtex do grupo controle (K), controle + Vit D (L), hipertenso (M), hipertenso + vit D (N) e hipertenso + vit D simultaneamente (O) e medula do grupo controle (P), controle + Vit D (Q), hipertenso (R), hipertenso + vit D (S) e hipertenso + vit D simultaneamente (T). * $p < 0,05$ vs H, † $p < 0,05$ vs CT(ANOVA One-Way).