



Universidade Federal de Pelotas
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária



Alterações fisiopatológicas do pH extracelular na atividade do receptor sensível ao cálcio modulado pela paratireoide

Carlos Loures Pires
Josiane de Oliveira Feijó

Pelotas, 11 de novembro de 2015



Journals of the
American Society of Nephrology

**Pathophysiologic Changes in Extracellular pH
Modulate Parathyroid Calcium-Sensing Receptor
Activity and Secretion *via* a Histidine-Independent
Mechanism**

Katherine L. Champion,^{*} Wanda D. McCormick,^{*†} Jim Warwicker,^{*}
Mohd Ezuan Bin Khayat,^{*‡} Rebecca Atkinson-Dell,^{*} Martin C. Steward,^{*}
Leigh W. Delbridge,[§] Hee-Chang Mun,[§] Arthur D. Conigrave,[§] and Donald T. Ward^{*}

Publicação = setembro de 2015

Fator de impacto = 9,34

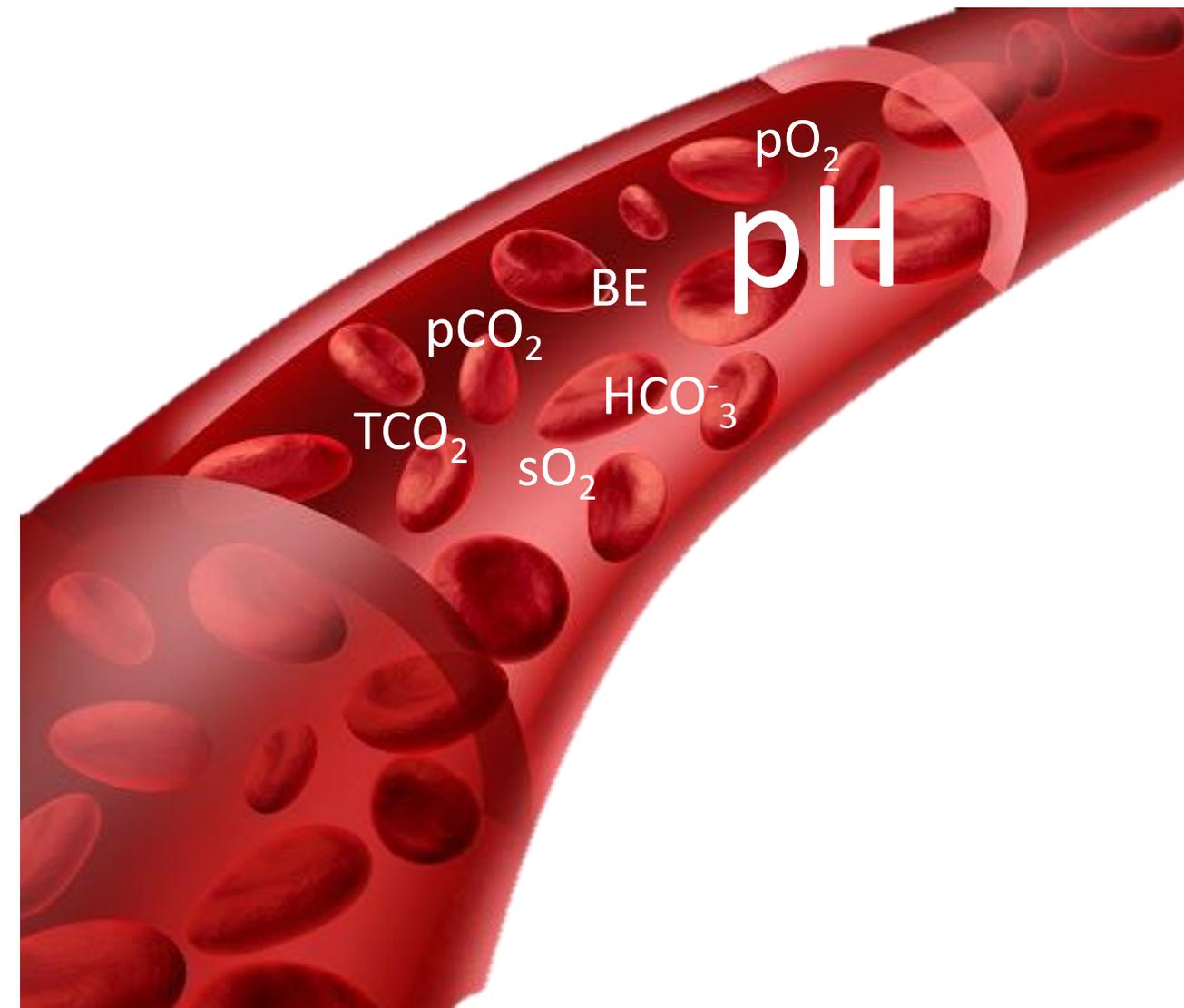
Cálcio

- Homeostase
- Hormônios

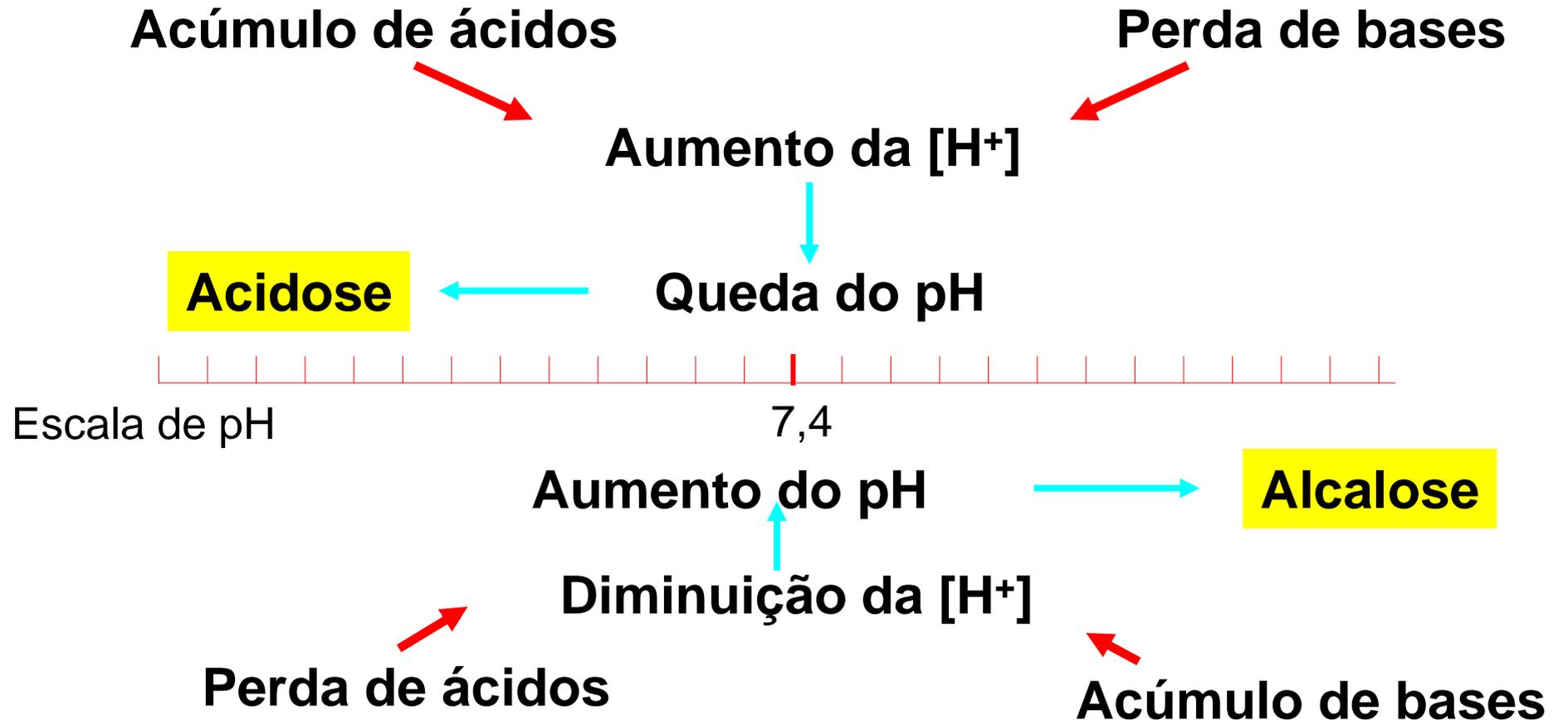
Prevenção

- Diminuição do cálcio pré-parto
- Cálcio oral no pós parto
- DCAD
- Outros

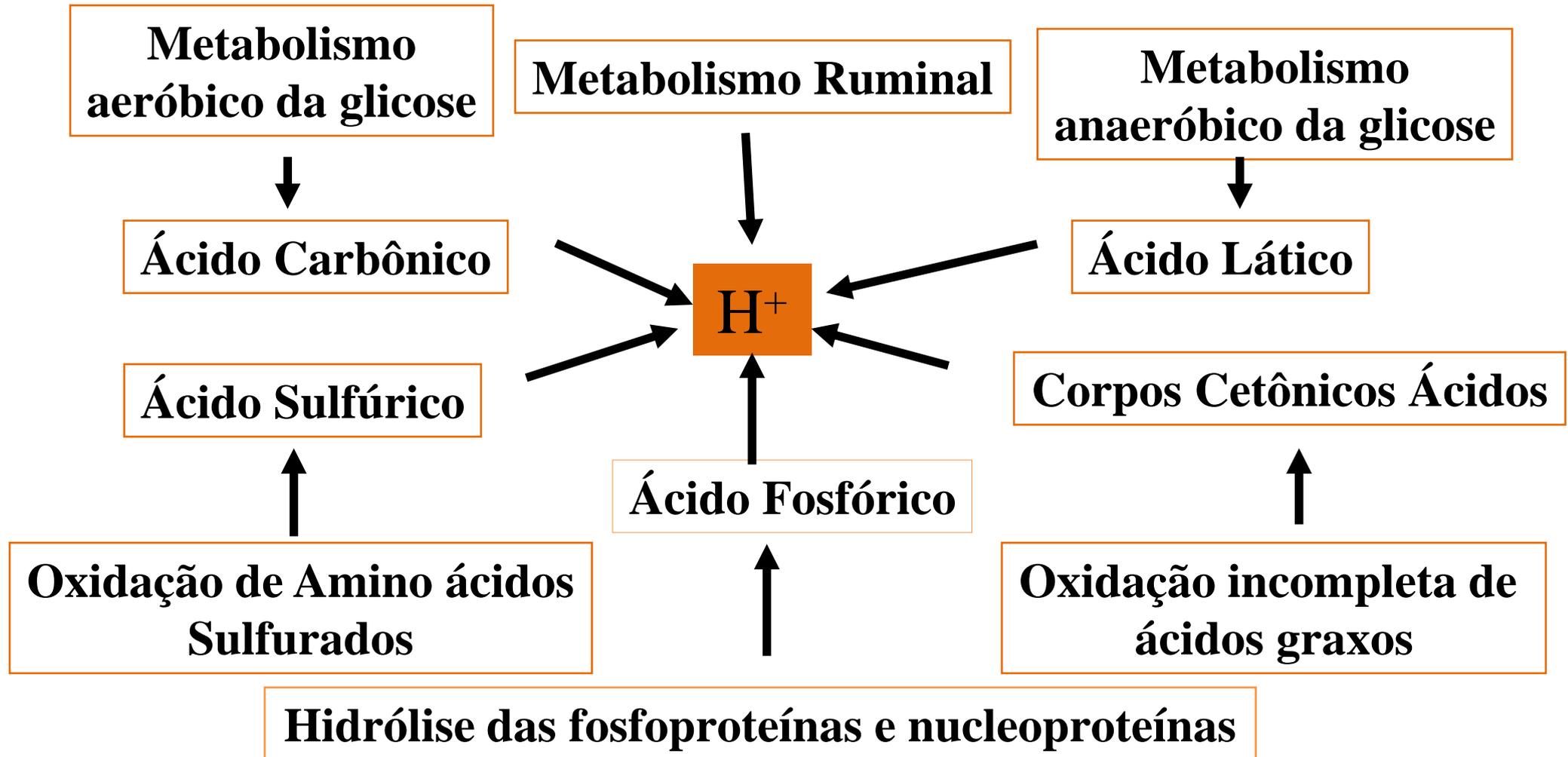
Escolha do artigo



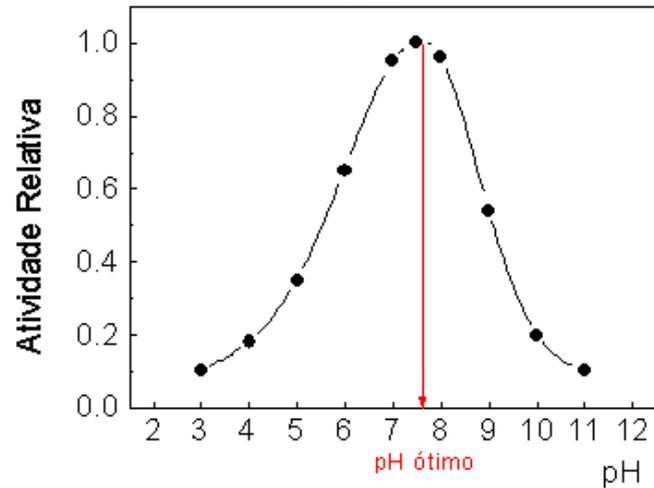
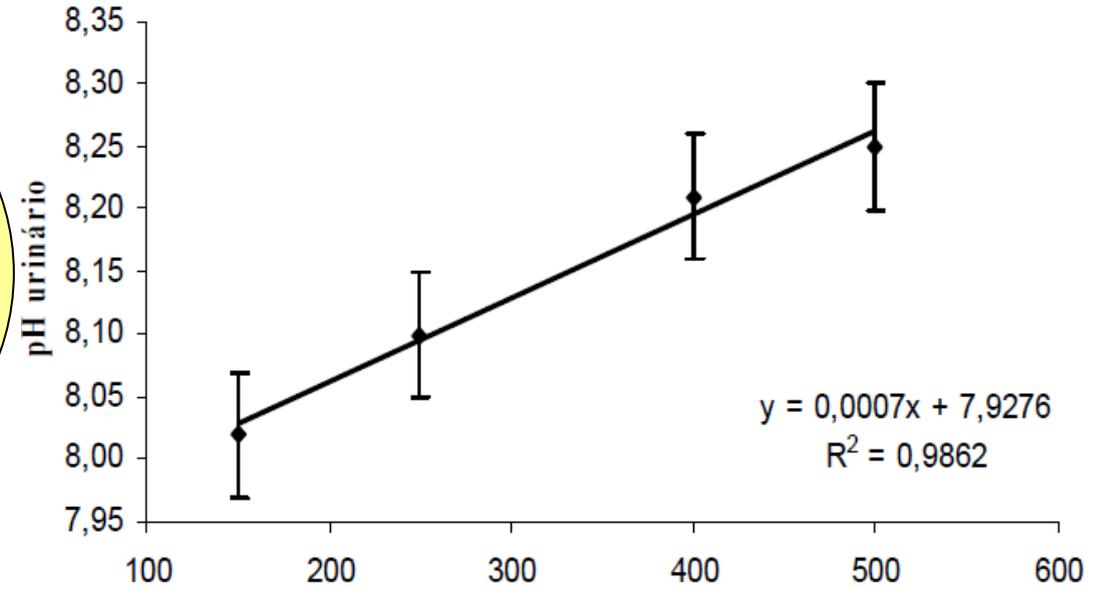
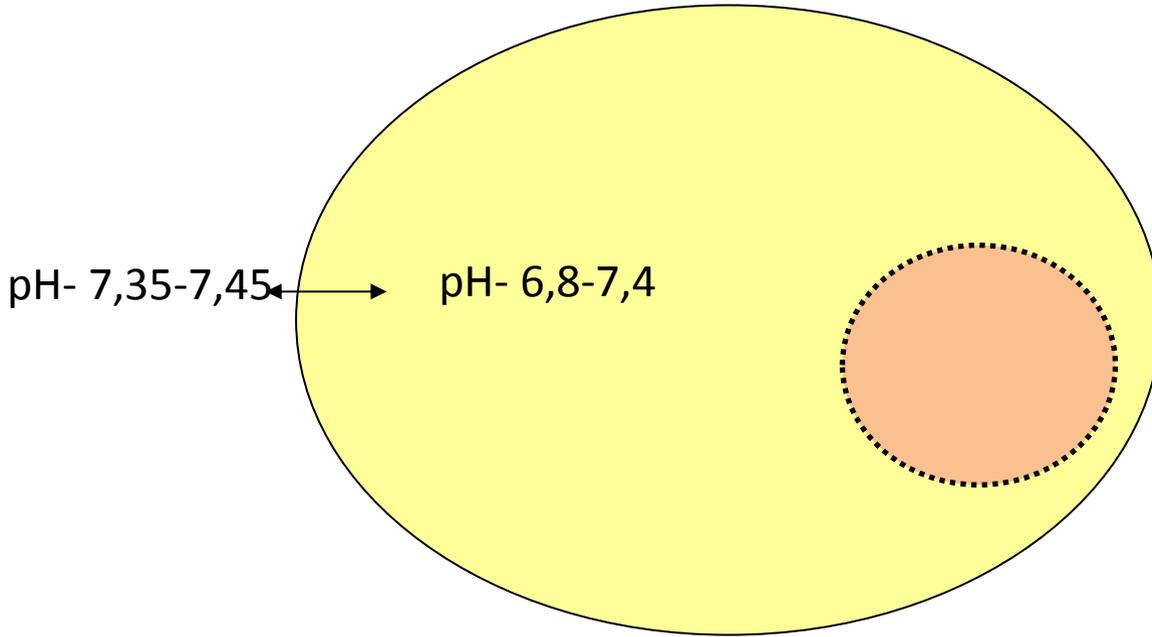
Alterações no pH



Fontes de H^+ decorrentes dos processos metabólicos



pH dos Líquidos Corporais



REGULAÇÃO ACIDOSE

pH= 7,35-7,45

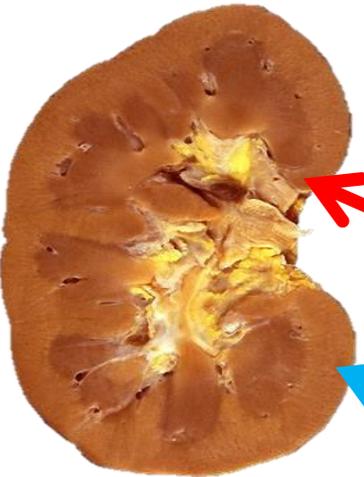
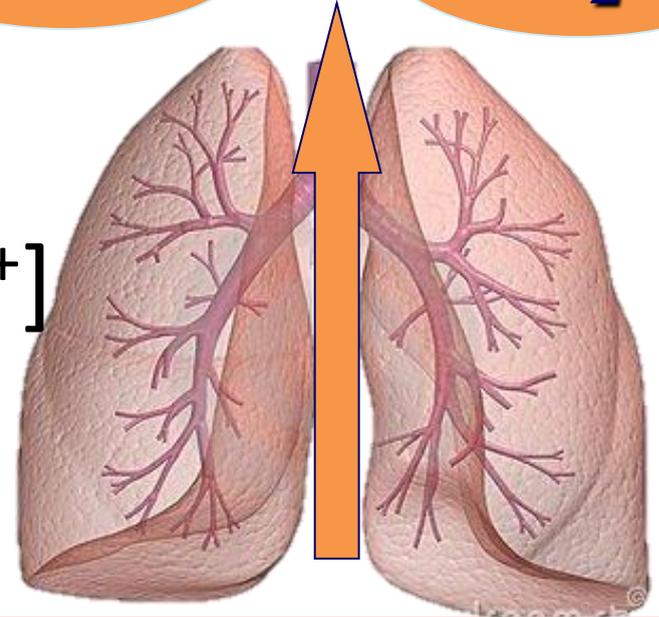
pCO₂ = 35,0 a 45,0 mmHg

HCO₃⁻ = 20,0 a 30,0 mmol/L

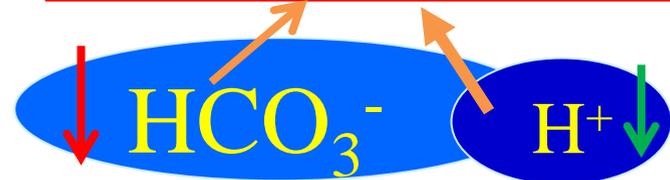
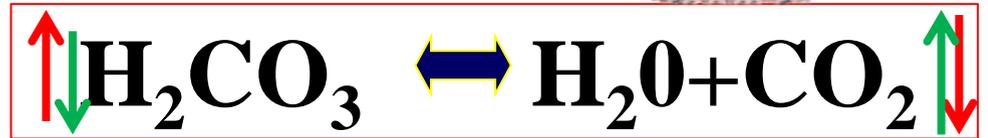
H₂O

CO₂

Aumento da [H⁺]
Diminuição da [H⁺]



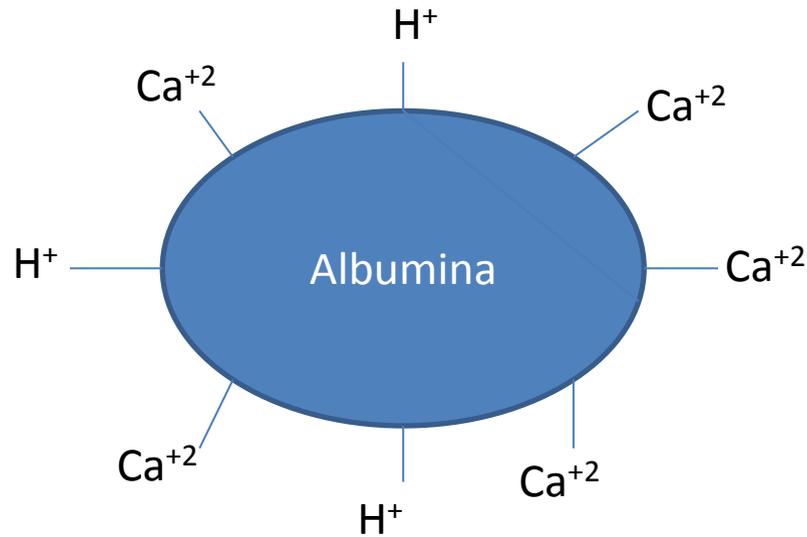
H⁺ URINA



Efeito do equilíbrio ácido base na ligação do Ca^{+2} às proteínas

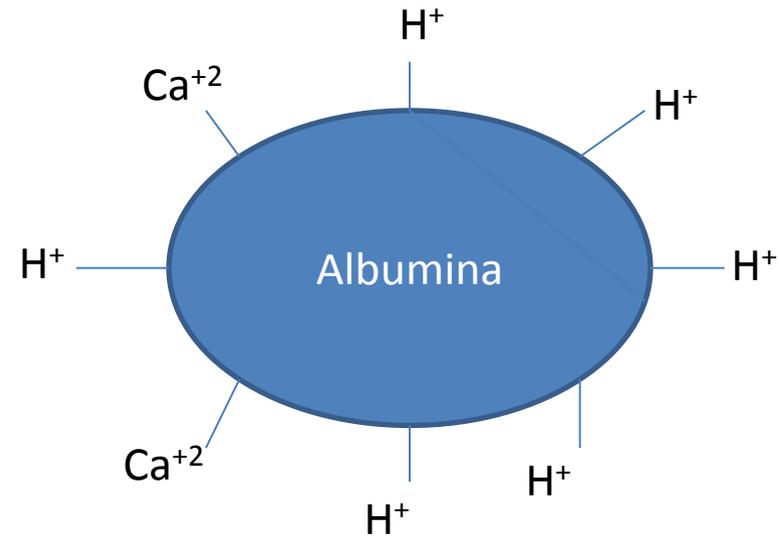


Diets Catiônicas



Cálcio Total \uparrow
Cálcio Ionizado \downarrow
Alcalose

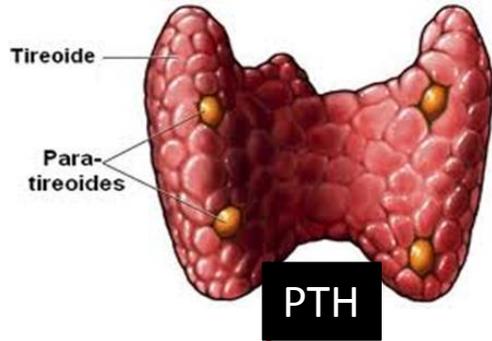
Diets Aniônicas



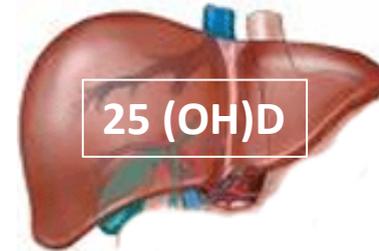
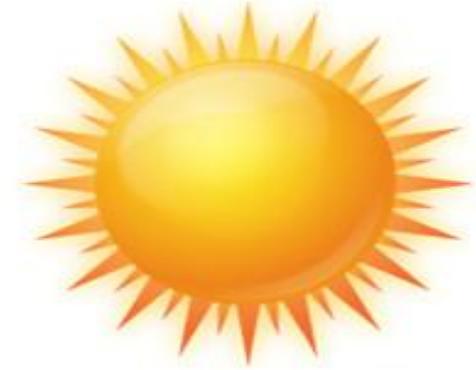
Cálcio Total \downarrow
Cálcio Ionizado \uparrow
Acidose

Homeostase do Cálcio

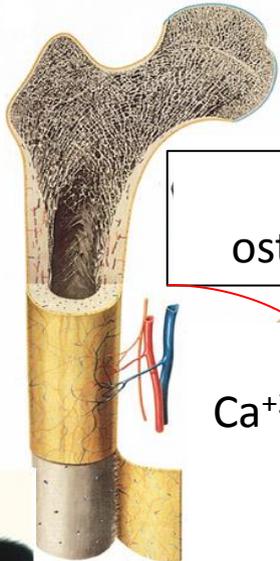
↓ Ca
↑ PTH
↓ Calcitonina



Vitamina D

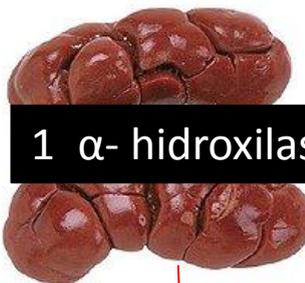


25 (OH)D



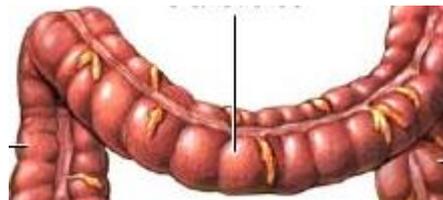
Ação osteoclástica

Ca⁺² e HPO₄



1 α- hidroxilase

↑ Absorção do Ca⁺² da Dieta



↑ 1,25 (OH)₂ D₃



↑ Ca
↓ PTH
↑ Calcitonina

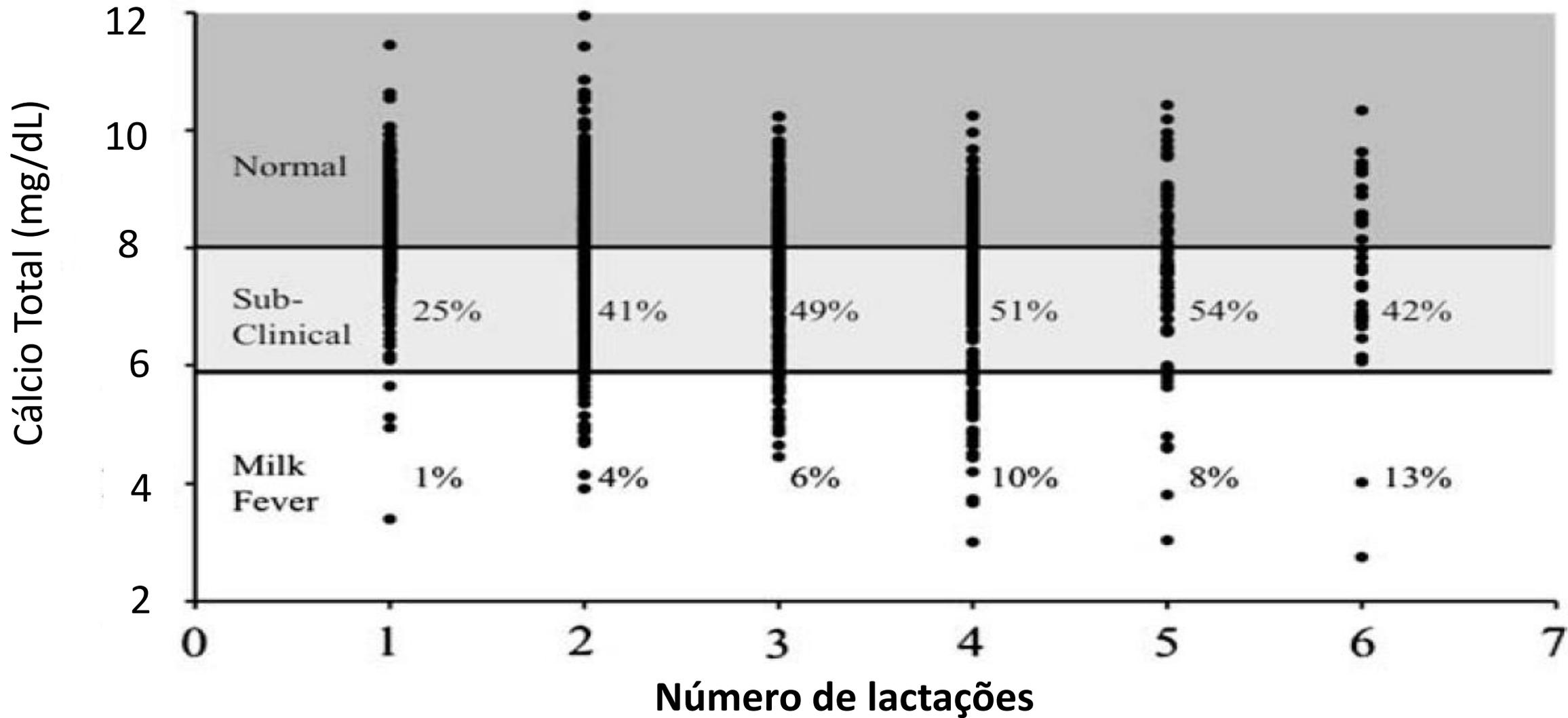
DIETA ANIÔNICA



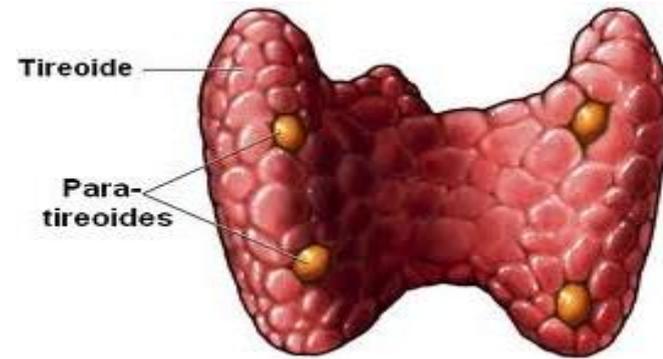
- ❖ Induz uma leve queda do pH sanguíneo levando a uma aborção ativa de cálcio
- ❖ Baixa palatabilidade acentuando o BEN

❖ Porém, a baixa palatabilidade da dieta fornecida próximo ao parto pode reduzir a ingesta alimentar e contribuir para acentuar o balanço energético negativo, aumentando ainda mais a possibilidade de ocorrência de doenças relacionadas a desordens metabólicas

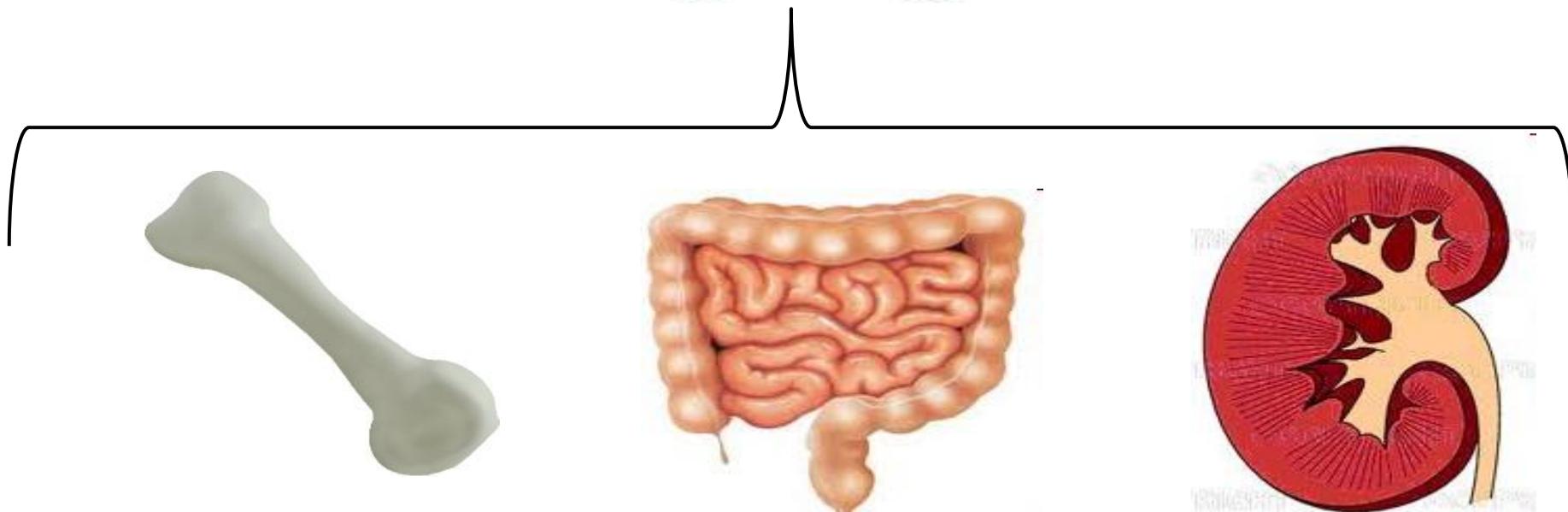
PREVALÊNCIA DE HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA



HOMEOSTASE



Vitamina D3





Avaliar se mudanças no pH extracelular alteram os receptores sensíveis ao Ca^{+2} nas células renais e paratireioides

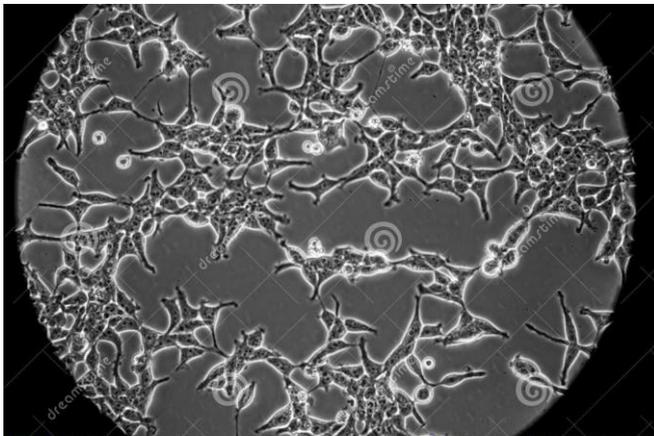
Análise do
 Ca^{2+}_i

Secreção do
PTH

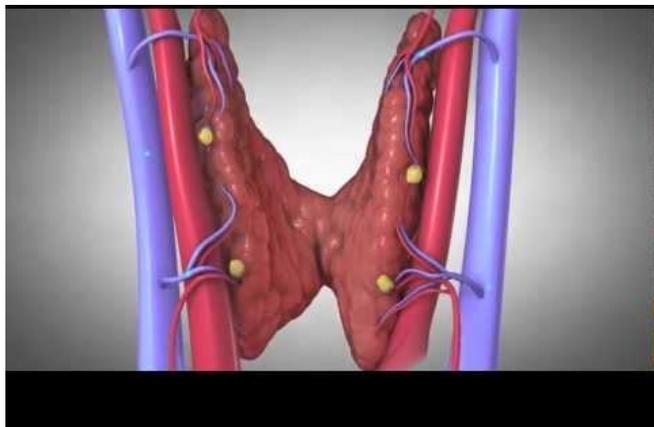
Fosforilação e
polimerização

Mobilização
do Ca^{2+}_i em
meio de
albumina

1º Ensaio: Análise da $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK-293 e células da paratireóide bovina por fluorometria

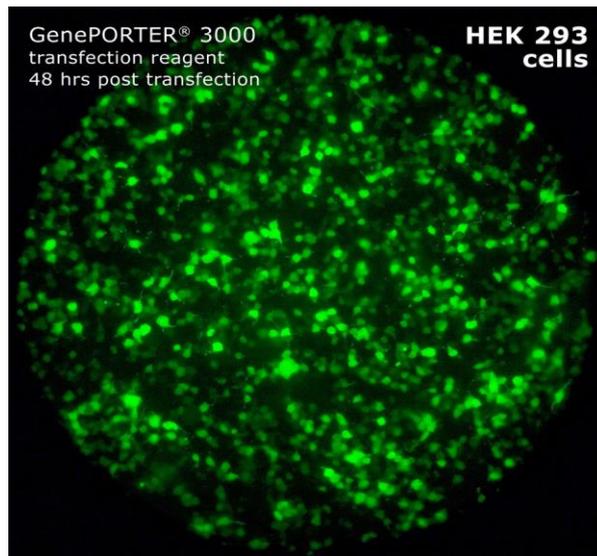


Células HEK 293 (células renais)



Células da paratireóide bovina

As células foram embebidas em solução nutritiva contendo marcadores fluorescentes e analisadas por fluorometria



Células embebidas com marcador FURA 2 / AM



DMEM: nutriente específico para cultura de células

RESULTADOS E DISCUSSÃO

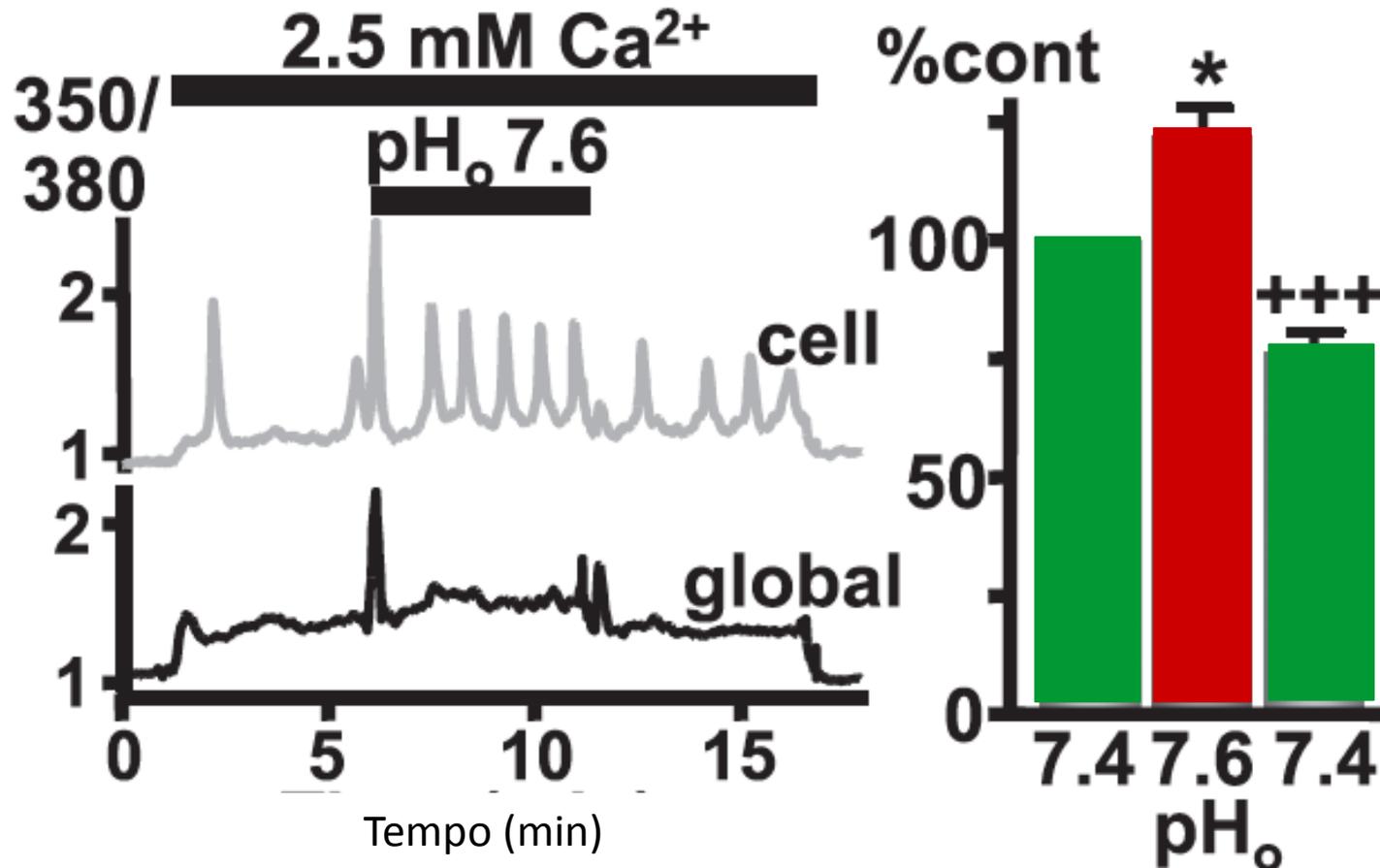
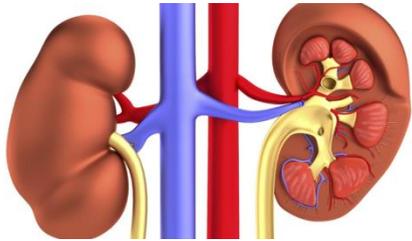


Figura 1: Resposta dos receptores de Cálcio das HEK 293, à variação do pH (7,4 – 7,6).

* P < 0,05; +++ P < 0,001; *** P < 0,001

RESULTADOS E DISCUSSÃO

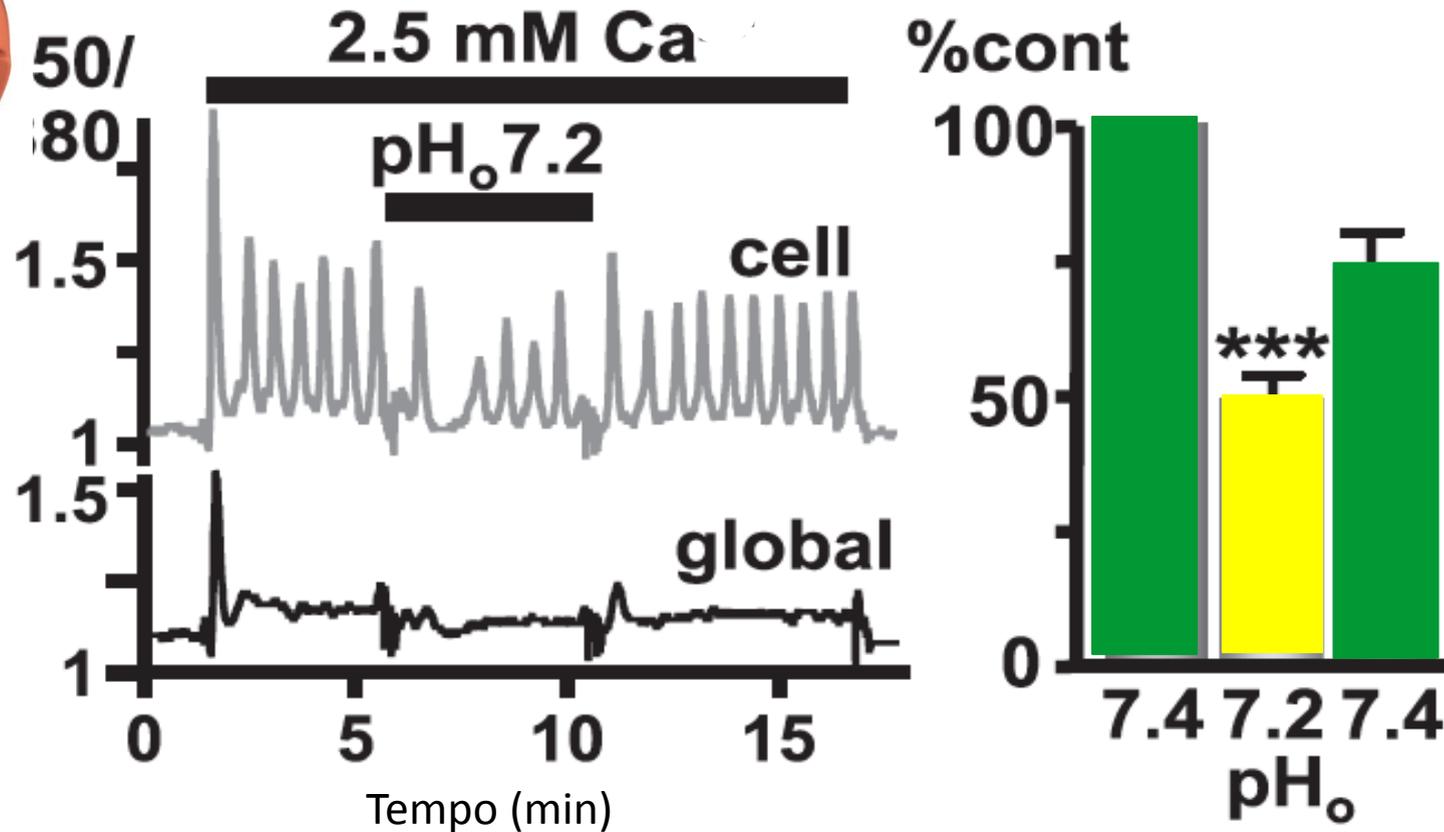
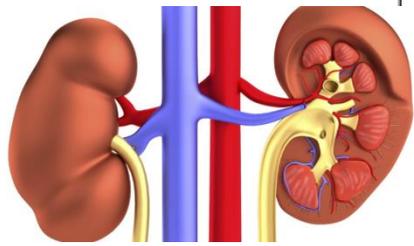


Figura 2: Resposta dos receptores de Cálcio das HEK 293, à variação do pH (7,4 – 7,2).

* P < 0,05; *** P < 0,001; *** P < 0,001

RESULTADOS E DISCUSSÃO

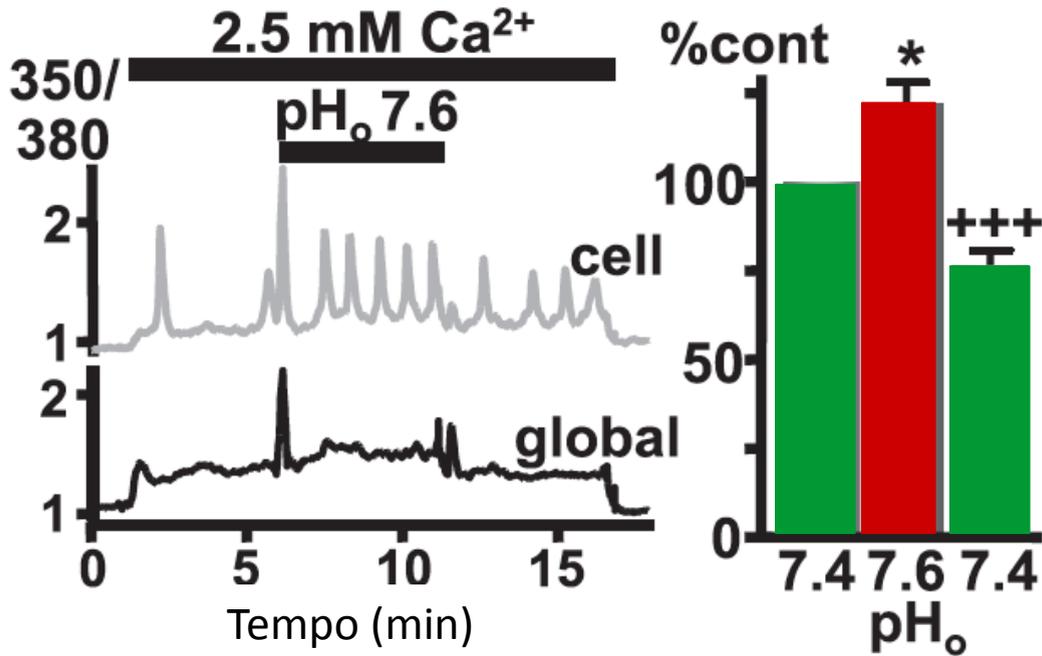


Figura 1: Resposta dos receptores de Cálcio das HEK 293, à variação do pH (7,4 – 7,6).

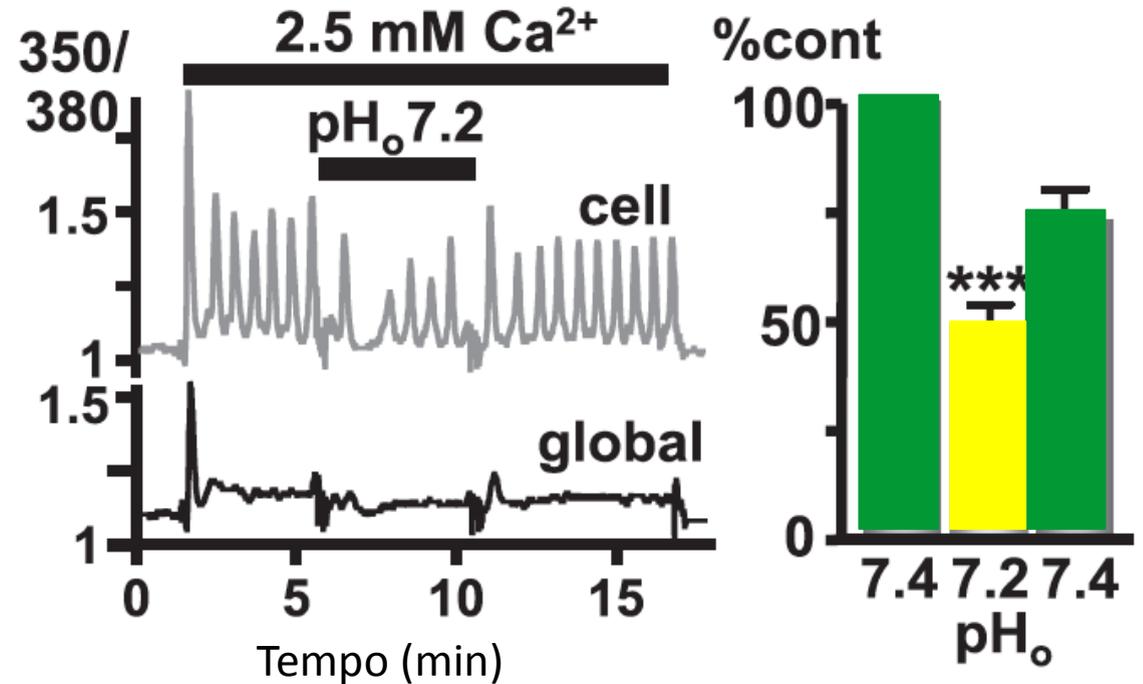
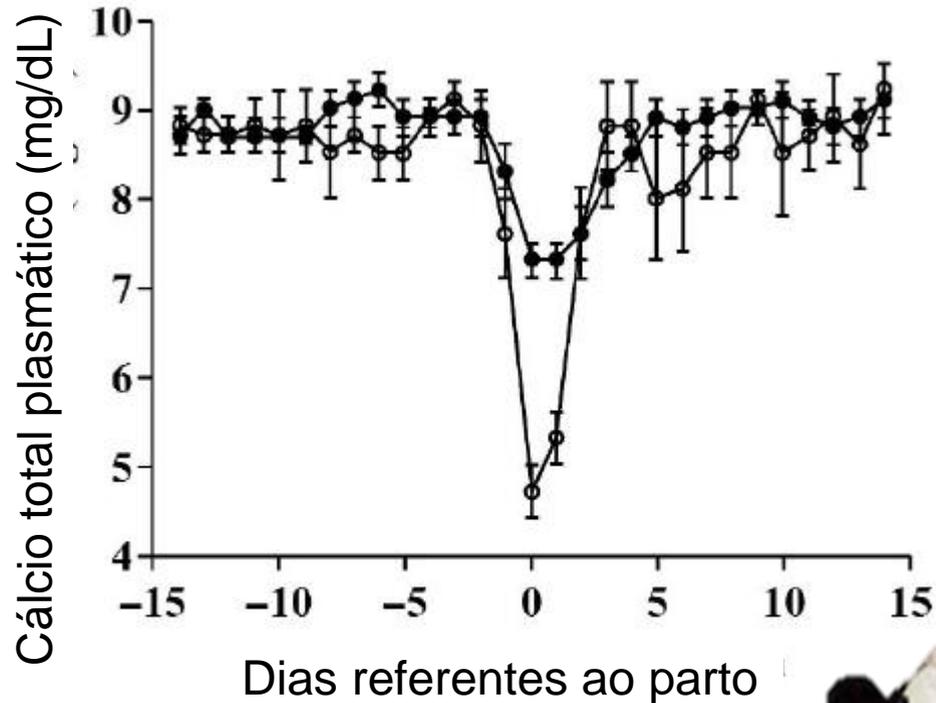


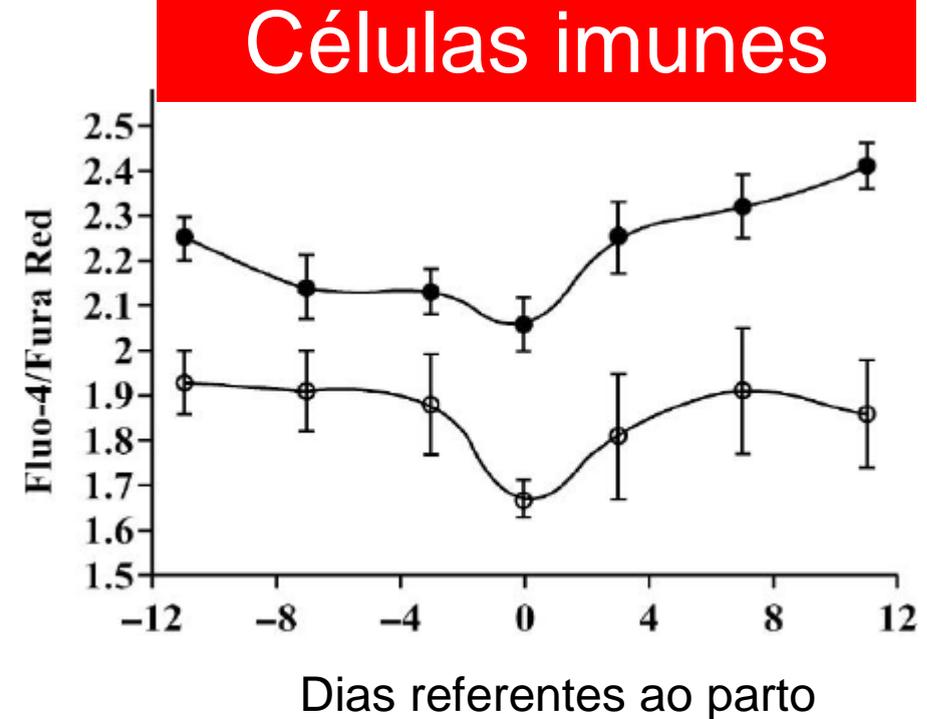
Figura 2: Resposta dos receptores de Cálcio das HEK 293, à variação do pH (7,4 – 7,2).

* P < 0,05; +++ P < 0,001; *** P < 0,001

RESULTADOS E DISCUSSÃO



n= 8 hipocalcemia clínica
n=19 normocalcemicas



2º Ensaio: Quantificação de PTH secretado por células da paratireóide bovina, pelo método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*);



RESULTADOS E DISCUSSÃO

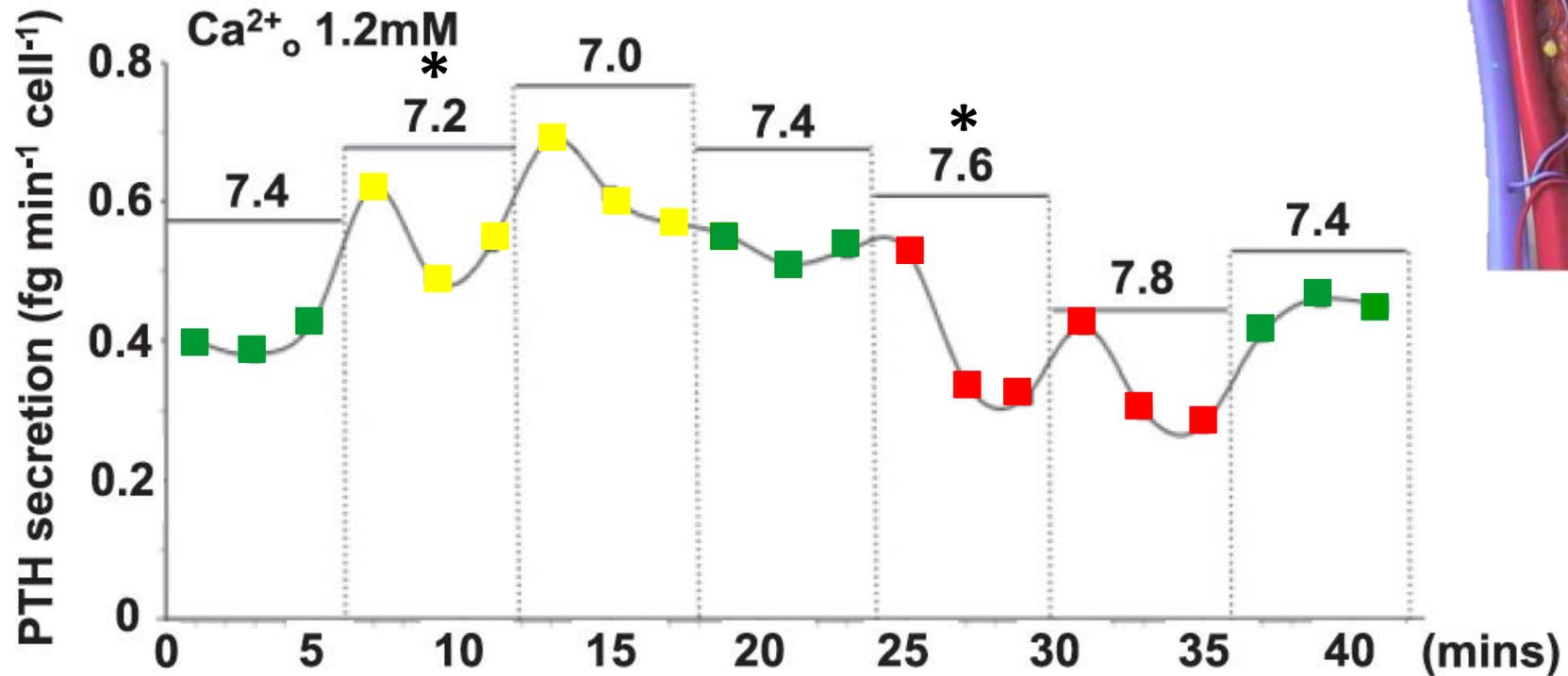
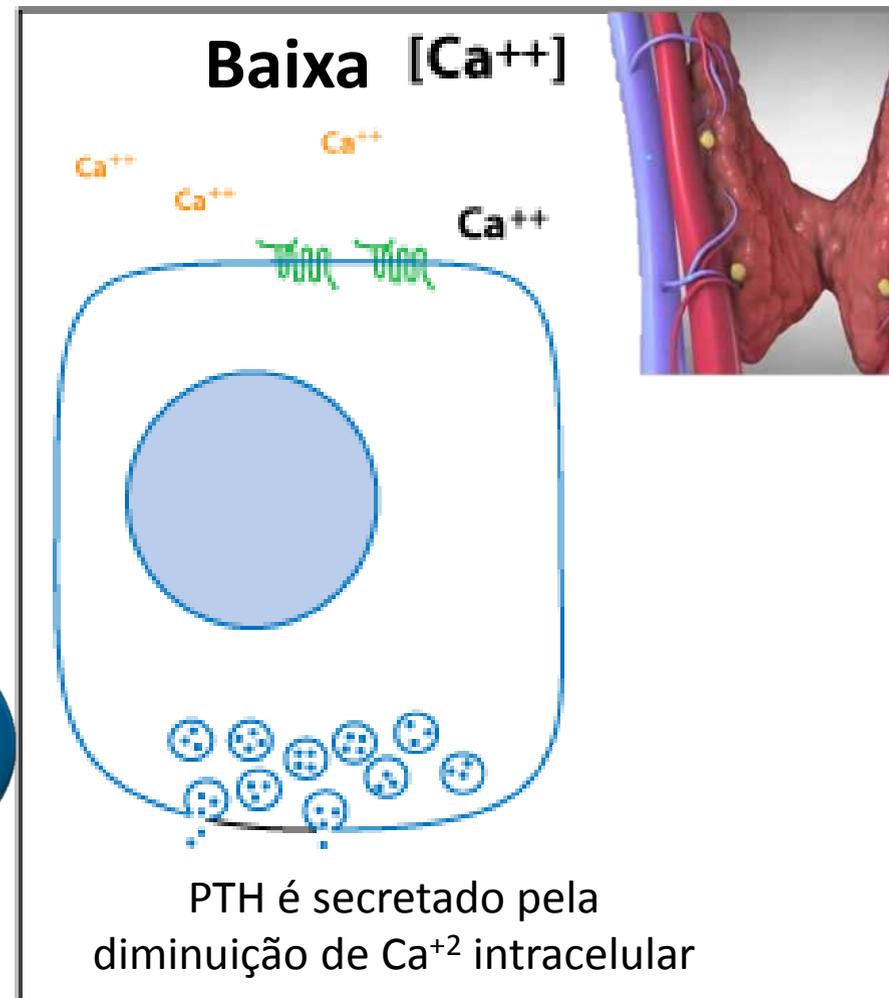
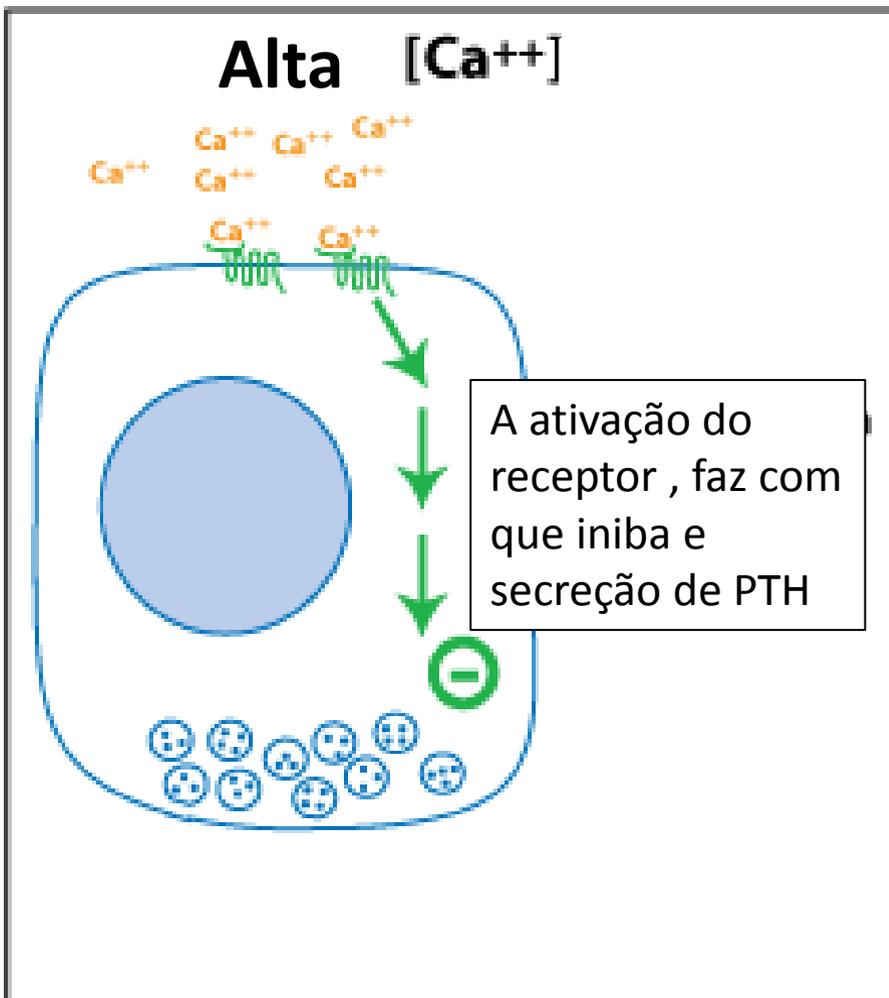
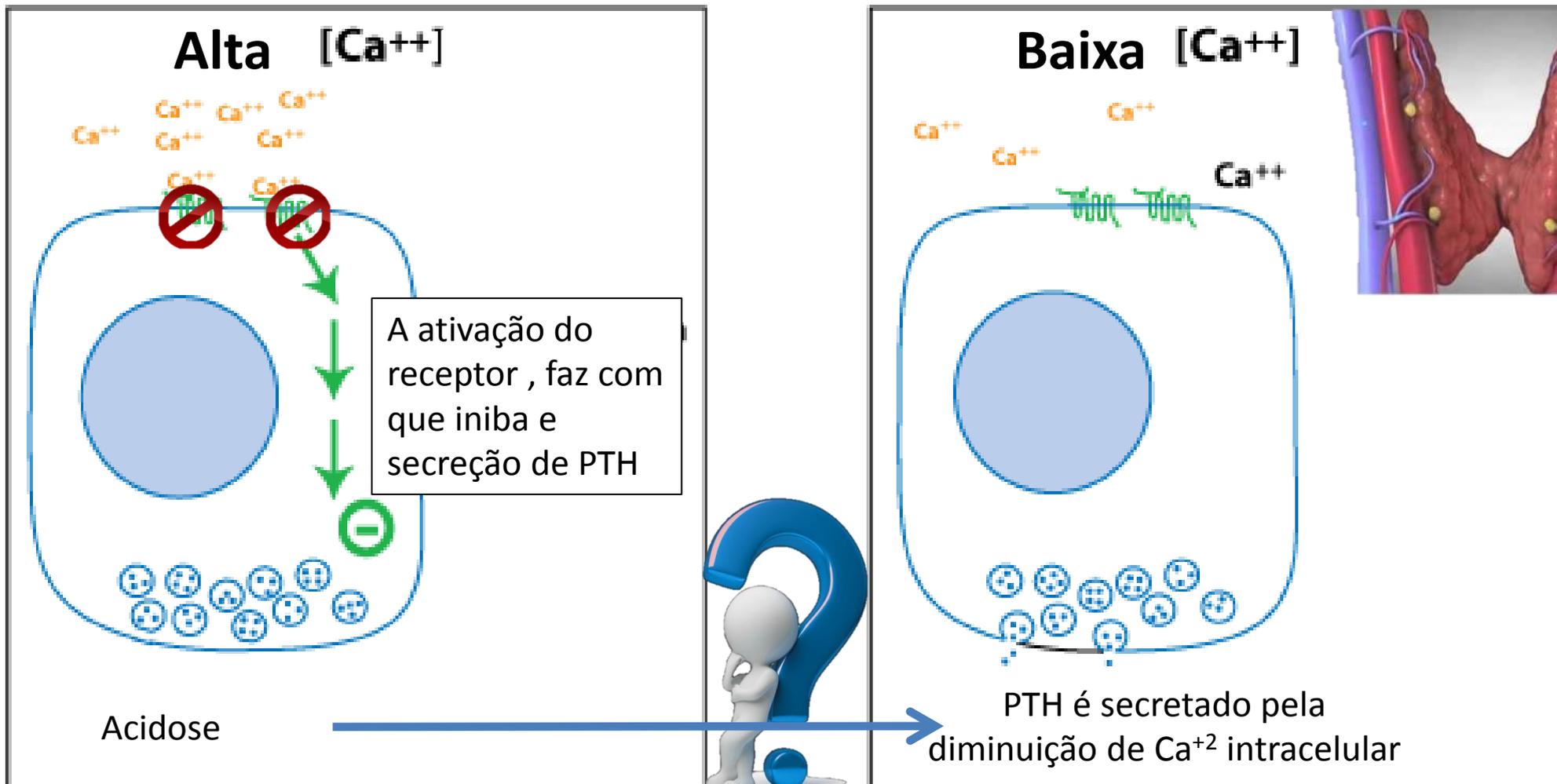


Figura 4: Células de paratireóide humana em solução com 1,2 mM de Ca, contendo soluções tampões para pH de 7,0 a 7,8, substituídas a cada 5 minutos, com o PTH quantificado em fentograma por minuto por célula.

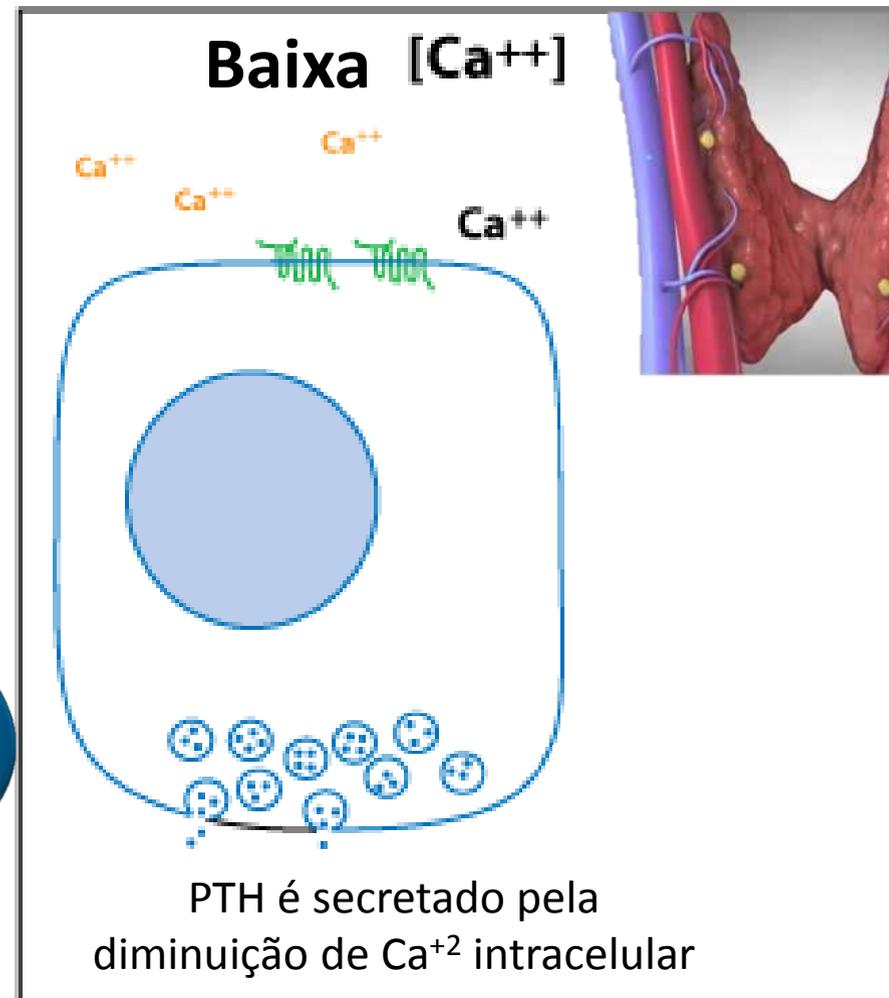
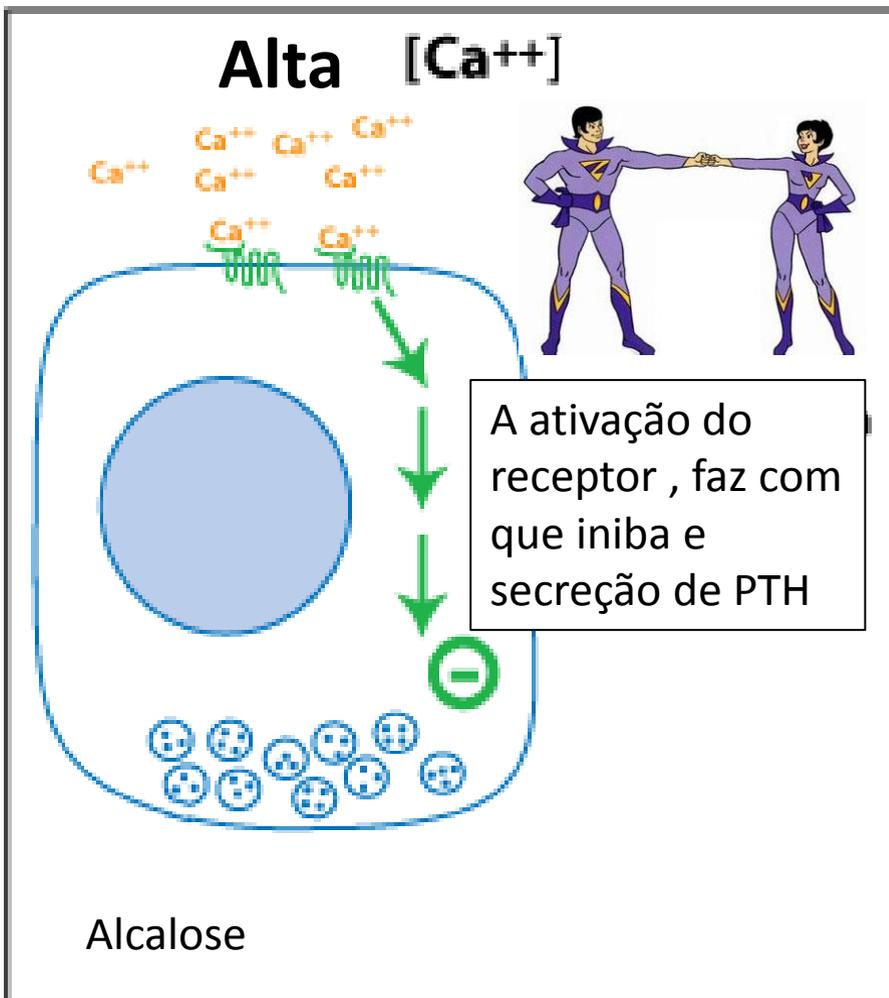
PTH x Ca^{+2} x pH



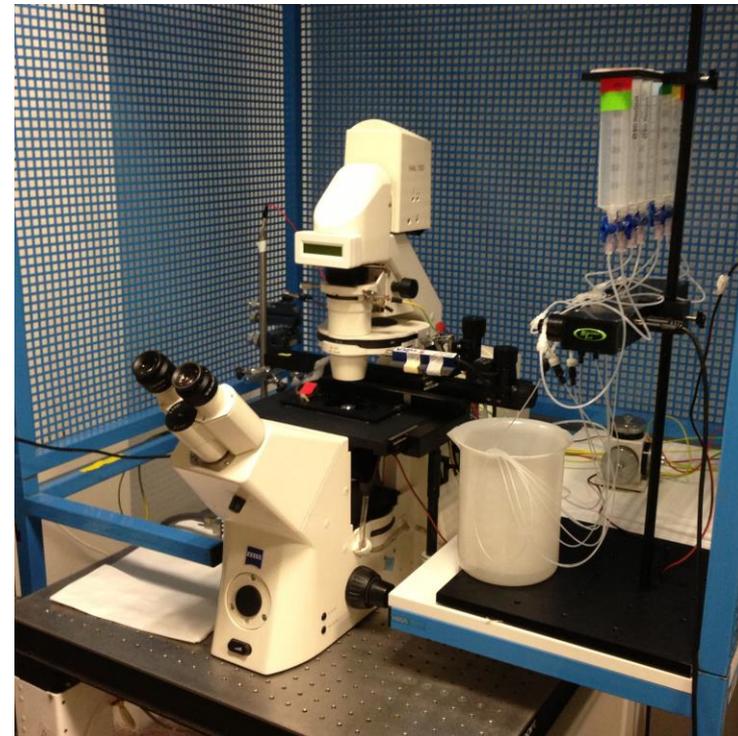
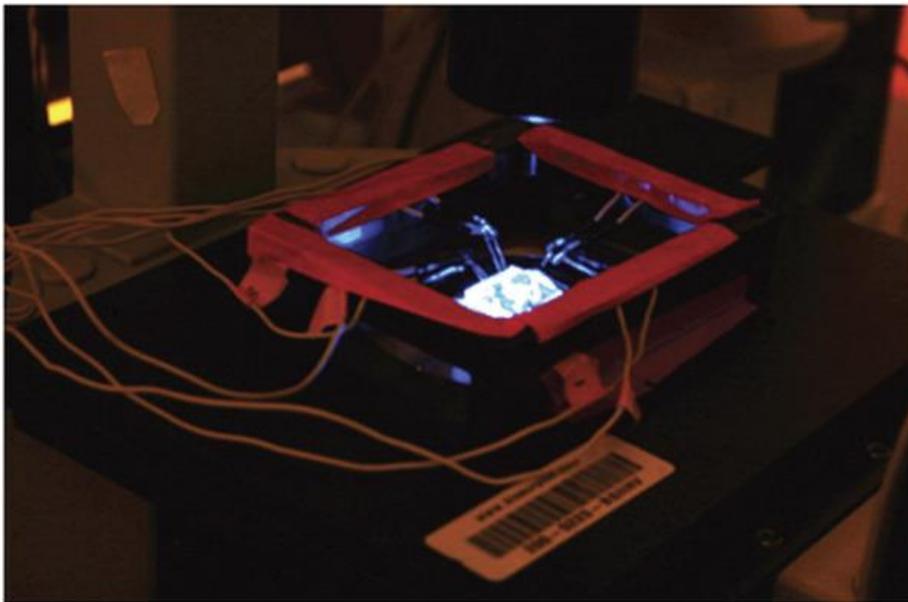
PTH x Ca^{+2} x pH



PTH x Ca^{+2} x pH



3º Ensaio: Verificação da atuação dos CaR, por **medição da atividade de fosforilação da enzima ERK** (*extracellular-signal-regulated kinases*), por *immunoblotting*, e a **atividade de polimerização de actina**, sob diferentes concentrações de Ca^{+2} , por intermédio da fluorometria.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

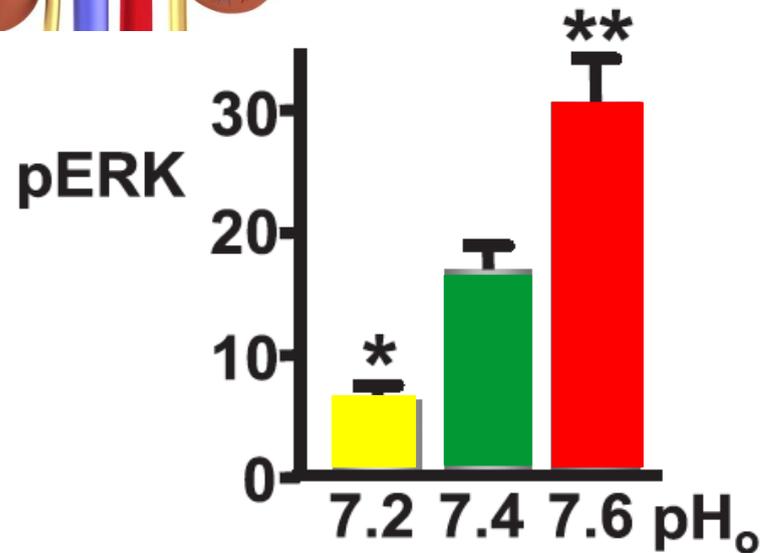
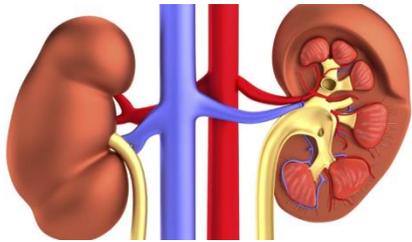


Figura 05: Fosforilação da ERK, detectada por *immunoblotting*, após tratamento com 3,5 mM de Ca^{+2} , por 10 minutos, sob diferentes concentrações de pH ($7,4 \pm 0,2$).

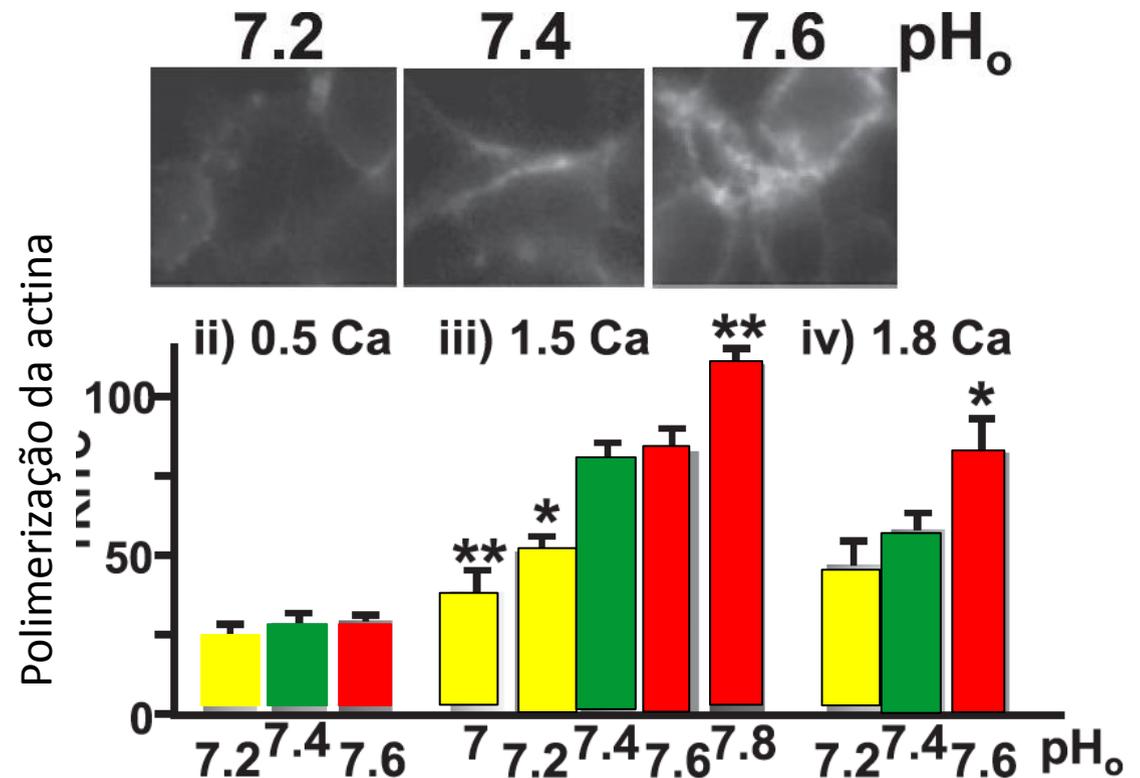


Figura 06: Medição da atividade de polimerização de actina, em diferentes pH, com concentração de Cálcio extracelular de 1,5 mM.

4º Ensaio: Mobilização de Ca^{2+}_i em meio rico em albumina (5% p/v), em diferentes pH_o .

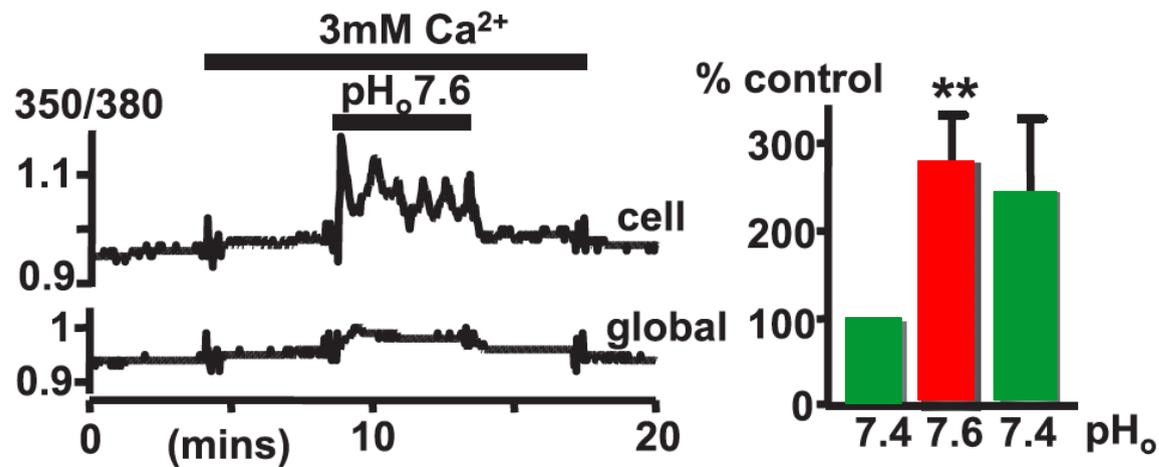


Figura 07: Resposta aumentada dos receptores de Cálcio, com 3 mM de Ca extracelular (+ 5% de albumina p/v), quando pH alcança 7,6.

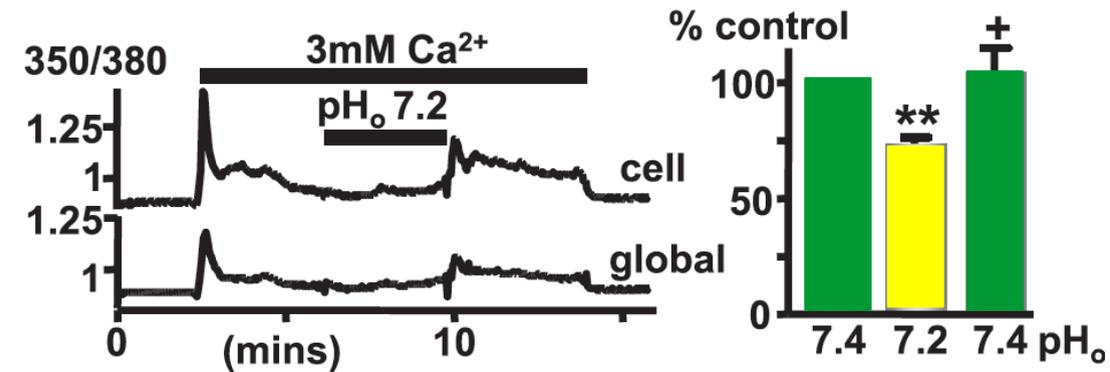
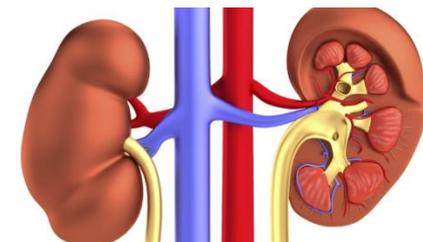


Figura 08: Resposta diminuída dos receptores de Cálcio, com 3 mM de Ca extracelular (+ 5% de albumina p/v), quando pH alcança 7,2.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

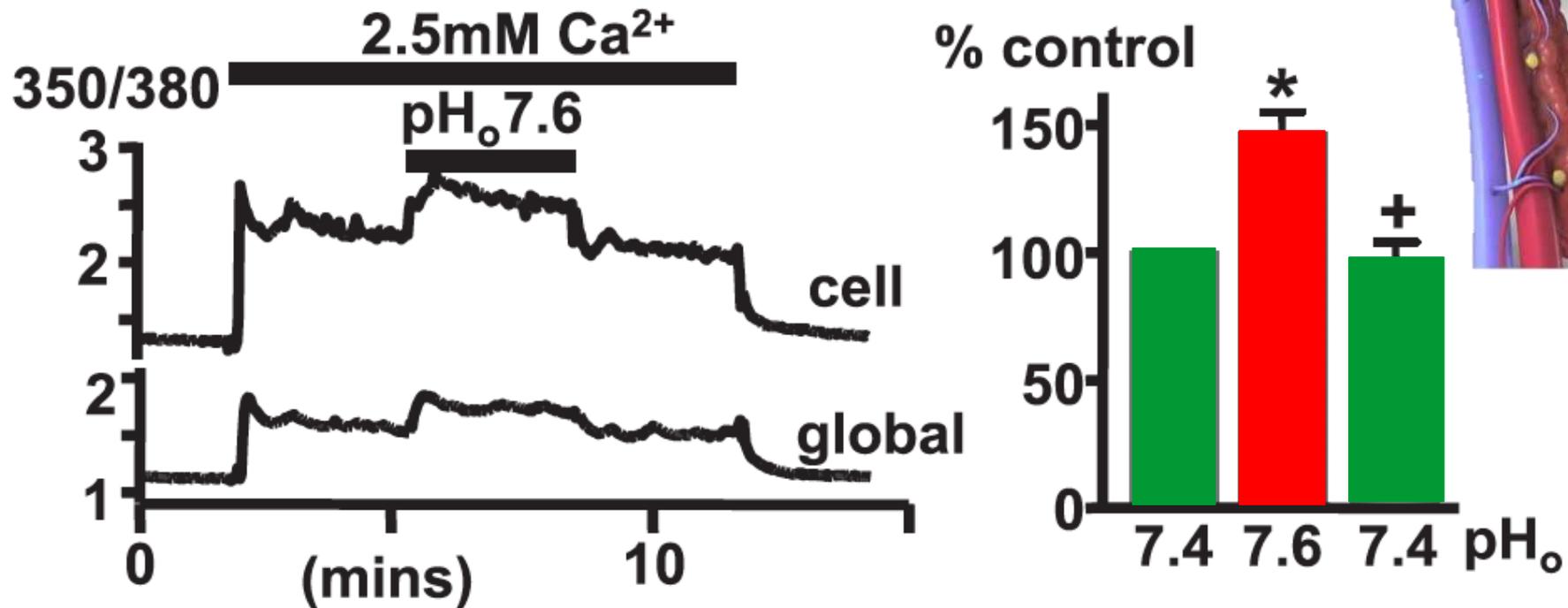
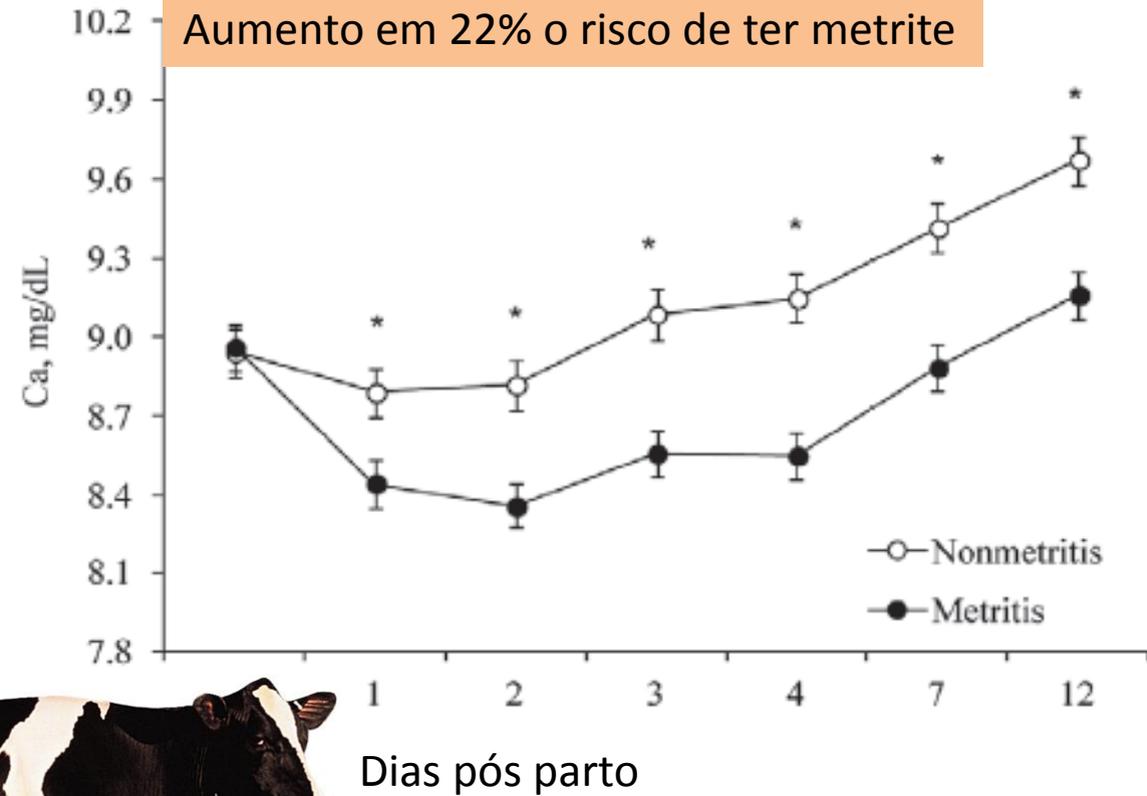
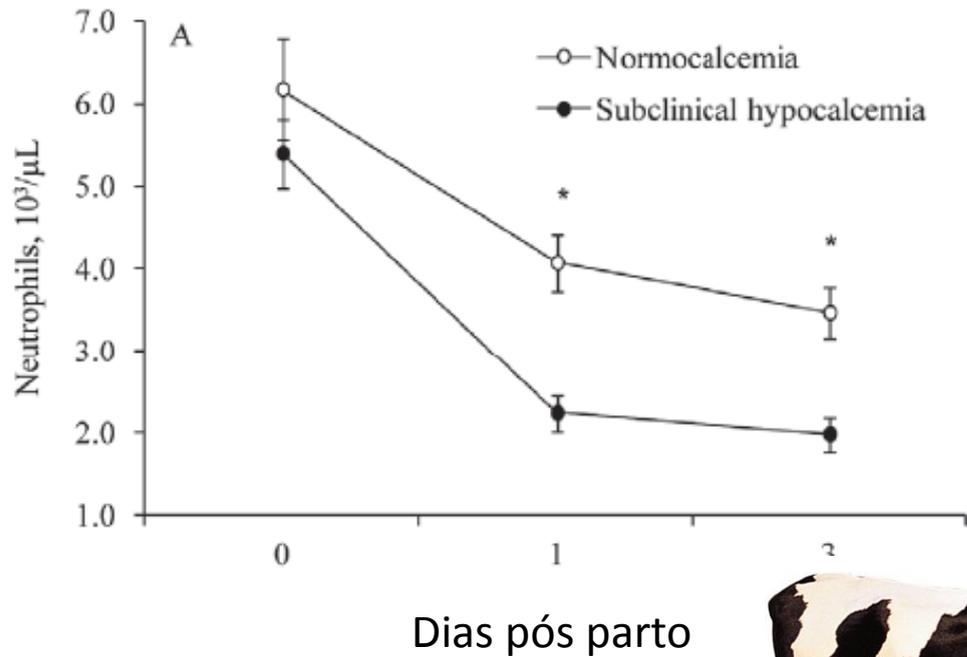
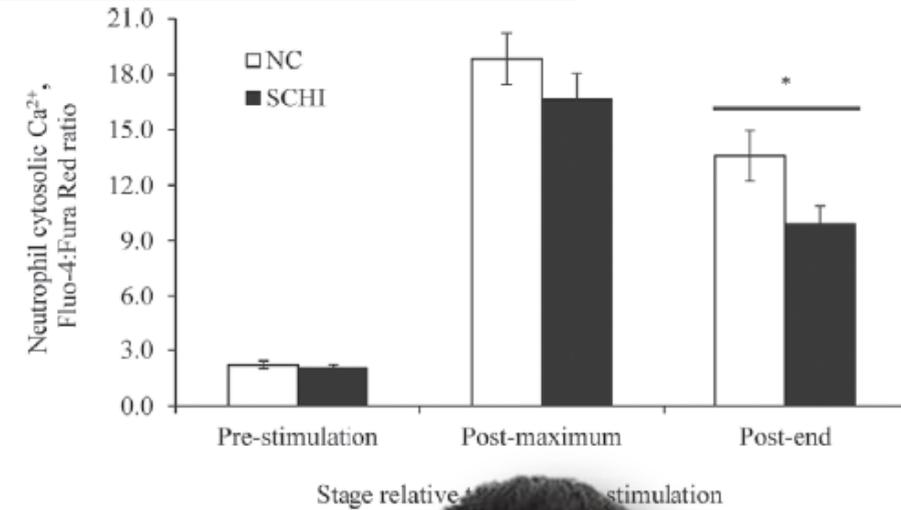
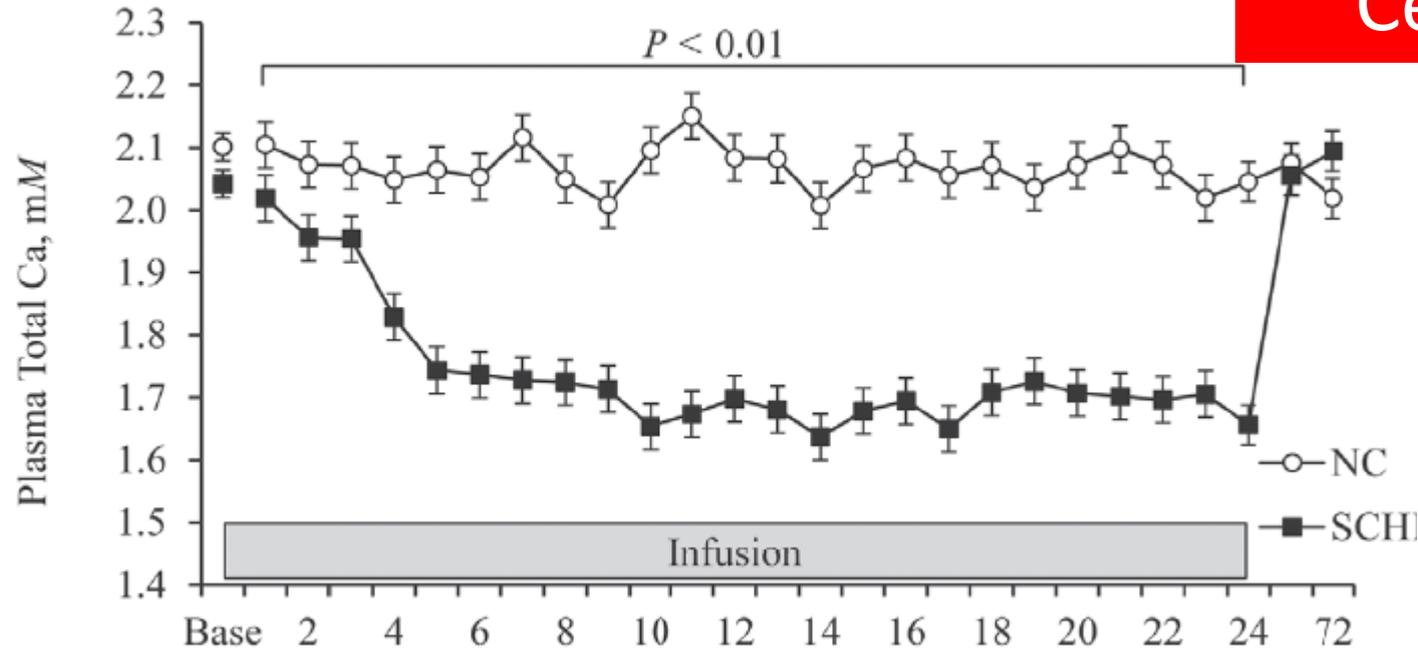


Figura 09: Experimento idêntico, com o uso de células da paratireóide bovina. Resposta aumentada dos receptores de Cálcio, com 2,5 mM de Ca extracelular (+ 5% de albumina p/v), quando pH alcança 7,6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Células imunes



Alterações fisiopatológicas do pH_o são capazes de modular os CaR, tanto nas células HEK-293 quanto nas da paratireóide. Os resultados *in vitro* demonstram que, distúrbios ácido-básicos afetam os CaR podendo alterar a função da paratireóide e o metabolismo do cálcio *in vivo*.

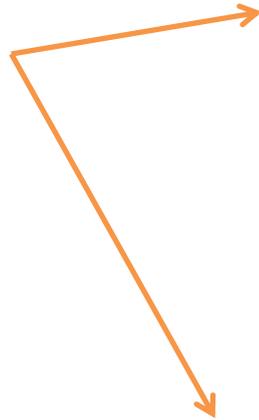
A administração do produto no pré-parto, estimula maior secreção do PTH tornando a reabsorção de cálcio mais efetiva no pós-parto

O produto não interfere no pH sanguíneo, promovendo uma ativação da homeostase do cálcio mais rápida

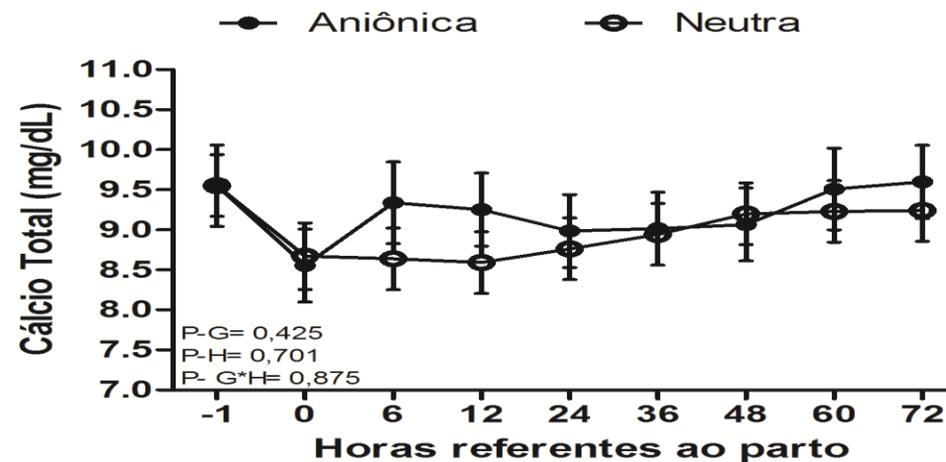
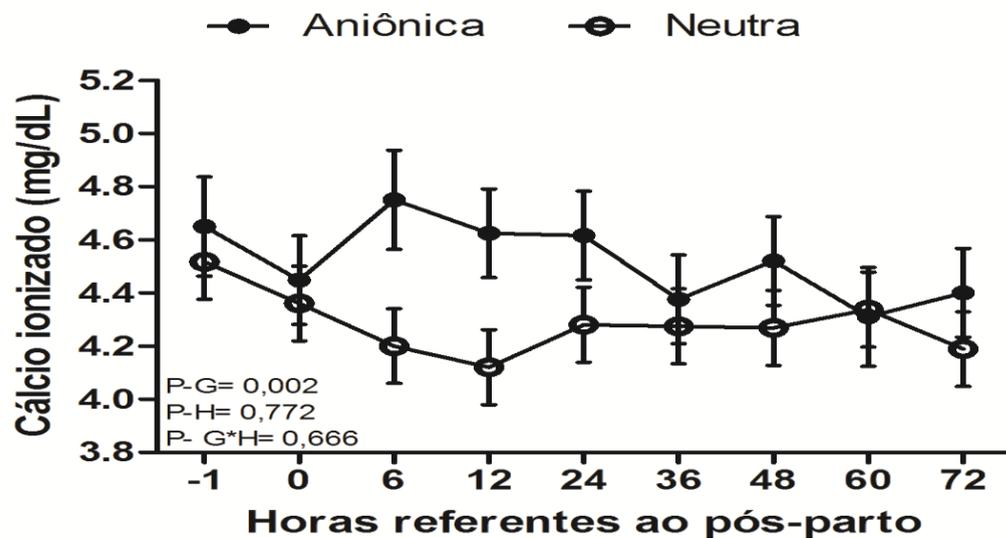
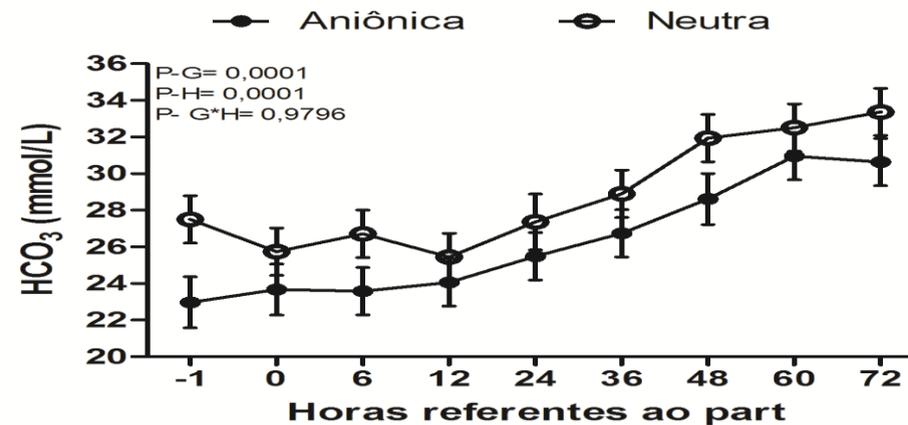
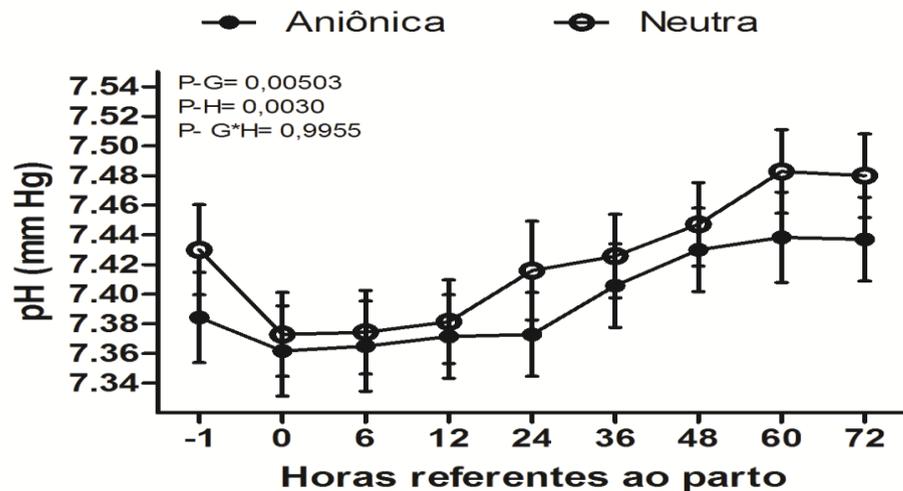
Infusão única/ coletas de sangue



18 vacas da raça holandês primíparas



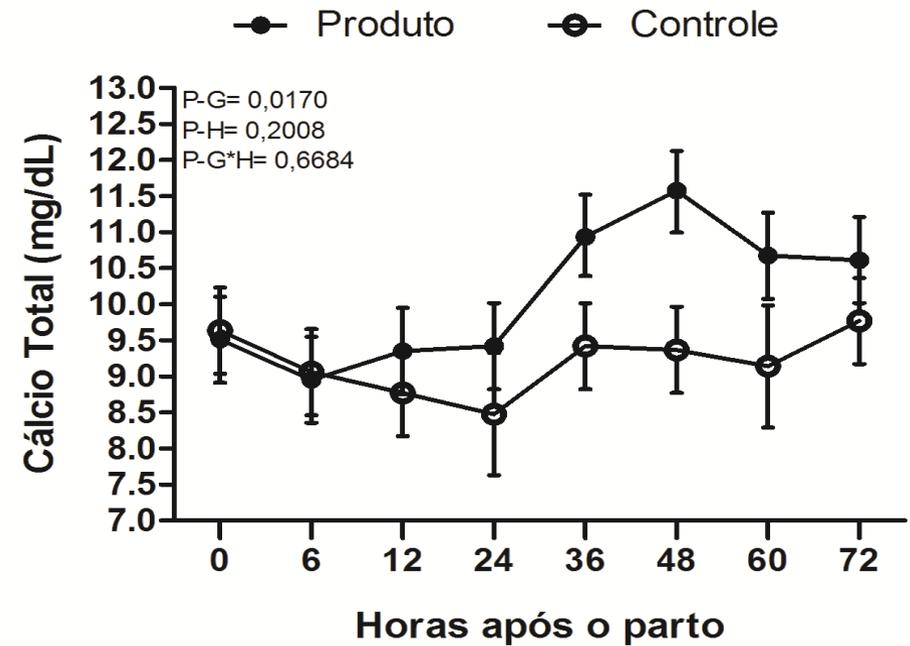
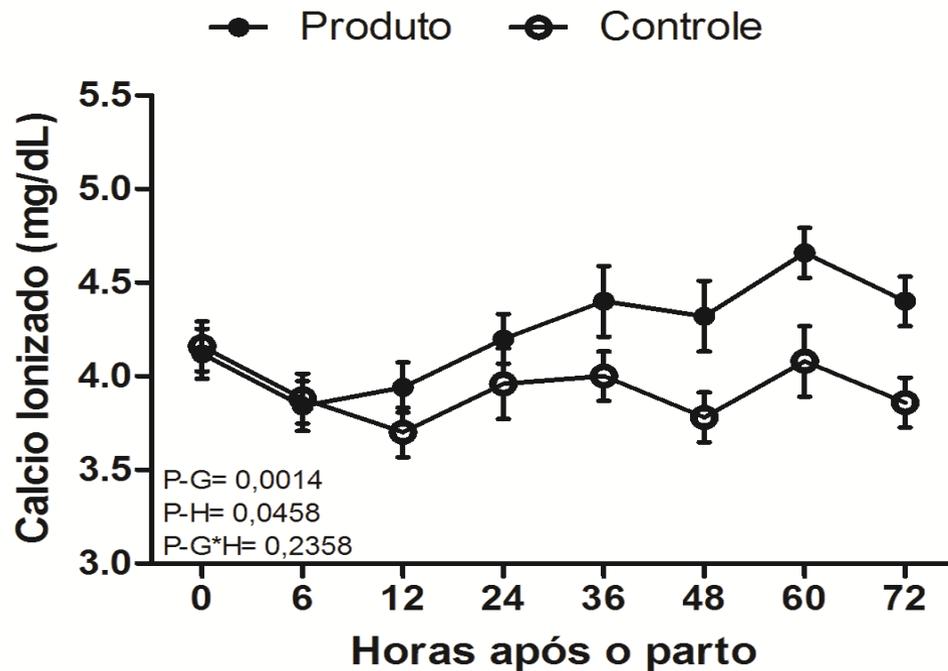
pH em diferentes DCAD



RESULTADOS E DISCUSSÃO



pH não foi alterado



4 animais= 2C e 2 T

A pair of hands, one from the left and one from the right, are shown holding a small, realistic globe of the Earth. The globe is centered on the Americas, showing North and South America in green and yellow, surrounded by blue oceans and white clouds. The hands are rendered in a golden-brown, textured material, possibly clay or wood, and are positioned as if gently cradling the globe. The background is a solid black color.

Obrigada!

carlospires@gmail.com / josianeofeijo@gmail.com