

Indução de resposta inflamatória sistêmica e espessamento de artérias subepicárdicas em um modelo animal de uremia

Induction of systemic inflammation and thickening of subepicardial arteries in an animal model of uremia

Autores

Anthony Augusto Carmona²
 Bruno Gleizer da Silva Rigon²
 Michel Peter Barchik Salvatierra Barroso²
 Aline Borsato Hauser¹
 Dalton Précoma¹
 Sérgio Bucharles²
 Lúcia de Noronha²
 Roberto Pécóits-Filho²

¹Universidade Federal do Paraná – UFPR.

²Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC/PR.

Data de submissão: 22/05/2011
 Data de aprovação: 28/09/2011

Correspondência para:

Roberto Pécóits-Filho
 Rua Imaculada Conceição,
 1155 – Prado Velho
 Curitiba – PR – Brasil
 CEP 80215-901
 E-mail: r.pecoits@pucpr.br

Suporte financeiro:
 Bolsa de Produtividade,
 CNPq

O referido estudo foi realizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUC/PR.

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse.

RESUMO

A disfunção renal é um fator de risco para doença cardiovascular (DCV). Estudos experimentais controlados que possam analisar o impacto da disfunção renal no sistema cardiovascular, isolando esses fatores relacionados à uremia dos fatores de risco tradicionais, que são altamente prevalentes na população com doença renal crônica (DRC), ainda são escassos. **Objetivo:** Analisar o impacto cardiovascular em ratos com disfunção renal, analisando biomarcadores de risco cardiovascular e a histologia das artérias subepicárdicas desses animais. **Métodos:** Estudo experimental envolvendo trinta ratos machos Wistar, divididos em dois grupos. Um grupo foi submetido à ablação renal e o outro grupo SHAM (grupo controle) à manipulação do pedículo renal. Ambos os grupos foram acompanhados por oito semanas, período em que foram feitas dosagens de ureia, fósforo e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Lâminas obtidas de cortes do miocárdio foram confeccionadas para análise das características das arteríolas subepicárdicas. **Resultados:** O grupo DRC apresentou níveis elevados de uréia e fósforo em relação ao grupo SHAM. Já os níveis de TNF- α , em todas as análises, foram indetectáveis nos animais do grupo SHAM, em contraste com o grupo DRC, onde se observaram elevados níveis de TNF- α ($p < 0,05$). A espessura da camada média dos vasos subepicárdicos do grupo DRC foi significativamente maior do que em relação ao grupo SHAM ($p = 0,011$). **Conclusão:** A indução de disfunção renal determinou alterações em biomarcadores de risco cardiovascular e um aumento na espessura dos vasos subepicárdicos estudados em comparação aos animais com função renal normal.

Palavras-chave: Doença das Coronárias. Falência Renal Crônica. Uremia. Modelos Animais.

ABSTRACT

Although renal dysfunction is a known risk factor for cardiovascular disease (CVD), there are few experimental studies investigating the cardiovascular consequences of this condition. **Objective:** To analyze the impact of the induction of renal dysfunction on biomarkers of cardiovascular risk and on the histology of subepicardial vessels. **Methods:** This experimental study involved thirty Wistar male rats, which were divided into two groups. One (chronic kidney disease – CKD group) underwent renal ablation, and the other (SHAM group) was submitted to kidney manipulation only. Both groups were followed up for eight weeks. During follow-up, serum levels of urea, phosphorus and TNF- α were measured. Heart tissue was processed for histological analysis. **Results:** The CKD group had increased levels of urea and phosphorus, in comparison with the SHAM group. The levels of TNF- α were increased in the CKD group and undetectable in the SHAM group ($p < 0.05$). Thickness of the middle layer of the subepicardial vessels of the CKD group was significantly higher than that of the SHAM group ($p = 0.011$). **Conclusion:** Induction of renal dysfunction in rats increased the biomarkers of cardiovascular risk and led to a thickening of the subepicardial vessels when compared with normal controls, **Keywords:** Coronary Disease. Kidney Failure, Chronic. Uremia. Models, Animal.

INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular (DCV) representa a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com disfunção renal, sendo a miocardiopatia e a doença arterial na forma de aterosclerose acelerada as suas principais traduções fisiopatológicas.¹⁻³ Postula-se que fatores de risco peculiares da uremia, como: anemia, sobrecarga de volume, toxicidade urêmica, inflamação sistêmica e distúrbios do metabolismo mineral estejam intimamente envolvidos na fisiopatologia da DCV relacionada à disfunção renal.² Estudos experimentais controlados que possam analisar o impacto da disfunção renal no sistema cardiovascular, isolando esses fatores relacionados à uremia dos fatores de risco tradicionais, que são altamente prevalentes na população com disfunção renal, ainda são escassos.

Uma resposta inflamatória sistêmica relacionada à disfunção renal é caracterizada em estudos clínicos por elevados níveis de proteína C-reativa (PCR) e citocinas pró-inflamatórias em até 50% dos pacientes em tratamento dialítico crônico.^{4,5} Acredita-se que esse estado de inflamação sistêmica e a consequente exacerbação do estresse oxidativo colaboram para a aceleração das alterações cardiovasculares na uremia.⁶

Do ponto de vista miocárdico, as três lesões que constituem o remodelamento estrutural do miocárdio observado na doença renal crônica (DRC) são: hipertrofia miocárdica, fibrose intersticial e espessamento intramural de artérias e arteríolas.⁷ A doença vascular provocada pela uremia é tanto macrovascular quanto microvascular, e está associada a uma diminuição na complacência das artérias, em que a permeabilidade do vaso e a expressão de moléculas de adesão estariam alteradas.⁸ A maior expressão dessas moléculas de adesão leucocitária na superfície das células endoteliais favorece os fenômenos de progressiva oclusão arterial.⁹ Vasos subepicárdicos são, particularmente, suscetíveis a distúrbios metabólicos que aceleram o processo de DCV.

A hipótese do estudo é a de que a disfunção renal e o consequente acúmulo de compostos urêmicos e uma ativação da resposta inflamatória sistêmica determinem modificações na estrutura da parede arterial de animais de experimentação submetidos à redução de massa renal. O objetivo deste estudo foi o de analisar o comportamento de biomarcadores de risco cardiovascular e as alterações histológicas em artérias subepicárdicas em um modelo animal de uremia.

MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso entre 200 a 260 g. A indução de disfunção renal (grupo DRC) foi realizada através de ablação de 5/6 da massa renal em quinze ratos com dez semanas de idade, anestesiados com cloridrato de ketamina e cloridrato de xilasina. As artérias renais mediana e posterior do rim esquerdo foram ligadas assegurando um infarto de, pelo menos, 2/3 desse rim. A nefrectomia total direita sucedia a ligação das artérias.^{10,11} Quinze ratos de um grupo, denominado SHAM, foram submetidos à anestesia, laparotomia ventral e manipulação dos pedículos renais, sem a remoção da massa renal. Após o procedimento, os animais retornaram às suas gaiolas originais, tendo livre acesso à água e à ração padrão (0,5% de sódio e 22% de proteína), e mantida a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sob ciclo noite-dia controlados (12h por 12 h) por um período de oito semanas.

Amostras de sangue de ambos os grupos de animais foram coletadas no sétimo, trigésimo e sexagésimo dias, após o procedimento cirúrgico renal, para a determinação das concentrações séricas de ureia, fósforo, e dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os níveis de ureia eram determinados em todas as amostras com *Kit Ureia* por Reação Colorimétrica – Labtest®. Os níveis de fósforo foram determinados em todas as amostras com *Kit Fósforo* por Reação Colorimétrica – Labtest®. As dosagens de TNF- α foram determinadas em microplacas por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), ou seja, empregando uma técnica imunoenzimática de sanduíche utilizando um anticorpo policlonal específico para a citocina TNF- α em ratos (*Kit TNF- α /TNFSF1A – Quantikine, R&D Systeys*). Todas as amostras foram coletadas com o anticoagulante etileno diaminotetracético tripotássico (EDTA K₃) e estocadas em *vials* (livres de endotoxinas) a -80°C até a realização das análises.

Ao final do período de seguimento, os animais foram submetidos à eutanásia. Realizou-se a assepsia na região torácica do animal usando polivinilpirrolidona-iodo (PVPI). A peça cardíaca retirada dos animais foi fixada em formol a 10% após terem sido realizados quatro cortes transversais, todos com o mesmo diâmetro, longitudinalmente. Os cortes foram emblocados em parafina e, em seguida, realizados cortes de quatro micras com micrótomo Lica RM 2145. As lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina, tricômico de Gomori e elástica de Weigert. Para a análise da espessura da camada média dos vasos subepicárdicos, utilizou-se um aparelho de histomorfometria, composto por um microscópio Olympus BX 50, de onde as imagens capturadas eram transferidas para um microcomputador e

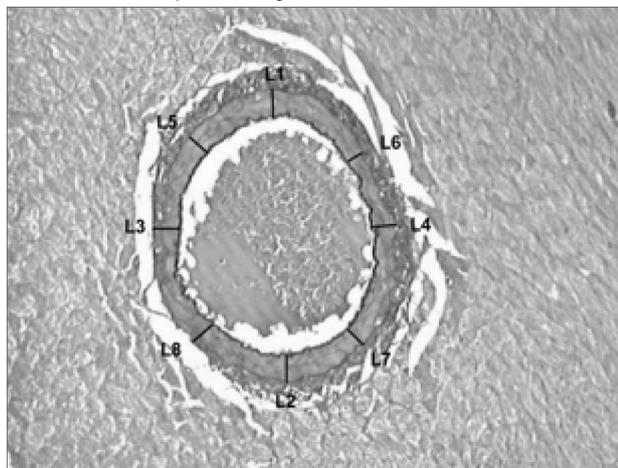
analisadas pelo *software* Image Pro-plus 4.5 da Media Cybernetics® (Figura 1).

Considerou-se para a análise os vasos subepicárdicos, escolhidos por serem, particularmente, suscetíveis a distúrbios metabólicos que aceleram o processo de DCV. Foram selecionados aqueles vasos que se encontravam até o equivalente a um campo de maior aumento de quarenta vezes. Após localizarmos os vasos subepicárdicos para estudo, a medição micrométrica da espessura da camada média seguia um mesmo protocolo de aferição, de acordo com a Figura 1.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como médias ± desvios-padrão. Comparações entre as médias dos dois grupos foram realizadas utilizando teste *t* de Student. Correlações entre variáveis contínuas foram avaliadas pelo teste de Pearson. Todas as análises foram feitas com programa estatístico SPSS para Windows (SAS Institute Inc., Berkley (CA), USA). Valores *p* < 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

Figura 1. Roteiro de medição da camada média dos vasos subepicárdicos utilizado no estudo, compreendendo no total oito aferições (L1-L8) em cada vaso – Representação da medida de artérias.



RESULTADOS

Três animais do grupo DRC morreram durante o seguimento e foram excluídos das análises finais do estudo. Durante os cortes histológicos, foram descartadas três peças cardíacas do grupo SHAM devido à inadequação do material obtido. Finalmente, vinte e quatro animais, sendo doze ratos do grupo DRC e doze ratos do grupo SHAM, terminaram o experimento e foram incluídos nas análises.

Quando comparamos a diferença de peso do grupo SHAM *versus* grupo DRC, não observamos diferença significativa ao longo do estudo (Tabela 1). As análises sanguíneas realizadas no decorrer do estudo revelaram um padrão ascendente dos níveis de ureia e de fósforo no grupo DRC, que foram estatisticamente superiores aos valores encontrados no grupo controle, SHAM, no sétimo, trigésimo e sexagésimo dias de observação, confirmando o sucesso na indução de disfunção renal. Observou-se, também, que, no grupo SHAM, os valores médios de fósforo e de ureia permaneceram estáveis ao longo do período de observação (Tabela 1).

Paralelamente, a insuficiência renal induziu o aparecimento de uma maior resposta inflamatória durante todo o período de observação, com elevação nos níveis de TNF-α no grupo DRC e, comparativamente, ausência da mesma resposta nos animais do grupo SHAM (Tabela 1). A análise histomorfométrica da espessura da camada média nas artérias subepicárdicas revelou que o grupo DRC apresentou um valor médio significativamente maior em relação ao grupo SHAM (18,98 ± 3,98 μm *versus* 13,90 ± 4,90 μm; *p* = 0,011; Figuras 2A e 2B).

DISCUSSÃO

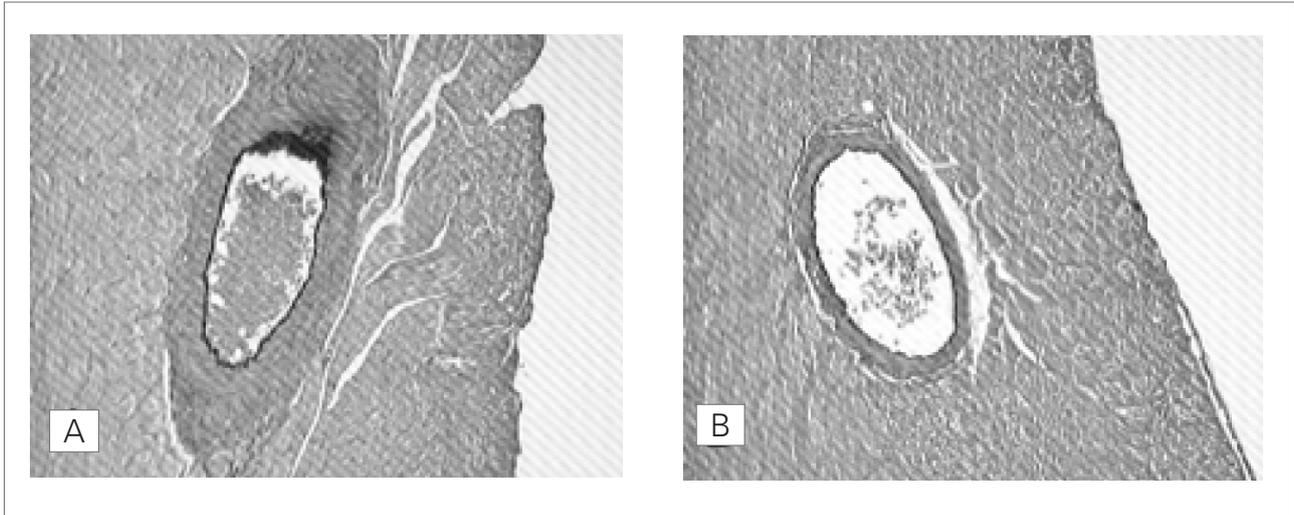
A disfunção renal é fator de risco para DCV, alterando a concentração plasmática e a expressão de biomarcadores de risco cardiovascular e induzindo alterações miocárdicas e vasculares, ainda pouco caracterizadas em modelos animais de uremia. Neste estudo, a indução

Tabela 1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS NOS TRÊS MOMENTOS DE AVALIAÇÕES NO ESTUDO

	DRC (n = 12)			SHAM (n = 12)		
	7º dia	30º dia	60º dia	7º dia	30º dia	60º dia
Peso	260 ± 20	283 ± 16	322 ± 26	291 ± 26	302 ± 16	327 ± 18
Ureia (mg/dL)	119 ± 44	120 ± 44	136 ± 76	46 ± 7	46 ± 8	54 ± 13
Fósforo (mg/dL)	5,88 ± 0,32	6,71 ± 0,29	7,14 ± 0,28	5,76 ± 0,28	5,86 ± 0,27	5,49 ± 0,27
TNF-α (pg/mL)	3,18 ± 0,62*	2,58 ± 0,54*	1,86 ± 0,47*	Indetectável	Indetectável	Indetectável

*Diferença significativa entre os níveis de TNF-α do grupo DRC comparado ao grupo SHAM no 7º, 30º e 60º dias (*p* < 0,05 para todas as análises). DRC: doença renal crônica; SHAM: grupo controle; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa.

Figura 2. Lâminas representativas dos vasos subepicárdicos. A) (grupo DRC) – Artéria dos ratos com doença renal crônica (DRC). B) (grupo SHAM) – Artéria de controles.



da disfunção renal pelo modelo experimental de nefrectomia 5/6 induziu o desenvolvimento de uremia, a sustentação de um estado inflamatório e alterações vasculares compatíveis com espessamento arteriolar.

DRC em estágio final, muito frequentemente, determina o aparecimento de uremia, que é, atualmente, definida como o acúmulo sanguíneo de produtos orgânicos que, em condições normais, são excretados pelos rins,¹² especificamente, acúmulo de toxinas urêmicas como: ácidos orgânicos, ureia, beta2-microglobulina, produtos resultantes do estresse oxidativo e fósforo,¹³⁻¹⁶ diretamente relacionados à morbi-mortalidade cardiovascular na DRC. Neste estudo, o modelo de uremia desenvolvido pela nefrectomia 5/6 se caracterizou pelo acúmulo de ureia e também de fósforo, duas das citadas representativas toxinas urêmicas. Dessa forma, acredita-se que este seja um modelo interessante para o estudo das repercussões cardiovasculares da uremia. Até o momento, a utilização desse modelo vem sendo quase que exclusivamente voltada para o estudo da progressão da doença renal.

Neste estudo, identificou-se a clara presença de um estado inflamatório sistêmico e sustentado em ratos nefrectomizados, mostrando que, nesse modelo, a inflamação ocorre em paralelo com o acúmulo de toxinas urêmicas, como a ureia e o fósforo. Pacientes com disfunção renal frequentemente apresentam uma inflamação sistêmica e sustentada, documentada por elevados níveis de PCR, interleucina 6 e TNF- α ^{4,5,17}, que se correlaciona fortemente a complicações cardiovasculares.¹⁷ Particularmente, em um nível endotelial, observou-se que a exposição desse tecido com níveis aumentados de biomarcadores inflamatórios determina disfunção endotelial, espessamento e vasoespasmo,¹⁸ o que pode

colaborar para fenômenos de isquemia em tecidos suscetíveis, como o tecido miocárdico. Além dessas alterações potencialmente observáveis na uremia, alterações funcionais e estruturais do sistema arterial na DRC determinam prejuízo na distensibilidade arterial, promovendo aumento na pós-carga, na resistência vascular periférica e hipertrofia ventricular esquerda, bem como, resultando em redução na perfusão coronariana pelo desenvolvimento de remodelamento vascular.^{7,19,20}

O principal achado do presente estudo foi a observação de que a indução de disfunção renal leva a um espessamento da camada média de artérias subendocárdicas, mesmo após um período de acompanhamento de apenas oito semanas. Poucos trabalhos associam a presença da DRC à histopatologia de vasos sanguíneos. Em estudos com animais de experimentação, observou-se que em ratos urêmicos ocorre uma significativa redução do lúmen arterial e um aumento na relação parede-lúmen de artérias mesentéricas, quando comparados a controles normais²¹ e, adicionalmente, que o uso de drogas bloqueadoras de canais de cálcio e inibidoras da enzima conversora de angiotensina (ECA) preveniu o espessamento na parede das arteríolas intramiocárdicas.²² Essas modificações estruturais, bem com suas respostas à terapia medicamentosa, não puderam ser adequadamente explicadas pela presença de hipertensão arterial e fatores de risco tradicionais para DCV, sugerindo a presença de outros fatores de risco cardiovascular para justificá-las, como aqueles ligados à presença de DRC.

Os achados indicam que os vasos subepicárdicos são afetados na presença de uremia, podendo repercutir em alterações cardiovasculares específicas e apresentação clínica peculiar. Estudos clínicos prévios têm revelado

que, em pacientes portadores de doença renal e angina pectoris, até 50% não apresentam doença coronariana significativa. Tais pacientes apresentam uma microangiopatia das pequenas artérias miocárdicas, como as observadas neste estudo, resultado de espessamento de parede arterial, que, em condições de estresse, não permitem relaxamento vascular e podem predispor a fenômenos de isquemia miocárdica. Histopatologicamente ocorre hipertrofia de células musculares lisas, aumento na expressão de fatores de crescimento derivados de endotélio e deposição de colágeno tipo IV.⁷ Essa arteriopatia parece aparecer nas fases mais avançadas da doença, quando, entre outras alterações, o sistema para manutenção de balanço do fósforo é rompido pela adicional perda de tecido renal e o processo inflamatório sistêmico se torna mais nitidamente presente. A identificação de fatores de risco cardiovascular na uremia se torna, dessa forma, importante, pois pode revelar mecanismos peculiares da patologia, levando ao entendimento da história natural da doença e ao desenvolvimento de condutas terapêuticas, que podem diminuir o risco de morbi-mortalidade. Da mesma forma, fatores de risco cardiovascular específicos da DRC indicam um formato de investigação próprio para esse grupo de pacientes, que desenvolvem uma arteriopatia de características peculiares.

Em conclusão, observou-se neste estudo que a presença de uremia e suas alterações imunológicas e metabólicas (inflamação sistêmica e hiperfosfatemia) estiveram relacionadas à presença de arteriopatia, especificamente um aumento na espessura da camada média das artérias subepicárdicas em animais de experimentação. Este modelo poderá ser utilizado para investigar os mecanismos da arteriopatia da uremia, bem como para testar intervenções com a finalidade de cardioproteção na disfunção renal.

REFERÊNCIAS

1. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray D, Barre PE. Outcome and risk factors of ischemic heart disease in chronic uremia. *Kidney Int* 1996;49:1428-34.
2. Locatelli F, Pozzoni P, Tentori F, Vecchio L. Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(Suppl):S2-9.
3. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1277-85.
4. Pecoits-Filho R, Barany P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1684-8.
5. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, *et al.* Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis* 2006;47:139-48.
6. Cachofeiro V, Goicochea M, Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, Luno J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int* 2008;(Suppl):S4-9.
7. Tyralla K, Amann K. Morphology of the heart and arteries in renal failure. *Kidney Int* 2003;(Suppl):S80-3.
8. Harper SJ, Bates DO. Endothelial permeability in uremia. *Kidney Int* 2003;(Suppl):S41-4.
9. London GM. Vascular disease and atherosclerosis in uremia. *Nefrologia* 2005;25(Suppl):91-5.
10. Fujihara CK, Mattar AL, Vieira JM, Jr., Malheiros DM, Noronha Ide L, Gonçalves AR, *et al.* Evidence for the existence of two distinct functions for the inducible NO synthase in the rat kidney: effect of aminoguanidine in rats with 5/6 ablation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2278-87.
11. Gonçalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, *et al.* Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F945-54.
12. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *N Engl J Med* 2007;357:1316-25.
13. Dember LM, Jaber BL. Dialysis-related amyloidosis: late finding or hidden epidemic? *Semin Dial* 2006;19:105-9.
14. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2449-55.
15. Johnson WJ, Hagge WW, Wagoner RD, Dinapoli RP, Rosevear JW. Effects of urea loading in patients with far-advanced renal failure. *Mayo Clin Proc* 1972;47:21-9.
16. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic haemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998;31:607-17.
17. Stinghen AE, Bucharles S, Riella MC, Pecoits-Filho R. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Blood Purif* 2010;29:114-20.
18. Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, Kadokami T, Nakaike R, Sakata M, *et al.* Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. The role of platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1996;97:769-76.
19. Tyralla K, Amann K. Cardiovascular changes in renal failure. *Blood Purif* 2002;20:462-5.
20. Hausberg M, Kisters K, Kosch M, Barenbrock M. [Alterations of the arterial vessel wall in renal failure]. *Med Klin (Munich)* 2000;95:279-85.
21. New DI, Chesser AM, Thuraingham RC, Yaqoob MM. Structural remodeling of resistance arteries in uremic hypertension. *Kidney Int* 2004;65:1818-25.
22. Tornig J, Amann K, Ritz E, Nichols C, Zeier M, Mall G. Arteriolar wall thickening, capillary rarefaction and interstitial fibrosis in the heart of rats with renal failure: the effects of ramipril, nifedipine and moxonidine. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:667-75.