

ARTIGO ORIGINAL CONCISO

Estudo das Alterações Morfológicas, Moleculares e Hemodinâmicas Cardíacas no Modelo de Nefropatia Induzida pelo Aminonucleosídeo de Puromicina [44]

M. MOREIRA-RODRIGUES, R. RONCON-ALBUQUERQUE JR, T. HENRIQUES-COELHO,
B. SAMPAIO-MAIA, A. LEITE-MOREIRA, MANUEL PESTANA

Unidade de Investigação e Desenvolvimento de Nefrologia,
Serviço de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2006; 25 (5): 509-518

RESUMO

Introdução: A proteinúria e a diminuição da taxa de filtração glomerular têm assumido uma importância crescente na definição do risco cardiovascular dos doentes com insuficiência renal crónica (IRC). O objectivo do presente trabalho foi estudar as alterações morfológicas, moleculares e hemodinâmicas cardíacas no modelo animal de proteinúria e insuficiência renal induzidas pelo aminonucleosídeo de puromicina (PAN).

Métodos: Ratos normotensos (n = 14) foram aleatoriamente injectados com PAN (150 mg/kg, ip) ou com o veículo. A pressão arterial (PA) foi determinada diariamente e os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para avaliação da excreção urinária de sódio, proteínas e creatinina. Catorze dias após a administração de PAN procedeu-se à avaliação da hemodinâmica do ventrículo esquerdo (VE) através de um cateter de pressão, e à morfometria do coração. Depois, extraíram-se amostras transmuralis do VE para quantificação de ARNm da SERCA2a, fosfolamban (PLB), factor de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Resultados: Os animais tratados com PAN apresentaram uma redução da depuração da creatinina (14.º dia: $2,24 \pm 0,32$ vs. $4,51 \pm 1,08$ ml/min) e aumento da proteinúria (14.º dia: $51,0 \pm 9,0$ vs. $3,8 \pm 0,7$ mg/mg creatinina), sem elevação da PA sistólica

ABSTRACT

Morphologic, molecular and hemodynamic cardiac alterations in a model of nephropathy induced by puromycin aminonucleoside

Introduction: Proteinuria and decreased glomerular filtration rate are assuming increased importance in defining cardiovascular risk in chronic renal insufficiency. The aim of this work was to study morphologic, molecular and hemodynamic cardiac alterations in an animal model of proteinuria and renal insufficiency induced by puromycin aminonucleoside (PAN).

Methods: Normotensive rats (n = 14) were injected with PAN (150 mg/kg, ip) or with vehicle. Blood pressure was measured daily and the animals were placed in metabolic cages for evaluation of urinary excretion of sodium, protein and creatinine. Fourteen days after PAN administration left ventricular hemodynamics were evaluated through a pressure tip micromanometer and heart morphology was examined. Transmural samples of left ventricle were then taken for mRNA quantification of SERCA2a, phospholamban (PLB), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). **Results:** The animals treated with PAN presented a decrease in creatinine clearance (14th day: 2.24 ± 0.32 vs. 4.51 ± 1.08 ml/min) and an increase in proteinuria (14th day: 51.0 ± 9.0

(14.º dia: 151 ± 7 vs. 141 ± 6 mmHg) ou diastólica (14.º dia: 85 ± 7 vs. 86 ± 3 mmHg). Estas alterações acompanharam-se de atrofia cardíaca com diminuição da contractilidade do VE. A nível molecular, verificou-se uma redução do quociente de ARNm da SERCA2a/PLB, sem alteração significativa da expressão do ARNm do IGF-1 no VE.

Discussão: A nefropatia induzida pelo PAN acompanha-se de atrofia cardíaca, disfunção do VE e alterações na expressão de genes envolvidos na cinética do cálcio do miocárdio, na ausência de hipertensão arterial. Estes resultados poderão contribuir para a compreensão do risco cardiovascular aumentado dos doentes com IRC e proteinúria.

Palavras-Chave

Insuficiência renal; Aminonucleosídeo de puromicina; Proteinúria; Atrofia muscular; Função miocárdica; Cinética do cálcio

vs. 3.8 ± 0.7 mg/mg creatinine), without changes in systolic (14th day: 151 ± 7 vs. 141 ± 6 mmHg) or diastolic blood pressure (14th day: 85 ± 7 vs. 86 ± 3 mmHg). These alterations were accompanied by cardiac atrophy with decreased left ventricular contractility. A reduction in the SERCA2a/PLB mRNA ratio was observed without significant alteration in the expression of IGF-1 in the left ventricle.

Conclusions: PAN-induced nephropathy is accompanied by cardiac atrophy, left ventricular dysfunction and alterations in the expression of genes involved in myocardial calcium kinetics. These findings were not accompanied by increases in blood pressure and may contribute to our understanding of the increased cardiovascular risk in chronic renal insufficiency.

Key words

Renal insufficiency; Puromycin aminonucleoside; Proteinuria; Muscle atrophy; Myocardial function; Calcium kinetics

INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crónica (IRC) está associada a uma incidência aumentada de insuficiência cardíaca. Esta associação tem sido classicamente atribuída à elevada prevalência de hipertensão arterial e de doença coronária durante a progressão da IRC⁽¹⁾. Mais recentemente, outros mecanismos envolvidos na fisiopatologia da IRC como a anemia, as alterações do metabolismo fosfocálcico, a inflamação, a proteinúria e a diminuição da taxa de filtração glomerular têm assumido uma importância crescente na definição do risco cardiovascular aumentado na IRC^(1, 2, 3). Em particular, a proteinúria constitui actualmente um factor de prognóstico independente nos doentes com IRC, com uma correlação positiva entre o grau de proteinúria e a mortalidade cardiovascular⁽⁴⁾. Por sua vez, a redução da proteinúria através da utilização de fármacos com acção inibitória do eixo renina-angiotensina-aldosterona (e.g. antagonistas dos receptores da angiotensina II), acompanha-se de um impacto favorável na mortalidade cardiovascular e na progressão da IRC, sendo este efeito independente da acção anti-

INTRODUCTION

Chronic renal insufficiency (CRI) is associated with an increased incidence of heart failure. This association has traditionally been attributed to the high prevalence of hypertension and coronary disease found in progression of CRI⁽¹⁾. However, other mechanisms involved in the pathophysiology of CRI, such as anemia, changes in calcium-phosphorus metabolism, inflammation, proteinuria and reduced glomerular filtration rate are assuming increased importance in defining the cardiovascular risk associated with CRI^(1, 2, 3). Proteinuria, in particular, is now considered an independent prognostic risk factor in CRI patients, with a positive correlation between the degree of proteinuria and cardiovascular mortality⁽⁴⁾. Conversely, reducing proteinuria with drugs that inhibit the renin-angiotensin-aldosterone system, such as angiotensin receptor blockers, has a favorable impact on cardiovascular mortality and CRI progression; this effect is independent of the diuretic or antihypertensive action⁽⁵⁾.

-hipertensora dos fármacos⁽⁵⁾.

Os mecanismos envolvidos no aumento do risco cardiovascular dos doentes com proteinúria elevada permanecem ainda, no entanto, por esclarecer. A disfunção endotelial⁽⁶⁾ e o aumento dos níveis circulantes de factor de Von Willebrand⁽⁷⁾ nos doentes com proteinúria poderão explicar em parte esta associação. A desnutrição que acompanha a proteinúria marcada associa-se, por sua vez, a um aumento da actividade inflamatória que poderá contribuir também para elevar o risco cardiovascular destes doentes⁽⁸⁾. Em alternativa, a proteinúria poderá representar apenas um marcador de lesão renal, uma vez que os doentes com microalbuminúria apresentam uma média de idades mais elevada, hipertensão arterial e aumento da actividade dos marcadores inflamatórios. O impacto que estes factores poderão ter na remodelagem do miocárdio e na progressão para a insuficiência cardíaca permanece, ainda largamente desconhecida.

Com o objectivo de esclarecer a importância da diminuição da taxa de filtração glomerular e da proteinúria no risco cardiovascular que acompanha a IRC, estudámos as alterações morfológicas, moleculares e hemodinâmicas do coração no modelo de nefropatia induzida pelo aminonucleosídeo de puromicina (PAN) no rato. Neste modelo animal, a administração de PAN acompanha-se do aparecimento precoce de proteinúria nefrótica a que se associa uma redução da taxa de filtração glomerular⁽⁹⁾.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudos in vivo

Nefropatia induzida pelo PAN. Ratos normotensos Sprague-Dawley (Harlan, Barcelona, Espanha; 170 ± 10 g) foram injectados com PAN (150 mg/kg peso corporal; ip; n = 7) ou com veículo (ratos controlo; 0,9 % NaCl; ip; n = 7) no dia 0.

Estudos metabólicos. Os dois grupos de animais (PAN e controlos) foram colocados em gaiolas metabólicas para a avaliação da excreção urinária diária de sódio, proteínas e creatinina. O grupo controlo teve apenas acesso à mesma quantidade de comida ingerida pelos ratos a que foi administrado PAN. A PA (sistólica e diastólica) e a frequência cardíaca foram medidas diariamente na artéria da cauda

However, the mechanisms involved in the increased cardiovascular risk in patients with high proteinuria are not yet fully understood. Endothelial dysfunction⁽⁶⁾ and elevated levels of circulating von Willebrand factor⁽⁷⁾ in patients with proteinuria may partly explain the link. The malnutrition that accompanies marked proteinuria is in turn associated with increased inflammatory activity, which may also contribute towards the increased cardiovascular risk in these patients⁽⁸⁾. Alternatively, proteinuria may be simply a marker of renal damage, since patients with microalbuminuria tend to be older, with hypertension and increased inflammatory markers. The impact these factors may have on myocardial remodeling and on progression to heart failure remains largely unknown.

With the aim of determining the importance of decreased glomerular filtration rate and proteinuria in the cardiovascular risk that accompanies CRI, we studied morphologic, molecular and hemodynamic cardiac alterations in a rat model of nephropathy induced by puromycin aminonucleoside (PAN). In this model, the administration of PAN is accompanied by the early appearance of nephrotic proteinuria, together with decreased glomerular filtration rate⁽⁹⁾.

METHODS

In vivo studies

PAN-induced nephropathy. Normotensive Sprague-Dawley rats (Harlan, Barcelona, Spain; 170 ± 10 g) were injected with PAN (150 mg/kg body weight, ip; n = 7) or with vehicle (controls; 0.9 % NaCl, ip; n = 7) on day 0.

Metabolic studies. The two groups of animals (PAN and controls) were placed in metabolic cages for daily evaluation of urinary excretion of sodium, protein and creatinine. The control group had access to the same amount of food as the PAN rats. Systolic and diastolic blood pressure and heart rate were measured daily in the caudal artery using a photoelectric pulse detector (LE 5000, Leticia, Barcelona, Spain).

Left ventricular systolic function. Fourteen days after administration of PAN or vehicle the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight), placed over a heating pad to maintain body temperature between 36 and 38 °C, then

através de um detector fotoelétrico (LE 5000, Letica, Barcelona, Espanha).

Função sistólica do VE. Catorze dias depois da administração do PAN ou do veículo os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal), colocados numa placa de aquecimento para manter a sua temperatura corporal 36-38 °C, traqueostomizados e ventilados mecanicamente (Harvard Small Animal Ventilator, Model 683) fornecendo-se ar enriquecido com oxigénio (60 cpm) com um volume corrente de 1 mL/100g. De seguida, o coração foi exposto por esternotomia mediana e o pericárdio aberto. A aorta ascendente foi dissecada para permitir a sua oclusão externa durante o protocolo experimental. Para medir a pressão do VE, foi inserido um cateter de pressão de alta-fidelidade 3F (SPR-407, Millar Instruments, Houston, Texas) na cavidade do VE. Ambos os cateteres de pressão foram calibrados após estabilização de 30 minutos num banho de soro fisiológico a 37 °C. Após 10 minutos de estabilização iniciou-se o protocolo experimental. A elevação da pós-carga foi efectuada por oclusão abrupta e total da aorta ascendente durante a diástole que separa dois ciclos cardíacos, provocando um ciclo cardíaco isovolumétrico (ISO). O primeiro batimento a seguir à oclusão da aorta ascendente, batimento teste (ISO), foi comparado com o batimento controlo precedente. Procedeu-se ao registo da pressão do VE (PVE) e da sua primeira derivada (dP/dt). Os registos foram efectuados com a ventilação mecânica suspensa no fim da expiração e convertidos para dados digitais (Atcodas, Dataq; 500 Hz).

Estudos in vitro

Caracterização da atrofia muscular cardíaca e esquelética. O coração e o músculo *gastrocnemius* (membro posterior direito) foram removidos e pesados. Determinou-se o comprimento da tibia. Após dissecação do coração, o conjunto formado pela parede livre do VE e pelo septo interventricular foi pesado. Posteriormente, amostras da parede livre do VE e do *gastrocnemius* foram armazenadas a 80 °C para posterior determinação da concentração de proteínas totais (Método de Bradford; Bio-Rad 500-0002) e de ADN total (Bio-Rad 732-6343).

Quantificação do ARNm por RT-PCR em tempo real. O ARNm total (ARNm_{total}) foi

tracheostomized and ventilated mechanically (Harvard Small Animal Ventilator, model 683) with oxygen-enriched air at 60 cpm and current volume of 1 ml/100 g. The heart was exposed by means of a median sternotomy and the pericardium opened out, and the ascending aorta was dissected to allow external occlusion during the experimental protocol. A 3F high-fidelity pressure tip micromanometer (SPR-407, Millar Instruments, Houston, Texas) was inserted into the left ventricular (LV) cavity to measure LV pressure. Both pressure catheters were calibrated after a 30-minute stabilization period in a saline bath at 37 °C. After 10 minutes stabilization the experimental protocol was begun. Afterload was increased by sudden and complete occlusion of the ascending aorta during the diastole between two heartbeats, causing an isovolumetric heartbeat (ISO). The first heartbeat following occlusion of the ascending aorta the test beat (ISO) was compared with the preceding (control) beat. Left ventricular pressure (LVP) was measured and its first derivative (dP/dt) calculated. The measurements were taken with mechanical ventilation suspended at end-expiration and converted to digital form (Atcodas, Dataq) at 500 Hz.

In vitro studies

Characterization of cardiac and skeletal muscular atrophy. The heart and the *gastrocnemius* muscle from the right hind leg were removed and weighed and the length of the tibia was measured. The heart was dissected and the part composed of the LV free wall and the ventricular septum were weighed. Samples of the LV free wall and the *gastrocnemius* muscle were then stored at 80 °C for subsequent measurement of the total protein concentration (Bradford method, Bio-Rad 500-0002) and total DNA (Bio-Rad 732-6343).

Quantification of mRNA by real-time RT-PCR. Total mRNA (mRNA_{total}) was extracted using the guanidine-thiocyanate method and loaded onto a silica gel membrane in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen 74124). The purity and concentration of the mRNA_{total} were determined spectrophotometrically (Eppendorf 613000.012).

The relative quantification of specific mRNA was carried out by two-step real-time RT-PCR.

extraído pelo método de guanídio-tiocianato e ligação a membrana de sílica-gel, de acordo com as instruções do fabricante (*Qiagen* 74124). A pureza e a concentração do ARNm_{total} foram determinadas por espectrofotometria (Eppendorf 613000.012).

A quantificação relativa do ARNm específico foi efectuada por *two-step real time RT-PCR*. A transcrição reversa (10 min a 22°C, 50 min a 50°C e 10 min a 95°C; volume final 20 µl) foi efectuada num termociclador convencional (*Whatman Biometra* 050-901): 40 U/reacção de transcriptase reversa (*Invitrogen* 18064-014), 20 U/reacção de inibidor da RNase (*Promega* N2515), 30 ng/ml de *random primers* (*Invitrogen* 481990-011), 0,5 nM de nucleótidos (MBI Fermentas R0192), 1,9 mM MgCl₂ e 10 mM de DTT. Dez por cento do produto da transcrição reversa foi utilizado na reacção de PCR (*Light-Cycler, Roche*), utilizando o fluorocromo *SYBR Green* (*Qiagen* 204143) de acordo com as instruções do fabricante. A formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto de amplificação foram avaliadas através da análise das *melting curves* dos PCR em tempo real e dos géis de agarose-2% (brometo de etídeo, 0,5 g/ml). Para cada molécula de ARNm estudada, foram elaboradas curvas padrão a partir da correlação entre a quantidade inicial de ARNm_{total} e ciclo PCR limiar (método da segunda derivada) de diluições crescentes de uma amostra aleatória de miocárdio de rato ($r > 0,97$). A quantificação relativa dos ARNm específicos foi obtida através da regressão do ciclo PCR limiar do produto da transcrição reversa da amostra (50 ng de ARNm_{total}). A expressão de GAPDH não variou significativamente entre os grupos experimentais, tendo este gene sido utilizado como controlo interno. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (UA), definidas como a média dos valores do grupo Sham (Sham = 1 UA), após normalização para o GAPDH.

Foram utilizados os seguintes pares de *primers* específicos para os genes a estudar: SERCA2a - directo 5'-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' e reverso 5'-GGA GGA GAT GAG GTA GCG GAT GGA-3'; PLB - directo 5'-GGC ATC ATG GAA AAA GTC CA-3' e reverso 5'-GGT GGA GGG CCA GGT TGT AA-3'; IGF-1 - directo 5'-CAG ACG GGC ATT GTG GAT-3' e reverso 5'-AGT CTT

Reverse transcription (10 minutes at 22°C, 50 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C; total volume: 20 µL) was performed in a standard thermocycler (*Whatman Biometra* 050-901): 40 U reverse transcriptase (*Invitrogen* 18064-014); 20 U ribonuclease inhibitor (*Promega* N2515); 30 ng/ml random primers (*Invitrogen* 481990-011); 0.5 nM nucleotides (MBI Fermentas R0192); 1.9 mM MgCl₂ and 10 mM DTT. Ten percent of the product of reverse transcription was used in the PCR (*LightCycler, Roche*), using the fluorochrome *SYBR Green* (*Qiagen* 204143) in accordance with the manufacturers instructions. The formation of primer dimers and the purity of the amplification product were tested by melting curve analysis of the PCR product and of 2% agarose gel (0.5 g/ml ethidium bromide). For each mRNA molecule studied, standard curves were drawn based on the correlation between the initial quantity of mRNA_{total} and the threshold PCR cycle (second derivative method) from successive dilutions of a random sample of rat myocardium ($r > 0,97$). The relative quantification of specific mRNA was obtained by regression of the threshold PCR cycle of the reverse transcription product of the sample (50 ng of mRNA_{total}). GAPDH expression did not vary significantly between the experimental groups and so this gene was used as an internal control. The results are expressed in arbitrary units (AU), defined as the mean of values in the control group (control = 1 AU), after normalization for GAPDH.

The primer pairs for the genes under study were as follows: SERCA2a - forward 5'-CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA-3' and reverse 5'-GGA GGA GAT GAG GTA GCG GAT GGA-3'; PLB - forward 5'-GGC ATC ATG GAA AAA GTC CA-3' and reverse 5'-GGT GGA GGG CCA GGT TGT AA-3'; IGF-1 - forward 5'-CAG ACG GGC ATT GTG GAT-3' and reverse 5'-AGT CTT GGG CAT GTC AGT GTG-3'; GAPDH - forward 5'-CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3' and reverse 5'-TGG CCT TCC GTG TTC CTA CCC-3'.

RESULTS

Metabolic study of PAN-induced nephropathy

Throughout the study, sodium ingestion was similar in the rats treated with PAN and the controls. The PAN rats developed marked proteinuria on day 4, rising to a plateau on day 8 and remaining constant until day 14 (*Fig. 1A*). They also presented maximum sodium

GGG CAT GTC AGT GTG-3 ; GAPDH - directo 5 -
CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3 e reverso
5 -TGG CCT TCC GTG TTC CTA CCC-3 .

RESULTADOS

Estudo metabólico da nefropatia induzida pelo PAN

Ao longo do estudo a ingestão de sódio foi semelhante nos ratos tratados com PAN e nos ratos controlo. Os ratos tratados com PAN desenvolveram proteinúria marcada ao dia 4, atingindo um patamar a partir do dia 8, que se manteve constante até ao dia 14 (*Fig. 1-A*). Os ratos tratados com PAN apresentaram retenção máxima de sódio (*Fig. 1-B*) e acumulação de ascite ($14,5 \pm 1,1$ vs. $0,7 \pm 0,1$; g) ao dia 7. A partir do dia 10 verificou-se um aumento progressivo da excreção urinária de sódio até ao final do estudo (*Fig. 1-B*), que se acompanhou com a quase completa mobilização da ascite ($1,3 \pm 0,3$ vs. $0,6 \pm 0,1$; g).

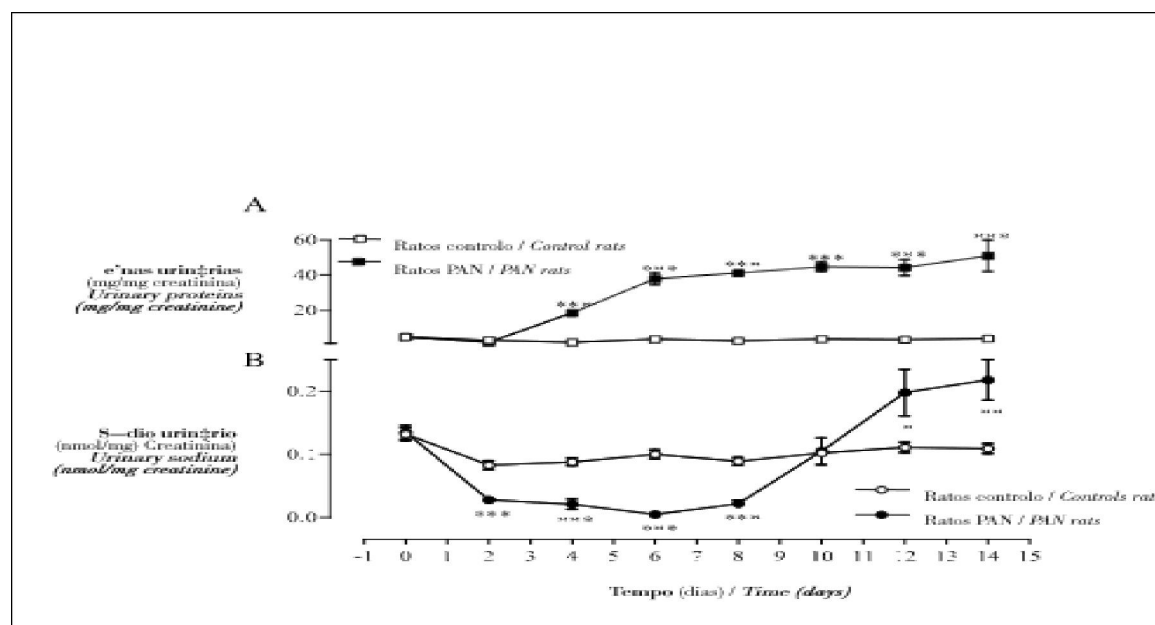
A PA sistólica (14.º dia: $150,5 \pm 7,2$ vs. $141,0 \pm 5,7$; mmHg) e diastólica (14.º dia: $85,9 \pm 6,9$ vs. $85,5 \pm 3,1$; mmHg) não diferiram significativamente entre os ratos nefróticos e os ratos controlo ao longo do estudo. Paralelamente, a depuração da creatinina foi menor nos ratos tratados com PAN do que nos ratos

retention (*Fig. 1B*) and ascites (14.5 ± 1.1 vs. 0.7 ± 0.1 g) on day 7. From day 10, there was a progressive increase in urinary excretion of sodium until the end of the study (*Fig. 1B*) that was accompanied by almost complete mobilization of the ascites (1.3 ± 0.3 vs. 0.6 ± 0.1 g).

Systolic (14th day: 150.5 ± 7.2 vs. 141.0 ± 5.7 mmHg) and diastolic (14th day: 85.9 ± 6.9 vs. 85.5 ± 3.1 mmHg) blood pressure did not differ significantly between PAN and control rats during the study. At the same time, creatinine clearance was lower in the PAN animals than in the controls, both on day 7 (2.24 ± 0.81 vs. 5.65 ± 1.38 ml/min) and on day 14 (2.24 ± 0.32 vs. 4.51 ± 1.08 ml/min). Plasma creatinine levels were higher in the PAN rats, both on day 7 (0.54 ± 0.06 vs. 0.20 ± 0.02 mg/dl) and on day 14 (0.32 ± 0.03 vs. 0.22 ± 0.02 mg/dl).

Characterization of cardiac and skeletal muscle atrophy

By day 14 following PAN administration, a significant reduction was seen in the ratio between skeletal and cardiac (LV) muscle weight and tibia length. The ratios of protein concentration to DNA concentration in skeletal and cardiac muscle were also lower in the PAN rats than in the controls (*Table I*).



*Fig. 1 (A) Proteínas urinárias e (B) excreção urinária de sódio nos ratos controlo e tratados com PAN ao longo do estudo. Os símbolos representam médias de 7 ratos por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, relativamente aos valores do grupo controlo.*

*Fig. 1 (A) Urinary proteins and (B) urinary excretion of sodium in control and PAN rats over the course of the study. The symbols represent the means of 7 rats per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to values in the control group.*

Quadro I

Caracterização da atrofia muscular esquelética e cardíaca nos ratos controlo e ratos com síndrome nefrótica induzido pelo PAN 14 dias após a injeção

	Controlo	PAN
Peso gast/comprimento tibia, mg/mm	458±11	206±52*
Proteínas gast/ADN gast, mg/mg	226,9±20,1	161,1±19,8*
Peso VE + S/comprimento tibia, mg/mm	174,2±6,6	144,4±5,6*
Proteínas VE/ADN VE, mg/mg	96,2±3,0	69,8±4,4*

Os valores são médias ± erro padrão; n = 7 experiências por grupo. Gast, músculo gastrocnemius; VE + S, ventrículo esquerdo mais septo; ADN, ácido desoxirribonucleico. *p<0,05, relativamente aos valores do grupo controlo.

controlo, quer no dia 7 ($2,24 \pm 0,81$ vs. $5,65 \pm 1,38$; ml/min) quer no dia 14 ($2,24 \pm 0,32$ vs. $4,51 \pm 1,08$; ml/min). Os níveis plasmáticos de creatinina encontravam-se aumentados nos ratos tratados com PAN, quer no dia 7 ($0,54 \pm 0,06$ vs. $0,20 \pm 0,02$; mg/dl) quer no dia 14 ($0,32 \pm 0,03$ vs. $0,22 \pm 0,02$; mg/dl).

Caracterização da atrofia muscular cardíaca e esquelética

No dia 14 após a injeção de PAN verificou-se uma diminuição significativa dos quocientes entre o peso dos músculos esquelético e cardíaco (VE) e o comprimento da tibia. Paralelamente, os quocientes entre a concentração de proteínas e a concentração de ADN dos músculos esquelético e cardíaco foram menores nos ratos PAN do que nos ratos controlo (*Quadro I*).

Table I

Characterization of skeletal and cardiac muscle atrophy in control rats and PAN-induced nephropathy 14 days after administration

	Control	PAN
Gast weight/tibia length, mg/mm	458±11	206±52*
Gast protein/gast DNA, mg/mg	226.9±20.1	161.1±19.8*
LV+S weight/tibia length, mg/mm	174.2±6.6	144.4±5.6*
LV protein/LV DNA, mg/mg	96.2±3.0	69.8±4.4*

Values are means ± standard error; n = 7 experiments per group. Gast, gastrocnemius muscle; LV + S, left ventricle plus septum. *p<0.05 compared to values in the control group.

LV systolic function

Fourteen days after PAN administration, a significant reduction was observed in dP/dtmax (4012 ± 398 vs. 5784 ± 533 mmHg/s) and peak isovolumetric pressure (164.8 ± 14.2 vs. 205.2 ± 5.5 mmHg), reflecting LV systolic dysfunction.

Quantification of IGF-1, SERCA2a and PLB mRNA in the LV

IGF-1 mRNA levels did not vary significantly in the rats under study (*Fig. 2A*). A decrease in SERCA2a and PLB mRNA was observed in the PAN group. The ratio of SERCA2a to PLB mRNA was also significantly reduced at 14 days after PAN administration (*Fig. 2B*).

DISCUSSION

In the present study, PAN-induced

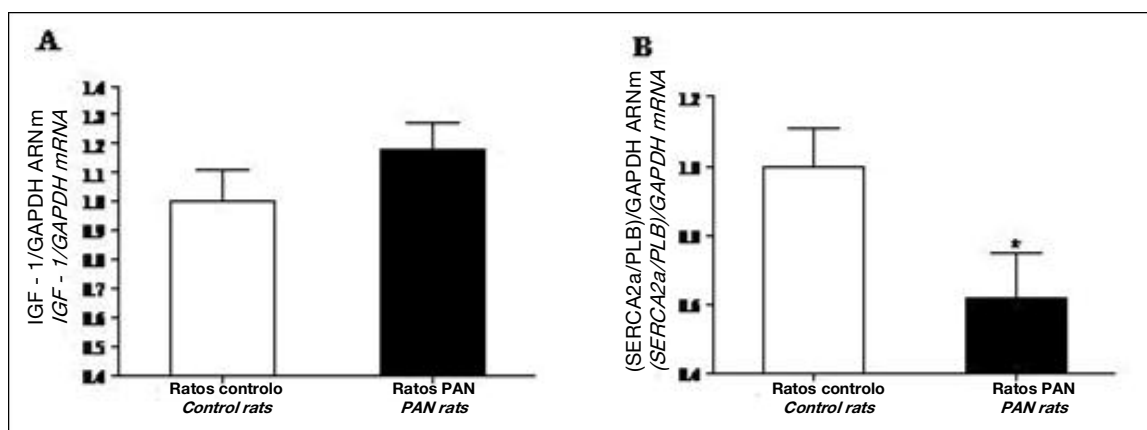


Fig. 2 Quociente entre os níveis do ARNm de IGF-1 (*A*) e quociente entre os níveis do ARNm da SERCA2a pelo PLB (*B*) expressos em unidades arbitrárias e normalizados para o ARNm do GAPDH em ratos controlo e em ratos com síndrome nefrótica induzido pelo PAN, 14 dias após a injeção. As barras representam médias de 7 ratos por grupo. *p<0,05, relativamente aos valores do grupo controlo.

Fig. 2 Ratio of levels of IGF-1 mRNA (*A*) and ratio of levels of SERCA2a to PLB mRNA (*B*) expressed in arbitrary units and normalized for GAPDH mRNA in controls and rats with PAN-induced nephropathy, 14 days after administration. The bars represent the means of 7 rats per group. *p<0.05 compared to values in the control group.

Função sistólica VE

Catorze dias após a injeção de PAN, observou-se uma diminuição significativa do dP/dt_{max} (4012 ± 398 vs. 5784 ± 533 mmHg/s) e da pressão isovolumétrica máxima ($164,8 \pm 14,2$ vs. $205,2 \pm 5,5$ mmHg) a traduzir disfunção sistólica do VE.

Quantificação do ARNm do IGF-1, SERCA2a e PLB no VE

Os níveis de ARNm do IGF-1 não variaram significativamente nos ratos em estudo (*Fig. 2-A*). Observou-se uma diminuição do ARNm da SERCA2a e do PLB no grupo PAN. Verificou-se, também, que a razão do ARNm da SERCA2a pelo PLB estava significativamente diminuída aos 14 dias após a injeção de PAN (*Fig. 2-B*).

DISCUSSÃO

No presente estudo a nefropatia induzida pelo PAN caracterizou-se por uma redução da taxa de filtração glomerular e por proteinúria marcada, de acordo com o previamente descrito por diferentes grupos de investigação⁽⁹⁾. Estas alterações acompanharam-se por uma variação bifásica do balanço de sódio: numa fase inicial (até ao dia 8), assistiu-se a retenção de sódio, seguida de uma fase de balanço negativo do sódio com mobilização da ascite (do dia 8 até ao dia 14). As alterações na função renal e no balanço de sódio não se acompanharam, no entanto, de hipertensão arterial.

Neste modelo experimental, a nefropatia induzida pelo PAN acompanhou-se de atrofia muscular esquelética e cardíaca traduzida pela diminuição significativa dos quocientes entre o peso dos músculos esquelético ou cardíaco (VE) e o comprimento da tíbia e por uma redução dos quocientes entre a concentração de proteínas e a concentração de ADN dos músculos esquelético e cardíaco. Tendo em conta que o eixo hormona de crescimento/IGF-1 tem um papel anabólico importante⁽¹⁰⁾, quantificou-se a expressão do ARNm do IGF-1 no VE. A ausência de alterações significativas nos níveis de ARNm do IGF-1 no miocárdio do grupo PAN sugere que a atrofia cardíaca observada nos animais tratados com PAN não depende de uma redução deste factor de crescimento.

A atrofia cardíaca cursou com disfunção sistólica do VE. Paralelamente, observou-se uma redução significativa do quociente SERCA2a/PLB, o que poderá indicar que as

nephropathy was characterized by a decreased glomerular filtration rate and marked proteinuria, in agreement with the findings of other research groups⁽⁹⁾. These alterations were accompanied by a two-phase change in the sodium balance: an initial phase, up to day 8, of sodium retention, followed by a phase of negative sodium balance with mobilization of ascites, from day 8 to day 14. However, the changes in renal function and sodium balance were not accompanied by hypertension.

In this experimental model, PAN-induced nephropathy was accompanied by atrophy of skeletal and cardiac muscle, as shown by the significant reduction in the ratio between weight of skeletal or cardiac (LV) muscle and tibia length and a decrease in ratios of protein concentration to DNA concentration from skeletal and cardiac muscle. Given the important role in anabolism played by the growth hormone/IGF-1 axis⁽¹⁰⁾, the expression of IGF-1 mRNA in the LV was measured. The absence of significant changes in IGF-1 mRNA levels in the myocardium in the PAN group suggests that the cardiac atrophy seen in these animals was not caused by a decrease in this growth factor.

The cardiac atrophy was associated with LV systolic dysfunction. A significant reduction in the SERCA2a/PLB ratio was also seen, which may indicate that changes in calcium kinetics could be behind the contractile dysfunction observed in this model. SERCA2a is the main protein involved in calcium reuptake by the sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes and is constitutively inhibited by PLB. Both reduced SERCA2a activity and increased inhibition of its calcium-pumping action by PLB are associated with decreased calcium content in the sarcoplasmic reticulum⁽¹¹⁾, which may explain the systolic dysfunction observed. Our results thus suggest that, as in heart failure⁽¹²⁾, the LV dysfunction seen in PAN-induced nephropathy may be related to changes in the calcium kinetics of cardiomyocytes.

PAN causes proteinuria that selectively damages podocytes in the renal glomeruli. These cells are key components of the glomerular filtration barrier to plasma proteins⁽¹³⁾. In our model, an increase in the number of nuclei in the cardiac tissue and a rise in the reticulin index

alterações da cinética do cálcio estão na base da disfunção contráctil observada neste modelo. A SERCA2a constitui a principal proteína envolvida na recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático dos cardiomiócitos, sendo inibida constitutivamente pelo PLB. De facto, quer a redução da actividade da SERCA2a, quer o aumento da inibição desta bomba de cálcio pelo PLB, associam-se à redução do conteúdo de cálcio no retículo sarcoplasmático⁽¹¹⁾, o que poderá estar na base da disfunção sistólica observada. Assim, os nossos resultados sugerem que, à semelhança do que se verifica na insuficiência cardíaca⁽¹²⁾, também a disfunção do VE que se observa na nefropatia induzida pelo PAN poderá estar relacionada com uma alteração da cinética do cálcio dos cardiomiócitos.

O PAN origina proteinúria danificando selectivamente os podócitos dos glomérulos renais, os quais são componentes chave na barreira de filtração glomerular a proteínas plasmáticas⁽¹³⁾. Catorze dias após a injeção de PAN, verificou-se neste modelo um aumento do número de núcleos no tecido cardíaco e um aumento do índice da reticulina, sem alteração do número de cardiomiócitos⁽¹⁴⁾. No entanto, não foi possível esclarecer se estas alterações foram secundárias à nefropatia ou à toxicidade cardíaca induzida pelo PAN⁽¹⁴⁾. O PAN é um análogo nucleosídico da adenosina resultante da clivagem hidrolítica da puromicina. Apesar de partilhar algumas propriedades biológicas com a puromicina (e.g. efeito antiparasitário) o PAN não actua por inibição específica da síntese proteica. Embora varias hipóteses tenham sido avançadas para explicar o mecanismo de acção do PAN, verificou-se que baixas concentrações de PAN inibem selectivamente a síntese de ARN ribossomal em culturas de células de mamífero, ficando claro que ao contrário da puromicina o PAN não é um inibidor específico da biosíntese proteica⁽¹⁵⁾. Tendo em conta que o PAN actua como inibidor da síntese de ARN ribossomal, não se pode excluir que, indirectamente, ocorra diminuição da síntese proteica, com responsabilidades potenciais na instalação da atrofia muscular esquelética e cardíaca observada neste estudo.

À semelhança do PAN, a injeção de adriamicina também origina um modelo de nefropatia. No entanto, e ao contrário do PAN, a cardiotoxicidade da adriamicina está mais bem

were seen fourteen days after PAN administration, with no change in the number of cardio-myocytes⁽¹⁴⁾. However, it was not possible to determine whether these alterations were secondary to the nephropathy or to PAN-induced cardiac toxicity⁽¹⁴⁾. PAN is a nucleoside analog of adenosine that is produced by the hydrolytic cleavage of puromycin. Although it shares some biological properties with puromycin, such as an antiparasitic effect, PAN does not act specifically by inhibiting protein synthesis. Various possible explanations for its action have been put forward, and it is known that low concentrations of PAN selectively inhibit the synthesis of ribosomal RNA in mammalian cell cultures, but it is clear that unlike puromycin, PAN is not a specific inhibitor of protein synthesis⁽¹⁵⁾. However, since it acts as an inhibitor of ribosomal RNA synthesis, the possibility cannot be excluded that it is indirectly responsible for reduced protein synthesis, which could lead to the skeletal and cardiac muscle atrophy seen in this study.

Adriamycin, like PAN, also causes a model of nephropathy. However, unlike PAN, adriamycin's cardiotoxicity has been well characterized: it is severe, dose-dependent, progressive and in most cases irreversible, often leading to cardio-myopathy⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Furthermore, adriamycin's mechanism of action appears to differ from that of PAN: it has an antitumor effect, binding to DNA and inhibiting DNA replication and protein synthesis^(19, 20); these changes have not been seen with PAN.

In conclusion, in PAN-induced nephropathy, we observed cardiac atrophy, left ventricular dysfunction and alterations in the expression of genes involved in myocardial calcium kinetics, but these were not accompanied by hypertension. These preliminary findings may contribute to the characterization of the PAN-induced nephropathy model and to our understanding of the increased cardiovascular risk in patients with and proteinuria.

caracterizada, sendo grave, dependente da dose, progressiva e na maioria das vezes irreversível, originando frequentemente cardiomiopatia ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Por outro lado, o mecanismo de acção da adriamicina parece ser diferente do mecanismo de acção do PAN. De facto, a adriamicina, tem uma acção antitumoral, intercalando-se no ADN e causando um efeito inibitório sobre a replicação do ADN e sobre a síntese proteica ^(19, 20), alterações estas que não foram documentadas com o PAN.

Em conclusão, observamos na nefropatia induzida pelo PAN, atrofia cardíaca, disfunção do VE e alterações na expressão de genes envolvidos na cinética do cálcio no miocárdio, as quais não foram acompanhadas de hipertensão arterial. Estes resultados preliminares poderão contribuir para a caracterização do modelo de nefropatia induzido pelo PAN e para a compreensão do risco cardiovascular aumentado dos doentes com IRC e proteinúria.

A G R A D E C I M E N T O S

Trabalho subsidiado pelos Projectos POCI/SAU-OBS/55288/2004 da Unidade de I & D de Nefrologia (n.º 725) e POCTI/CBO/47519/2002 da Unidade I & D Cardiovascular (n.º 51/94) da Fundação para a Ciência e a Tecnologia/FEDER e por um projecto de investigação da Sociedade Portuguesa Nefrologia de 2005.

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Meguid El Nahas, A. & Bello, A. K. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 2005;365:31-40.
2. Ritz, E., Dikow, R. & Ruilope, L. M. Renal dysfunction as a cardiovascular risk factor. *Curr Hypertens Rep* 2003;4:365-8.
3. Segura, J., Campo, C. & Ruilope, L. M. Proteinuria: an underappreciated risk factor in cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep* 2002;4:458-62.
4. Toto, R. D. Proteinuria reduction: mandatory consideration or option when selecting an antihypertensive agent? *Curr Hypertens Rep* 2005;7:374-8.
5. Volpe, M., Ruilope, L. M., McInnes, G. T., Waeber, B. & Weber, M. A. Angiotensin-II receptor blockers: benefits beyond blood pressure reduction? *J Hum Hypertens* 2005;19:331-9.
6. Clausen, P., Jensen, J. S., Jensen, G., Borch-Johnsen, K. & Feldt-Rasmussen, B. Elevated urinary albumin excretion is associated with impaired arterial dilatory capacity in clinically healthy subjects. *Circulation* 2001;103:1869-74.
7. Pedrinelli, R. et al. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Lancet* 1994;344:14-8.
8. Shoji, T. & Nishizawa, Y. Chronic kidney disease as a metabolic syndrome with malnutrition need for strict control of risk factors. *Intern Med* 2005;44:179-87.
9. Yamazaki, T. Podocytic degeneration and regeneration in puromycin aminonucleoside nephropathy in the rat. *Pathol Int* 1995;45:465-72.
10. Saetrum Opgaard, O. & Wang, P. H. IGF-I is a matter of heart. *Growth Horm IGF Res* 2005;15:89-94.
11. Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198-205.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by projects POCI/SAU-OBS/55288/2004 of the Nephrology R&D Unit (no. 725) and POCTI/CBO/47519/2002 of the Cardiovascular R&D Unit (no. 51/94) of the Portuguese Foundation for Science and Technology / FEDER and by a 2005 research project of the Portuguese Society of Nephrology.

M. Moreira-Rodrigues received grant SFRH/BD/18869/2004 of the Foundation for Science and Technology/FEDER.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

MANUEL PESTANA

Unidade de Investigação e Desenvolvimento em Nefrologia

Faculdade de Medicina, Universidade do Porto
4200-319 PORTO, PORTUGAL

e-mail: mvasconcelos@hsjoao-min-saude.pt

12. Arai, M., Matsui, H. & Periasamy, M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 1994;74:555-64.
13. Grond, J., Muller, E. W., van Goor, H., Weening, J. J. & Elema, J. D. Differences in puromycin aminonucleoside nephrosis in two rat strains. *Kidney Int* 1983;33:524-9.
14. van der Vijgh, W. J., et al. Morphometric study of myocardial changes during puromycin aminonucleoside induced nephropathy in rats. *Anticancer Res* 1987;7:1111-5.
15. Studzinski, G. P. & Ellem, K. A. Relationship between RNA synthesis, cell division, and morphology of mammalian cells. I. Puromycin aminonucleoside as an inhibitor of RNA synthesis and division in HeLa cells. *J Cell Biol* 1966;29:411-21.
16. Blum, R. H. & Carter, S. K. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* 1974;80:249-59.
17. Ferrans, V. J. Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep* 1978;62:955-61.
18. Von Hoff, D. D., Layard, M., Rozenzweig, M. & Muggia, F. M. Time relationship between last dose of daunorubicin and congestive heart failure. *Cancer Treat Rep* 1977;61:1411-3.
19. Pigram, W. J., Fuller, W. & Hamilton, L. D. Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nat New Biol* 1972;235:17-9.
20. Zunina, F., Gambetta, R. & Di Marco, A. The inhibition in vitro of DNA polymerase and RNA polymerases by daunomycin and adriamycin. *Biochem Pharmacol* 1975;24:309-11.