

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

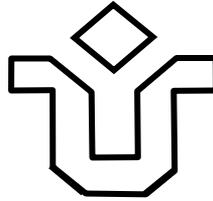
**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE
COLECALCIFEROL EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS STROKE-PRONE**

ROSANE DE SOUZA SANTOS

Profa. Dra. Lucia Marques Alves Vianna
ORIENTADORA

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

Dissertação apresentada ao término do Curso de Pós-Graduação *Stricto-sensu* em Neurologia, Área de Concentração Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2007

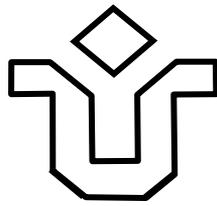
616.8 Santos, Rosane de Souza,
S337e Efeitos da suplementação crônica de colecalciferol em ratos
espontaneamente hipertensos stroke-prone. Rio de Janeiro, 2007.

xiv, 55f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Marques Alves Vianna.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Mestrado em Neurologia, 2007.

1. Colecalciferol. 2. Ratos SHRSP. 3. Neuroproteção. I. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. II. Vianna, Lucia Marques Alves.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE
COLECALCIFEROL EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS STROKE-PRONE**

Por

ROSANE DE SOUZA SANTOS

Dissertação de Mestrado

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Lucia Marques Alves Vianna

Professora Dra. Magna Cottini Fonseca Passos

Professora Dra. Marzia Puccioni Sohler

Conceito:.....

Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2007

Aos meus pais, Maria e Agnaldo, que sempre me incentivaram em todos os meus projetos. Que me ensinaram o principio da humildade, solidariedade e honestidade.

AGRADECIMENTOS

- *A Deus - autor da fé, do princípio ao fim de todos os meus momentos. Aquele que me guia que não me afastou dos meus sonhos, mesmo quando pareciam impossíveis de serem realizados e a São Francisco de Assis, meu protetor.*
- *Aos ensinamentos da vida, que nos últimos meses me fizeram deparar com competitividade, derrotas pessoais, mas que me mostrou a confiança e a força interior existentes em mim, que me fizeram superar as minhas deficiências e retomar a alegria de reconstruir meus sonhos e objetivos. Esses dois anos de curso anos me amadureceram pessoalmente e profissionalmente, seja pelos desafios do curso de mestrado realizado com minha juventude e bem como pelas dificuldades pessoais e emocionais.*
- *Aos meus pais, Maria e Agnaldo, por estarem sempre a meu lado, me motivando e cujo amor e esforço pessoal tornaram possível à conclusão deste curso. Família, só nós sabemos quantas batalhas foram traçadas para a concretização desse sonho! Amo vocês!*
- *Agradeço, em especial, a dedicação integral de minha adorável mãe, que me apóia em todos os momentos de minha vida.*
- *A todos profissionais da área médica que cuidaram de mim durante esse período.*
- *Aos meus entes queridos pelo carinho e compreensão.*
- *Aos meus verdadeiros amigos, companheiros de todas as horas, pelas boas risadas e por me aturarem nos meus dias de mau-humor. A presença de um amigo especial que neste último mês de curso me trouxe grandes alegrias.*

- *A minha orientadora, Dra. Lucia Marques Vianna, pela confiança depositada em meu trabalho, pela presença segura, competente e estimulante, que despertou em mim o gosto pela pesquisa científica, que tornou agradável e recompensador todos os projetos desenvolvidos no Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas (LINDCD)! Agradeço por sua amizade, carinho e figura materna, um exemplo de mestre e de mulher!!*
- *Aos meus colegas e amigos do LINDCD, pelo companheirismo e reflexões críticas. Especialmente a minha amiga Luana por me auxiliar nas tarefas laboratoriais e ser minha grande companhia nesses últimos meses.*
- *A todos os mestres, por compartilharem ao longo do curso seus conhecimentos.*
- *À dedicação estimada da Professora Regina Papais Alvarenga por tornar o Mestrado na Escola de Medicina uma área multidisciplinar.*
- *À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro que se tornou o meu segundo lar e pela qual tenho orgulho de ter sido graduada na mais antiga escola de Nutrição da América Latina e o privilégio de fazer parte dessa grande família há sete anos.*
- *A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado.*
- *À Professora Maria Tereza Barboza pelo suporte estatístico.*
- *A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.*

“A ave sai do ovo, o ovo é o mundo. Quem quiser nascer tem que destruir um mundo”.

(Hermann Hesse)

RESUMO

Estudos prévios têm mostrado que a vitamina D é capaz de regular pressão arterial que constitui o maior fator de risco para o acidente vascular encefálico. Entretanto, esse efeito ainda não foi investigado no modelo animal suscetível ao acidente vascular encefálico espontâneo (SHRSP), o que nos levou a estudar o efeito da administração crônica de vitamina D3 (colecalfiferol) sobre os parâmetros biológicos gerais e neurológicos de ratos SHRSP, bem como seu efeito sobre a pressão arterial. Machos SHRSP (n=30) de 8 semanas de idade e peso médio de 142 ± 20 g após período basal de 7 dias, foram divididos em 3 grupos para a investigação da Curva dose-efeito (n=12), Longevidade (n=12) e Determinação de aldosterona plasmática (n=12). Demonstramos que a dose ideal sem suscitar efeitos adversos seria $12,5 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ de colecalfiferol. Os animais do grupo Longevidade foram suplementados com a dose ideal até o óbito, contudo não observamos diferença na sobrevivência entre os grupos. Houve redução da aldosterona concomitante à redução de pressão arterial sistólica com o tratamento de colecalfiferol a $12,5 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ por 28 dias. Verificamos processo adaptativo dos ratos suplementados a alguns testes neurológicos, ao mesmo tempo, a severidade das lesões no grupo controle foram de maior gravidade. Esses achados confirmam que a vitamina D3 possui efeito hipotensor pela modulação da aldosterona plasmática e que o tratamento contribuiu para menor severidade dos ataques isquêmicos transitórios.

ABSTRACT

Previous studies have showed that vitamin D is able to regulate the blood pressure that is the major risk factor for stroke. However, there was no investigation of this effect in animal model of spontaneous stroke (SHRSP) yet. Therefore the action of vitamin D3 (cholecalciferol) chronic supplementation on biologic and neurological profiles of SHRSP rats, and its effects on blood pressure were investigated. SHRSP males (n=30) of 8 weeks old and weighting 142 ± 20 g after baseline period of 7 days, were subdivided in 3 groups in order to investigate: curve-dose response (n=12), longevity (n=12) and plasmatic aldosterone (n=12). We have demonstrated that ideal dose was $12.5 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$, without provoking toxic effects. The animals of longevity group were supplemented with the ideal dose up to death; however there was no difference on survival between groups. There were a significant reduction of plasma aldosterone and blood pressure with $12.5 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ cholecalciferol treatment by 28 days. We verified an adaptive process of treated rats in some neurological tests, at the same time, the lesion severities at control group were worse. These findings confirm that vitamin D3 has a hipotensor effect, throughout plasmatic aldosterone modulation and the treatment contributed to severity minor of transitory ischemic attacks.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AVE: acidente vascular encefálico
- AIT: acidente transitório isquêmico
- GDNF: *glia neurotrophic derived factors* (fatores neurotróficos derivados da glia)
- LINDCD: Laboratório de Investigação em Doenças Crônico-Degenerativas
- SHRSP: *spontaneously hypertension rat stroke-prone* (rato espontaneamente hipertenso suscetível ao acidente vascular encefálico)
- SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona
- VDR: *vitamin D receptor* (receptor de vitamina D)
- 1,25(OH)₂ vitamina D₃: 1,25 didroxivitamina D₃
- 25 (OH)Vitamina D₃: hidroxicolecalciefrol
- 1 α -OHase: 1 alfa hidroxilase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	página
Ilustração 1 – Oclusão Trombótica.....	6
Ilustração 2 – Metabolismo da Vitamina D.....	10
Figura 1 – Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1.....	25
Figura 2 – Representa a média \pm DP da concentração plasmática de aldosterona em ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12.5 μ g/kg-1 de colecalciferol.....	26
Figura 3 – Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12.5 μ g/kg-1 de colecalciferol.....	27
Figura 4 – Representa a curva de sobrevivência em dias de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol.....	28
Figura 5 – Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol (Vitamina D3) até o óbito.....	30

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1 – Representa a média \pm DP do perfil de parâmetros biológicos de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 (Dose 1); 25 μ g/kg-1 (Dose 2); 50 μ g/kg-1 (Dose 3) de colecalciferol.....	26
Tabela 2 – Representa a média \pm DP do perfil de parâmetros biológicos de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol até o óbito.....	29
Tabela 3 – Representa a média \pm DP dos testes neurológicos: Memória; Barra de equilíbrio; Viga de Equilíbrio e Termo-sensório em minutos, segundos e centésimos de segundos de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol até o óbito.....	31
Tabela 4 – Representa a média \pm DP dos testes neurológicos: Plano Inclinado (PI); Reflexo Postural (RP); Reflexo de Pata Traseira (RPT); Reflexo de Pata Dianteira; Teste de Colocação de Patas (TCP); Reflexo Plantar (RPt) em scores de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol até o óbito.....	33

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
2.1. Objetivo Principal	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Hipertensão arterial e AVE	5
3.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldostona	7
3.3. Vitamina D	9
3.4. Vitamina D e o Sistema Nervoso	11
3.5. A Vitamina D e AVE	13
3.6. O Modelo SHRSP	14
4. METODOLOGIA	16
4.1. Animais e Dieta	16
4.2. Grupos Experimentais	17
<u>4.2.1.. Grupo I - para determinação da dose ideal</u>	17
<u>4.2.2. Grupo II – para determinação de aldosterona plasmática</u>	17
<u>4.2.3. Grupo III - para determinação da longevidade</u>	18
4.3. Métodos	18
<u>4.3.1 Parâmetros biológicos gerais</u>	18
<u>4.3.2. Ectoscopia</u>	18
<u>4.3.3.Pressão Arterial</u>	19
<u>4.3.4. Testes neurológicos</u>	19
4.4. Tratamento estatístico	23
5. RESULTADOS	24

5.1. Grupo I - Curva dose-efeito sobre a pressão arterial e parâmetros biológicos gerais.....	24
5.2. Grupo II - Determinação da Aldosterona Plasmática.....	26
5.3. Grupo III - Longevidade, parâmetros biológicos gerais e testes neurológicos.....	27
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) é atualmente considerado a causa mais freqüente de morte em indivíduos acima de 69 anos no Brasil. (DE PÁDUA & FÁTIMA, 2003). Epidemiologicamente, este afeta mais pessoas do que qualquer outra doença neurológica, com aproximadamente 500 mil novos casos por ano (MARK & DAVIS, 2000).

O risco de recorrência de AVE situa-se entre 15% e 30% em cinco anos e um novo episódio de doença cerebrovascular geralmente tem maior gravidade para o paciente, o que acarreta em significativo ônus para o sistema de saúde, uma vez que as complicações após o AVE (incapacidade motora e cognitiva) representam importantes implicações sócio-econômicas (PIE DADE *ET AL*, 2003). A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) define como acidente vascular encefálico, o rápido desenvolvimento de sinais/sintomas focais e às vezes globais de perda de função cerebral, com sintomas durando mais de 24 horas ou liderando morte sem causa aparente, a não ser aquela de origem vascular, mas essa definição exclui o ataque isquêmico transitório (AIT), que é definido como sintomas neurológicos focais que duram menos de 24 horas. O AIT é também um significativo indicador para o AVE, uma vez que aproximadamente 10% a 20% dos pacientes diagnosticados com AIT tem um episódio de AVE dentro de 90 dias (GILES *ET AL*,

2006; ROTHWELL *ET AL*, 2006) ou, então, aproximadamente 15% dos pacientes que apresentam AVE já tiveram ATI. (LYNCH & NELSON, 2001)

O AVE é uma doença multifatorial onde muitos determinantes têm sido descritos. Esses determinantes ou fatores de risco podem ser divididos em fatores modificáveis e não modificáveis idade e sexo são exemplos de dois fatores bem conhecidos para o AVE, porém não modificáveis, em contraste, a redução da exposição por fatores modificáveis, tais como, fumo, atividade física, dieta, podem liderar menor ocorrência de AVE na população (WHO, 2002). Informações sobre o AVE em países em desenvolvimento são difíceis de obterem e isso pode ser a razão para poucos registros na América do Sul. No estudo de Rojas *et al* (2006) em Buenos Aires a hipertensão arterial foi o mais freqüente fator de risco registrado e o padrão de subtipos de AVE parece ser diferente dos reportados em outras regiões do mundo, com uma freqüência mais alta de doença de pequenos vasos.

O risco aumentado para o desenvolvimento do AVE segundo Brown (2004) está relacionado com a síndrome metabólica, compreendendo obesidade abdominal, níveis de triglicérides aumentados, baixo nível de HDL, metabolismo alterado da glicose e hipertensão arterial. A hipertensão arterial é considerada o fator central para o AVE e observa-se que dentre os mecanismos regulatórios da pressão sanguínea, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) merece destaque quanto aos seus efeitos deletérios sobre a hipertensão arterial e sua estimulação inapropriada tem sido associada também ao AVE. (MARK & Davis, 2000)

Adicionalmente, outros fatores têm sido associados ao AVE, que incluem liberação excitatória de aminoácidos, despolarização induzida pelo influxo de

cálcio, óxido nítrico intracelular, radicais livres e indução de morte celular programada. (WANG *ET AL*, 2000).

Dessa forma, uma série de manobras que visam a modulação dos fatores determinantes do AVE têm sido propostas, incluindo aquelas que utilizam vitaminas.

No que se refere à vitamina D, a literatura vem sugerindo que essa vitamina por ser um regulador negativo da expressão da renina *in vivo*, pode interferir no AVE (IADECOLA, 2004). Além disso, somam-se os fatos da existência de receptores de vitamina D (VDR) no cérebro, reforçando a suposição de que essa vitamina possa ter ação neuroprotetora (BREWER *ET AL*, 2001). Entretanto a literatura ainda carece de mais dados referentes à possível atuação dessa vitamina na doença cerebrovascular, especialmente quanto ao seu papel em modelos animais para o AVE espontâneo, fato este que motivou o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

Investigar o efeito da administração crônica de colecalciferol sobre parâmetros biológicos gerais e neurológicos do modelo animal de AVE espontâneo - o rato espontaneamente hipertenso suscetível ao AVE (SHRSP).

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer uma curva de dose-efeito para o colecalciferol em ratos SHRSP;
- Investigar o efeito dessa suplementação sobre a pressão arterial;
- Investigar se a suplementação de vitamina D é capaz de modular os níveis de aldosterona dos animais;
- Investigar o efeito dessa suplementação sobre a longevidade desses animais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Hipertensão arterial e AVE

A hipertensão é o maior fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular. Na maioria dos casos, a causa primária da hipertensão permanece desconhecida devido à sua natureza complexa, sendo caracterizada como uma doença poligênica, heterogênicamente multifatorial e por isso classificada como hipertensão essencial. (KATO, 2002; WU *ET AL*, 2003; GILES, 2006)

Uma elevada pressão é provavelmente o mais importante problema de saúde pública e sua prevalência depende tanto da composição racial da população estudada como dos critérios usados para definir tal condição (RUDIJANTO, 2006).

Reconhece-se que pacientes com hipertensão morrem prematuramente e as mais comuns causas de morte são doença do coração, AVE e falência renal (RUDIJANTO, 2006; GILES, 2006).

Quanto ao seu papel sobre a isquemia cerebral, considera-se que a hipertensão represente um risco relativo cinco vezes maior para o aparecimento do AVE (SERNA *ET AL*, 2006).

Estima-se que 77% de todos os AVEs primários estejam relacionados a hipertensão (LYNCH & NELSON, 2001), e contínuos aumentos na pressão dos

vasos sanguíneos podem resultar em placa aterosclerótica e dano endotelial, conseqüentemente, a ruptura da placa e a formação de trombo podem liderar o AVE (SAUEBECK, 2006).

Nesse sentido, testes clínicos têm estabelecido que a redução da pressão arterial é efetiva na prevenção primária de AVE isquêmico e hemorrágico em pacientes hipertensos e na prevenção secundária em pacientes não hipertensos e hipertensos, mesmo com pequenas reduções na pressão arterial. (SERNA *ET AL*, 2006).

A hipertensão produz um aumento na resistência dos vasos cerebrais e perda do mecanismo fisiológico de autoregulação (FARACI *ET AL*, 1990). Considera-se que a hipertensão exerça ações deletérias no cérebro e sua circulação, pois altera a estrutura dos vasos sanguíneos cerebrais por produzir hipertrofia vascular e remodelação, e também por promover aterosclerose em grandes artérias (DICKINSON, 2001; FARACI *ET AL*, 1990). A literatura também vem assinalando que a inibição da enzima conversora de angiotensina, que faz parte da modulação do SRAA, contribui para a regulação cerebrovascular por inibir ações vasoconstritoras enquanto modula ações vasodilatadoras (MARK & DAVIS, 2000).

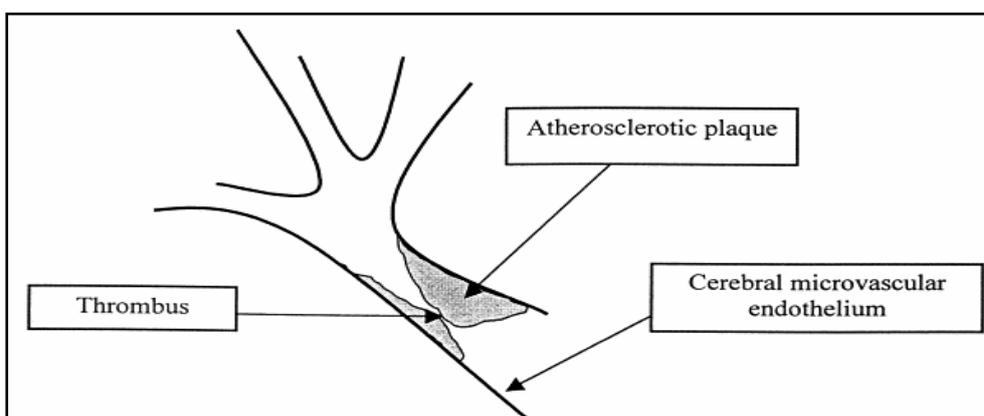


Ilustração 1 – Oclusão trombótica. Fonte: Mark et al, 2000.

3.2. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

O SRAA é uma cascata regulatória que atua como papel essencial na regulação de pressão arterial, homeostase hidroeletrolítica e a estimulação inapropriada do SRAA tem sido associada com hipertensão, ataques do coração e AVE (LI *ET AL*, 2004).

Sabe-se que a secreção da renina é regulada pela pressão de perfusão renal, atividade do nervo simpático renal e pela carga tubular de sódio. Sua secreção é estimulada por fatores tais como, prostaglandinas, óxido nítrico e adrenomedulina e inibida por outros fatores, incluindo angiotensina II, endotélio, vassopressina e adenosina (LI *ET AL*, 2002).

Esse sistema classicamente é definido como sistema endócrino, com os componentes da cascata enzimática produzido em locais bem definidos e tendo como seu peptídeo efetor a angiotensina II, que exerce suas ações em órgãos-alvos distantes do local de produção (DZAU, 1988).

A renina é uma enzima proteolítica integrada com pré-pro-renina, que é clivada em pró-renina, e posteriormente, em renina ativa, a qual é armazenada e liberada imediatamente após o estímulo. Quando é liberada na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio, formando a angiotensina I. Esta por sua vez é clivada pela enzima de conversão da angiotensina II, considerada o hormônio biologicamente ativo, que por sua vez leva a liberação de aldosterona e vasoconstrição.

A aldosterona é classicamente envolvida na regulação de sódio e homeostase hídrica e assim, participa na regulação da pressão arterial. Também

está envolvida na hipertrofia vascular dos músculos liso e pode causar prejuízo da matriz vascular e disfunção endotelial (TAKEDA, 2004)

A aldosterona é sintetizada em tecidos extrarenais, tanto nos vasos sanguíneos como no cérebro. Os receptores de aldosterona estão presentes em cardiomiócitos, células endoteliais e fibroblastos cardíacos. A produção vascular de aldosterona pode ser regulada tanto por uma ação sistêmica como local do SRAA. (TAKEDA *ET AL*, 2000; Takeda, 2005) e as ações local e sistêmica do SRAA são os principais fatores patofisiológicos no desenvolvimento de hipertrofia e desenvolvimento de hipertensão em ratos (TAKEDA, 2005).

Em sua capacidade como um hormônio mineralocorticoide, a aldosterona tem receptor ligante de propriedades endócrinas nas células epiteliais, nas trocas de sódio e potássio em tecidos alvos, tais como rim, cólon e glândulas salivares e sudoríparas (FOSTER *ET AL*, 1997; EPSTEIN, 2001)

No que se refere ao seu papel no AVE espontâneo, Horiuch *et al* (1993) encontrou um aumento na concentração de receptores de aldosterona no rim de uma sublinhagem de SHRSP onde o desenvolvimento da malignidade nefroesclerótica ocorreu sem carga de sal.

Portanto, uma notável redução da mortalidade por AVE tem sido demonstrada com a modulação do SRAA (MARK & DAVIS, 2000).

3.3. Vitamina D

A vitamina D₃ (colecalfiferol) é produzida na pele por uma conversão fotólíca por raios ultravioletas da 7-dehidrocolesterol à provitamina D₃, seguida de isomerização termal até a vitamina D₃.

O primeiro passo na ativação metabólica de vitamina D₃ é a hidroxilação do carbono 25 ocorrida primariamente no fígado. Como os níveis de 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃) aumentam proporcionalmente em virtude do consumo de vitamina D, esta concentração plasmática é comumente usada como indicador do status de vitamina D.

O segundo passo mais importante na bioativação da vitamina D, é a conversão de sua forma mais biologicamente ativa, conhecida como calcitriol. A formação do calcitriol (1,25 dihidroxicolecalciferol) (1,25 (OH)₂D₃) a partir da 25(OH)D₃ ocorre abaixo das condições fisiológicas, principalmente no rim. A enzima renal responsável pela produção de 1,25(OH)₂D₃, a 25(OH)D₃-1- α -hidroxilase está localizada na membrana mitocondrial interna e é uma monooxigenase citocromo P450, que requer oxigênio e ferredoxina reduzida.

Os compostos de vitamina D são transportados por proteínas plasmáticas, sendo a mais importante, a proteína ligante de vitamina D. A proteína ligante de vitamina D é sintetizada no fígado e circula no plasma em concentrações plasmáticas 20 vezes mais altas do que a quantidade total de metabólitos de vitamina D.

Os receptores VDR foram encontrados originalmente em órgãos alvos clássicos do metabolismo da vitamina D envolvidos na homeostase mineral, como intestino, osso, rim e glândulas paratireóides. Mais recentemente, os VDRs têm

sido detectados em muitos outros tecidos e tipos celulares e esses órgãos alvos não clássicos da vitamina D respondem à $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ com uma classe diversa de ações biológicas incluindo imunomodulação, inibição de células de crescimento e indução de diferenciação celular (NORMAN, 1998; BROWN *ET AL*, 1999).

A expressão do DNA de receptores VDR numa variedade de sistemas tem permitido a análise de funções estruturais de proteínas dos receptores VDR, promovendo assim, novas visões dentro dos mecanismos que mediam ações da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BROWN *ET AL*, 1999).

Além do rim, outros tecidos e células expressam a $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ in vitro, entretanto, em humanos essa fonte extrarenal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ somente contribui significativamente para a circulação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durante a gravidez, na doença renal crônica e outras patologias como, sarcoidose, tuberculose, desordens granulomatosas e artrite reumatóide (BROWN *ET AL*, 1999).

As ações genômicas e não genômicas de vitamina D3 combinadas produzem uma multiplicidade de resposta em várias células alvos.

A vitamina D recentemente vem recebendo crescente atenção pelo seu papel na manutenção ótima da saúde. Embora efeitos calcêmicos da vitamina D sejam bem conhecidos por quase um século. Os efeitos não calcêmicos têm sido explorados intensamente somente há três décadas. (GRANT, 2006).

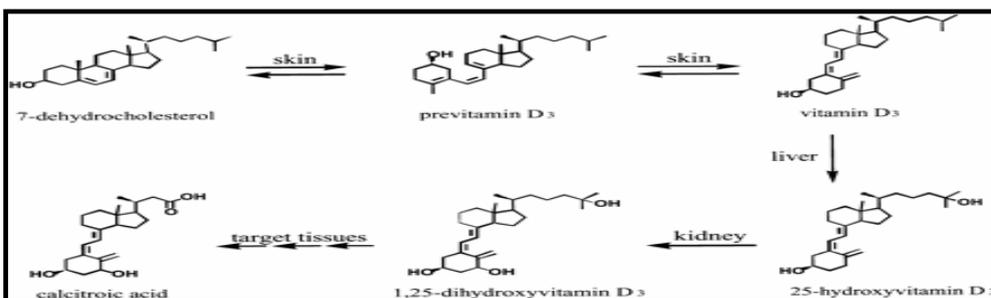


Ilustração 2 - Metabolismo da vitamina D. Fonte: Brown *et al*, 1999.

3.4. A VITAMINA D E O SISTEMA NERVOSO

A vitamina D como um composto neuroativo, é altamente atuante na regulação da diferenciação celular, proliferação e peroxidação numa variedade de estruturas, incluindo o cérebro (KILARY *ET AL*, 2006).

A 1,25(OH)₂D₃ pode atuar com um papel no desenvolvimento de tecido neuronal como sugerido pela presença de VDR no gânglio dorsal de ratos (VEENSTRA *ET AL*, 1997, 1998).

In vivo a administração da 1,25(OH)₂D₃ em ratos e camundongos previne ou detém a progressão da encefalomielite o que sugere que o sistema nervoso é um alvo para as ações imunossupressoras do esteroide (SPACH *ET AL*, 2004). A 1,25(OH)₂D₃ previne também, a perda de neurônios injuriados devido aos seus efeitos antiproliferativos nos neuroblastos e melhora a atividade monoaminooxidase, que é uma enzima envolvida no crescimento celular em certos núcleos cerebrais (CANTORNA, 2000).

Pesquisas recentes têm apontado que a vitamina D atua na regulação da expressão genética e produção de citocinas que podem impedir doenças autoimunes (MARK & CARSON, 2006). Assim, várias evidências vêm demonstrando que esta vitamina pode atuar na esclerose múltipla (VAN AMERONGEN *ET AL*, 2004; CHAUDHURI, 2005; GRANT, 2006)

Essa associação foi originalmente identificada pela correlação negativa entre a exposição à luz do sol e a prevalência de esclerose múltipla. Por exemplo, no equador, onde se recebe raios ultravioletas por um período de tempo maior, a ocorrência de esclerose múltipla é aproximadamente 0%, enquanto que a prevalência de esclerose múltipla aumenta significativamente para 50 casos por milhões de pessoas a 45° ao norte ou sul do equador (MARK & CARSON, 2006).

A encefalomielite autoimune experimental tem sido vista como um modelo animal para a esclerose múltipla humana e estudos nesses animais sugerem apoptose de células secretoras de citocinas próinflamatórias como um possível mecanismo da redução dos sintomas da esclerose múltipla com o uso de vitamina D. (CANTORNA *ET AL*, 1996; SPACH *ET AL*, 2004)

Além disso, um grande estudo epidemiológico mostrou que as mulheres com alto consumo de vitamina D (usando suplementos) tinham 40% de redução no risco de desenvolvimento de esclerose múltipla (MUNGER *ET AL*, 2004, 2006).

A exposição de baixos níveis de vitamina D durante o início da vida também parece alterar o desenvolvimento cerebral e é considerado um candidato a fator de risco para esquizofrenia (HANDOKO *ET AL*, 2006, BURNE *ET AL*, 2005; FÉRON *ET AL*, 2005). Os efeitos durante o desenvolvimento do comportamento são largamente desconhecidos. Entretanto, considera-se que deficiência de vitamina D durante a gravidez lidera grandes mudanças no cérebro de recém-natos (BURNE *ET AL*, 2005). Nesse sentido, Handoko *et al* (2006) demonstrou que a vitamina D possui um papel no desenvolvimento cerebral, devido a aparente associação entre polimorfismos em VDR e desenvolvimento cerebral.

Experimentalmente, o recente estudo de Kalueff *et al* (2004) mostrou que camundongos deficientes em vitamina D tiveram reduzida exploração na classificação de testes usados para o estudo da ansiedade e isto postula que modificações de VDR afetam o comportamento emocional dos animais.

Além disso, McGrath *et al* (2006) considera que a estação do ano no período pré-natal apresenta uma grande consequência a respeito do desenvolvimento físico e cognitivo, implicando na associação de nascimentos

durante o inverno/primavera nos Estados Unidos com aumento do risco de esquizofrenia.

3.5. A VITAMINA D e AVE

A vitamina D pode desempenhar importantes ações na patogênese do AVE. Quanto ao seu mecanismo de ação, os estudos enfocam diferentes papéis da vitamina D no sistema nervoso. Losem-Heinrichs *et al* (2004) e Brewer *et al* (2001) ressaltam que a vitamina D reduz os canais de cálcio voltagem-sensível tipo L e assim, pode modular a homeostase de cálcio que atua em vários eventos excitatórios e necróticos no sistema nervoso de animais com AVE induzido (WANG *ET AL*, 2000, TOESCU, 1998).

Losem-Heinrichs *et al* (2004) também admite o efeito da vitamina D sobre a óxido nítrico sintetase, cuja ativação pode causar prejuízos durante o processo de isquemia-reperfusão (GARCION *ET AL*, 1997; WANG *ET AL*, 1997). Ainda sobre os efeitos deletérios do estresse oxidativo, Wang *et al* (2000) associa a formação de óxido nítrico, o qual media uma variedade de funções biológicas, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e citotoxicidade à diminuição dos fatores neurotróficos derivados da glia (GDNF) no infarto cerebral da isquemia induzida por ligação da artéria cerebral média de ratos Sprague-Dawley (GARCION *ET AL*, 1997; WANG *ET AL*, 1997).

Em trabalhos epidemiológicos, perceber-se que o *status* de vitamina D está intimamente ligado ao maior risco de fraturas, principalmente no lado hemiplégico, sugerindo que a deficiência de vitamina D tem correlação com a sobrevida dos

pacientes pós-AVE. (SATO *ET AL*, 2001, 1997, 1996; FUJIMATSU, 1998; KUNO, 1998).

Os estudos que se beneficiam da suplementação de vitamina D, em sua maioria utilizam o seu metabólito mais ativo – a 1,25-(OH)₂D₃, entretanto, foi verificado que o seu uso em altas concentrações em culturas do hipocampo de ratos submetidas ao insulto excitatório com glutamato, provocava efeitos deletérios em neurônios motores, por levar ao acúmulo de corrente dos canais de cálcio sensível-voltagem tipo L (BREWER *ET AL*, 2001).

3.6. O Modelo SHRSP

O SHR e SHRSPs são os modelos animais de estudo mais amplamente usados para a hipertensão, por causa de alguns processos patofisiológicos serem similares aqueles da hipertensão arterial humana. A diferença de características genéticas e metabólicas entre esses animais hipertensos e seus controles normotensos (WKY) é de grande interesse porque pode estabelecer um discernimento entre a regulação da pressão sanguínea na hipertensão essencial humana. (AKIRA *ET AL*, 2005).

A linhagem espontaneamente suscetível ao AVE - o rato SHRSP - foi estabelecida em 1974 por Okamoto *et al* (1974) através do cruzamento não seletivo de SHR. O SHRSP serve como um modelo de hipertensão maligna. Entretanto os fatores patofisiológicos que causam essa hipertensão maligna nos SHRSPs permanece não estabelecida (TAKEDA, 2004).

SHRSP além da hipertensão severa desenvolvem danos em órgãos múltiplos sistemas com proeminente envolvimento do rim (proteinúria e

nefroesclerose maligna), coração (infarto e fibrose) e cérebro (AVE) com uma consequência da microangiopatia trombótica. (MASINENI *ET AL*, 2005). Estes animais têm uma alta incidência de AVE isquêmico e hemorrágico no cérebro, mas não no tronco cerebral, cerebelo ou gânglio basal, ao mesmo tempo, apresentam tipicamente hipertensão e AVE isquêmico no neocórtex. (OKAMOTO, *ET AL* 1974)

O rato SHRSP é considerado um bom modelo experimental para estudo do prejuízo da hipertensão levando ao AVE. O modelo tem sido usado para o estudo de alteração do tecido cerebral e vasculatura tanto estruturalmente como funcionalmente e a relação entre estudos histopatológico e comportamentais ou anormalidades metabólicas (ex: aumento da agressividade, hipocinesia ou hipercinesia, prejuízo da barreira hematoencefálica, proteinúria, repentina perda de peso) tem sido extensivamente investigado (GUERRINI & SIRONI, 2001).

A presença de anormalidades funcionais e estruturais nas artérias de SHRSP, incluem alterações na parede dos vasos tais como desorganização geométrica irregular e degeneração focal do músculo liso medial da célula.

Estudos com microscopia eletrônica têm também revelado necrose medial difundida e desaparecimento completo da vasculatura medial de células musculares em áreas danificadas nas lesões cerebrais em SHRSP, isto é seguido por penetração de monócitos através do endotélio, levando a alteração da barreira hematoencefálica e favorecendo a penetração dos componentes plasmáticos (GUERRINI & SIRONI, 2001).

4. METODOLOGIA

4.1. Animais e Dieta

Machos SHRSP (n=30) de oito semanas de idade e com peso médio de 142 ± 20 g obtidos da colônia do Biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais em biotério com temperatura ambiente e umidade controlados e ciclo de luz 12/12 horas e exaustão de 15/15 minutos, recebendo ração Nuvilab (Nuvital®) e água *ad libitum*. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas (LINDCD) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com “Principles of Laboratory Animal Care”. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética do Departamento de Nutrição Aplicada da Escola de Nutrição para experiência com animais, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

4.2. Grupos experimentais

Após período basal de sete dias, os animais foram separados em 3 grupos: Grupo da curva dose-efeito (Grupo1), grupo da longevidade (Grupo 2) e grupo dos parâmetros bioquímicos (Grupo 3).

4.2.1. Grupo I - para determinação da dose ideal

Para tal foi realizada a curva dose-efeito sendo tratados 06 animais que foram suplementados diariamente com vitamina D₃ (colecalfiferol, Sigma Chemical Co., 1UI=0,025µg) em dosagem cumulativa correspondente à 12,5µg/Kg⁻¹ (VIANNA, 1992), 25µg/Kg⁻¹ e 50µg/Kg⁻¹ para determinação da dose ideal. O colecalfiferol foi dissolvido em 10µl de propilenoglicol e guardado em tubo de polipropileno envolto em papel alumínio e mantidos a 4°C. No momento da administração, a solução era homegeinizada por um agitador magnético e suas diluições executadas em 0,3ml de óleo de coco. A suplementação foi administrada por 28 dias para cada dosagem através de gavagem orogástrica com sonda PE 190.

4.2.2. Grupo II – para determinação de aldosterona plasmática

Nesse grupo composto por 12 animais enfocamos a determinação da concentração de aldosterona plasmática nos animais suplementados com colecalfiferol (n=6) a 12,5 µg/Kg⁻¹ por 28 dias e nos seus respectivos controles (n=6).

Após o tratamento, os animais foram mantidos em jejum de 24 horas e submetidos à anestesia leve por éter e pentobarbital sódico (i.p.) para obtenção

de sangue por punção cardíaca. A aldosterona plasmática foi determinada por radioimunoensaio pelo Laboratório associado, Paschoal Granato.

4.2.3. Grupo III - para determinação da longevidade

Os animais (n=12) foram divididos em dois grupos: o grupo controle (n=6) que recebeu somente óleo de coco e o grupo vitamina D3 (n=6) que foi suplementado com colecalciferol com dosagem estabelecida através da curva dose-efeito (12,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$). A suplementação foi administrada até o óbito dos animais.

4.3. Métodos

4.3.1 Parâmetros biológicos gerais

Tanto no período basal como no tratamento os animais tiveram, diariamente, os seguintes parâmetros biológicos avaliados:

- Peso corpóreo
- Ingestão Hídrica
- Consumo de ração
- Diurese

4.3.2. Ectoscopia

Foi monitorada diariamente a ectoscopia dos animais, sendo constituída pela avaliação do aspecto físico (pêlo e mucosas, postura e comportamento) dos animais, seguindo protocolo do Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas.

4.3.3. Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica foi aferida duas vezes por semana à tarde, em pletismógrafo segundo o descrito por William (1983) e modificado por Vianna (1992), que consiste em aquecer o animal numa caixa com temperatura controlada de aproximadamente 37° C durante 10 minutos para vasodilatar a cauda e assim, facilitar a aferição da pressão arterial sistólica. O animal então, é colocado num cilindro de contenção e sua cauda introduzida no pletismógrafo com água aquecida à 35° C. Em seguida, comprimi-se a cauda dentro do aparelho com a finalidade de expulsar o máximo de sangue. Insufla-se o manguito a 280mmHg, aguarda-se a estabilização do líquido e afrouxa-se lentamente o manguito para permitir a passagem de sangue pela artéria previamente comprimida. Quando o sangue passa para o interior da cauda, a coluna indicadora (repleta de líquido) terá seu volume alterado, e assim, procederemos a leitura da pressão sistólica do animal.

4.3.4. Testes neurológicos

Diariamente, os animais foram submetidos à avaliação neurológica obtida por uma bateria de testes de força, equilíbrio, sensoriomotores descritos a seguir:

a) Reflexo das patas dianteiras:

O rato é erguido pela cauda e lentamente levado em direção à mesa. Ratos sem alterações estendem imediatamente ambas as patas em direção à mesa com os cotovelos levemente flexionados. Ratos com injúria não respondem ao movimento como um todo ou podem mover a pata afetada espasticamente ou perpendicularmente ao seu corpo (FUJIMOTO *ET AL*, 2004).

Scoring: Grau 0: cotovelos levemente flexionados; Grau 1: movem a pata espasticamente; Grau 2: mantém a pata perpendicularmente o corpo.

b) Reflexo das patas traseiras:

O rato sobre a superfície é erguido sutilmente pela cauda, mas de forma a permanecer com suas patas dianteiras na mesa. Um animal sem alteração, caracteristicamente estende completamente suas patas traseiras para trás, com completa extensão e aberturas dos dedos dessas patas, enquanto animais injuriados terão dificuldades de executar algum ou todos os aspectos desse movimento (FUJIMOTO *ET AL*, 2004).

Scoring: Grau 0: extensão completa das patas; Grau 1: extensão da pata, mas sem extensão dos dedos; Grau 2: extensão incompleta.

c) Reflexo de postura:

Os são gentilmente seguros pela cauda, 1m acima do chão e é observada a extensão das patas dianteiras. Ratos normais estendem ambas as patas, já a flexão consistente das patas é uma resposta anormal. Ratos com esta flexão são colocados numa folha de papel revestida com um plástico que pode ser agarrada com as patas. Com a cauda segura, uma pressão lateral é aplicada atrás dos ombros do rato até deslizarem várias polegadas. A manobra é repetida cinco vezes em cada direção. Os ratos normais resistem à pressão lateral exercida (ABOU-DONIA *ET AL*, 2002).

Scoring: Grau 0: ratos sem evidencia de flexão consiste das patas quando seguro acima da superfície; Grau 1: ratos com flexão consistente das patas; Grau 2: ratos não resistentes à pressão lateral.

d) Reflexo plantar:

O animal é tocado com um pincel ou escova na superfície plantar das patas. Os animais normais erguem as patas, e forma a se esquivar do pincel (FUJIMOTO *ET AL*, 2004).

Scoring: Grau 0: o animal responde rapidamente ao toque do pincel; Grau 1: animal demora mais que 2 segundos para retirada da pata; Grau 2: animal não se esquiva do pincel.

e) Plano Inclinado

O animal é colocado num plano reto em posição horizontal, com a cabeça voltada para o lado em que a tábua será erguida. A base é então, lentamente girada para a porção vertical.

O ângulo em que o rato começa a escorregar é *scoreado*:

Grau 0: o rato não cai da rampa quando girada; Grau 1: o animal escorrega ou cai a 30°; Grau 2: o rato cai ou escorrega a 90°; Grau 3: o rato cai ou escorrega a 180° (ABOU-DONIA *ET AL*, 2002).

f) Colocação de patas

Neste teste, as respostas visual e táctil são investigadas. Para a colocação visual, os animais são seguros nas mãos do examinador 10cm acima da superfície e com as patas dianteiras livres. Os ratos são então, lentamente encaminhados para a superfície. Os animais sem lesão alcançam à mesa com ambas as patas dianteiras.

Para a colocação táctil, as porções dorsal e lateral das patas devem tocar a borda da superfície. Os animais normais imediatamente tocam a pata na superfície da mesa (ABOU-DONIA *ET AL*, 2002).

Scoring: Grau 0: a colocação das patas é imediata: Grau 1: a colocação lenta ou negativa; Grau 2: a colocação das patas não ocorre em 2 segundos.

g) Barra de equilíbrio (tempo de agarre das patas):

A força das patas dianteiras é medida através de uma barra de madeira com 5mm de diâmetro que é segura horizontalmente e erguida para que o rato suporte seu próprio peso. O tempo que o rato se mantém seguro na barra é cronômetrado (ABOU-DONIA *ET AL*, 2002).

h) Teste cognitivo (teste de memória – labirinto)

Nesse teste, mede-se a habilidade do rato completar o percurso de um labirinto, que requer a capacidade de criar e armazenar um mapa cognitivo.

A análise dos labirintos inclui o tempo gasto no percurso. (FUJIMOTO *ET AL*, 2004).

i) Viga de equilíbrio:

A viga de equilíbrio é um teste global da função vestibulomotora e da função cerebelar de equilíbrio.

Nesse teste, o animal é colocado numa estreita viga de madeira de 1,5cm de largura e aproximadamente 1m de altura.

O tempo que o animal permanece na viga é anotado. Animais lesados podem ser capazes de ficar a viga por mais de 60 segundos, mas podem ser

capazes de assumir posturas que são diferentes de animais normais, como, abraçar a viga ou se equilibrar com as patas dependuradas para se sustentar (FUJIMOTO *ET AL*, 2004).

j) Termo-sensório

Segue o princípio do *Hot Plate Analgesia Meter (San Diego Instruments)*, onde se avalia a resposta de sensibilidade da cauda do rato em resposta a sua exposição a uma superfície quente. Esse teste foi adaptado pelo Laboratório de Investigação em Nutrição e Doenças Crônico-Degenerativas para ser utilizado diariamente sem representar danos físicos aos animais. A cauda do animal é colocada em água à 54°C e resposta termo-sensória é cronometrada.

4.4. Tratamento estatístico

Na análise dos dados foi utilizado o teste-t student não pareado para comparações de duas médias e análise de variância Two-Way para determinar as diferenças entre as doses de tratamento. Foi também realizada também curva de sobrevivência Long-Rank para caracterizar a longevidade dos animais. O valor $p < 0,05$ foi atribuído para significância estatística.

Para a análise estatística foram utilizados o programa GraphPad Prism 4.0 para Windows e R para Windows.

5. RESULTADOS

GRUPOS EXPERIMENTAIS:

5.1. Grupo I - Curva dose-efeito sobre a pressão arterial e parâmetros biológicos gerais

A suplementação de colecalciferol com a dose de $12,5\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ causou redução significativa da pressão arterial sistólica de 209 ± 5 mmHg para $193,5\pm 2,7$ mmHg ($p < 0,05$) na primeira semana de tratamento sendo o mesmo observado com as doses: $25\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ e $50\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ que induziram respectivamente, à redução da pressão arterial de 227 ± 5 mmHg para $174,5\pm 3,5$ mmHg e $230,5\pm 0,9$ mmHg para $171\pm 0,85$ mmHg, ($p < 0,05$) (Figura 1). Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre a segunda e terceira doses.

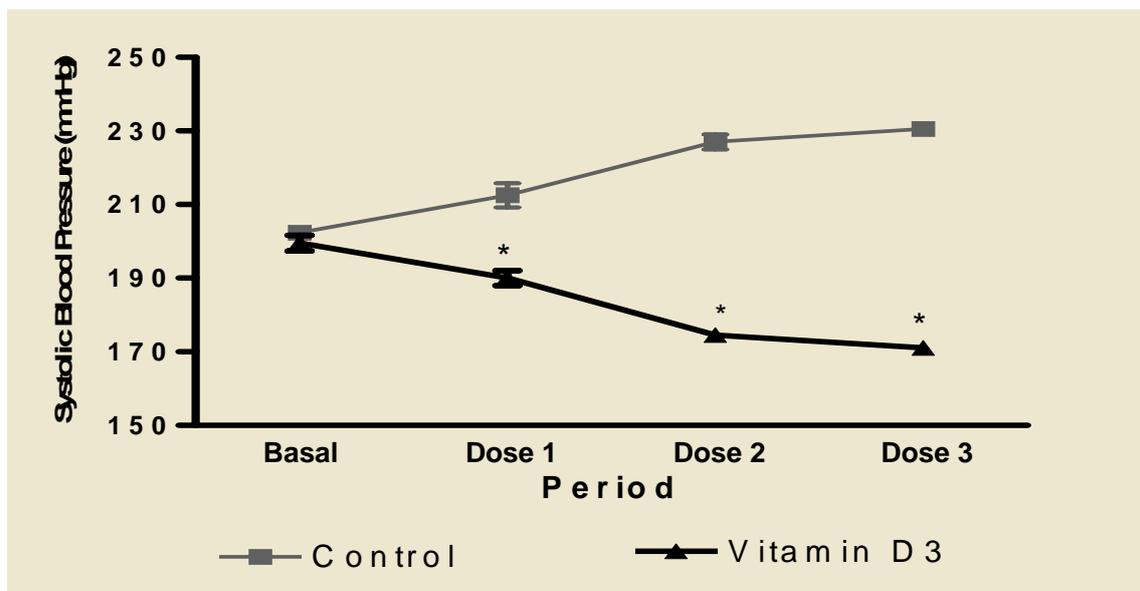


Figura 1 – Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 (Dose 1) 25 μ g/kg-1 (Dose 2); 50 μ g/kg-1 (Dose 3) de colecalciferol (Vitamina D3). (*p<0.05)

Entretanto, 25 μ g/Kg⁻¹ de colecalciferol provocou significativa desaceleração do crescimento dos animais, onde notamos redução de peso corpóreo de 228 \pm 3g to 212 \pm 3g (p<0.05) e a suplementação com 25 μ g/Kg⁻¹ e 50 μ g/Kg⁻¹ induziu um significativo aumento na diurese de 6 \pm 0,7ml para 15,8 \pm 6 ml e de 15 \pm 1ml para 29 \pm 1ml, respectivamente. (p<0,05) (Tabela 1).

Tabela 1 – Representa a média \pm DP do perfil de parâmetros biológicos de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 (Dose 1); 25 μ g/kg-1 (Dose 2); 50 μ g/kg-1 (Dose 3) de colecalciferol (Vit D3). (*p<0.05)

Período	Grupo	Peso (g)	Diurese (ml)	Água (ml)	Ração (g)
Basal	Vit D3	125 \pm 8	1,5 \pm 1	25,3 \pm 3,5	21,4 \pm 2,5
	Controle	135,5 \pm 9	3,2 \pm 2	26 \pm 2,3	17,3 \pm 1
Dose 1	Vit D3	182 \pm 26	3 \pm 0,8	27 \pm 1,5	20 \pm 1,5
	Controle	188 \pm 21	4,5 \pm 1,2	27 \pm 3,5	18,5 \pm 1,5
Dose 2	Vit D3	212 \pm 3*	15,8 \pm 6*	42 \pm 6*	18 \pm 1
	Controle	228 \pm 3	6 \pm 0,7	31,5 \pm 1,5	17,5 \pm 0,5
Dose 3	Vit D3	209 \pm 7*	29 \pm 1*	54 \pm 3*	16,5 \pm 5
	Controle	235 \pm 3,5	15 \pm 1	42 \pm 5,5	16,5 \pm 1

5.2. Grupo II - Determinação da Aldosterona Plasmática

A suplementação de colecalciferol com a dose de 12,5 μ g/Kg⁻¹ causou redução significativa (p<0,05) de aldosterona plasmática de 19,7 \pm 12,1pg/ml para 10,7 \pm 4pg/ml (Figura 2) que foi acompanhada da redução estatisticamente significativa da pressão arterial sistólica. (Figura 3).

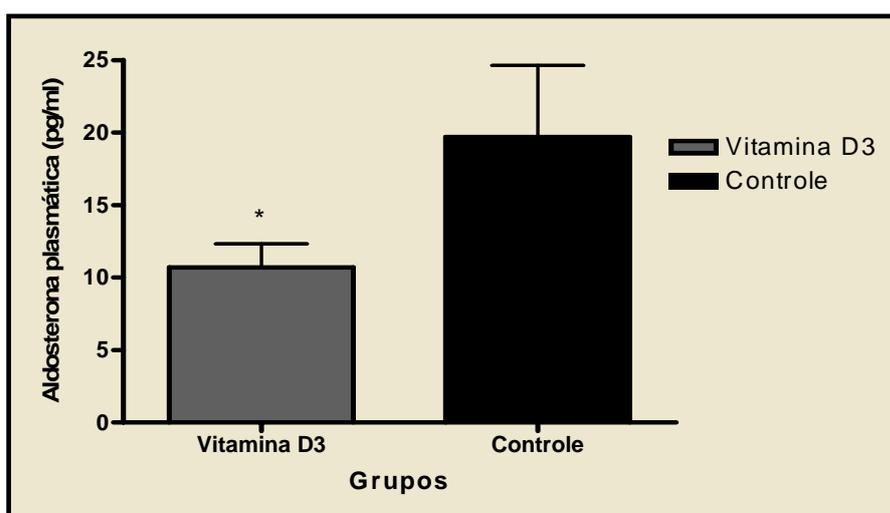


Figure 2 – Representa a média \pm DP da concentração plasmática de aldosterona em ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol (Vitamina D3) e seu controle. (*p<0.05)

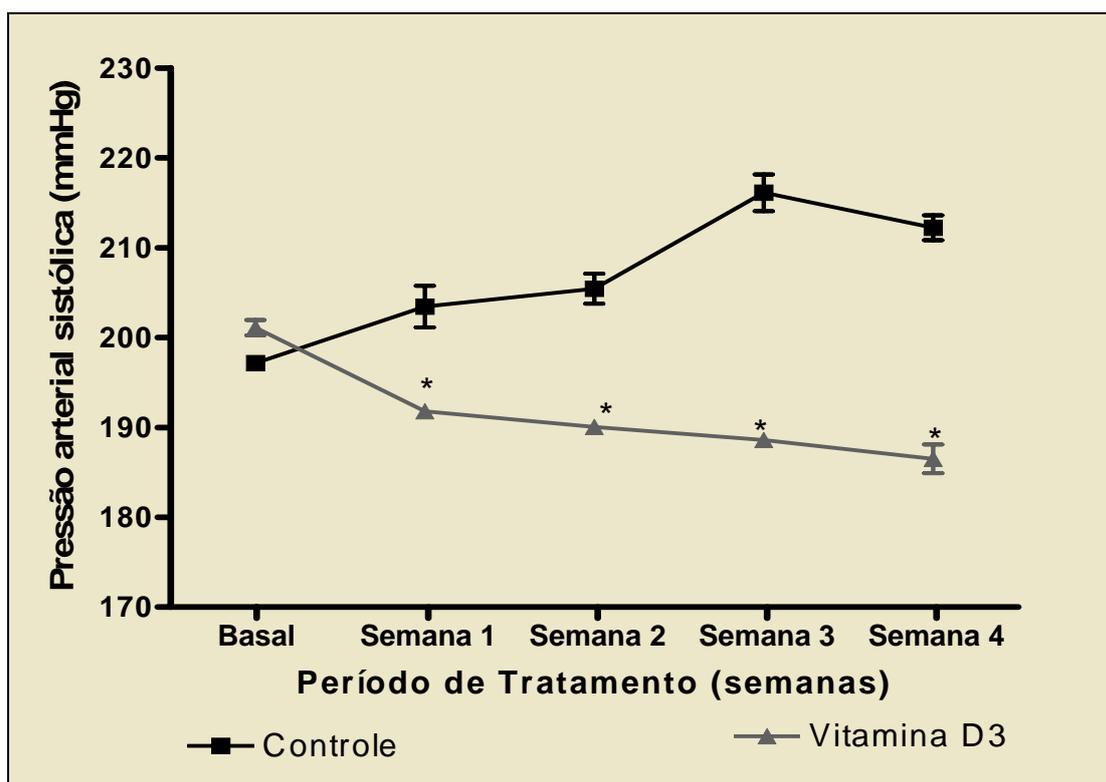


Figure 3 – Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol (Vitamina D3) e seu controle. (*p<0.05)

5.3. Grupo III - Longevidade, parâmetros biológicos gerais e testes neurológicos.

A análise de curva de sobrevivência não demonstrou significância estatística em relação ao tempo de vida entre os experimentais. Entretanto, observamos uma diferença de 50 dias entre o último óbito do animal do grupo controle em relação ao animal do grupo vitamina D3 que permaneceu vivo. Acreditamos que uma amostra maior poderia definir com maior clareza e fidedignidade essa diferença não estaticamente significativa observada em nosso estudo (Figura 4).

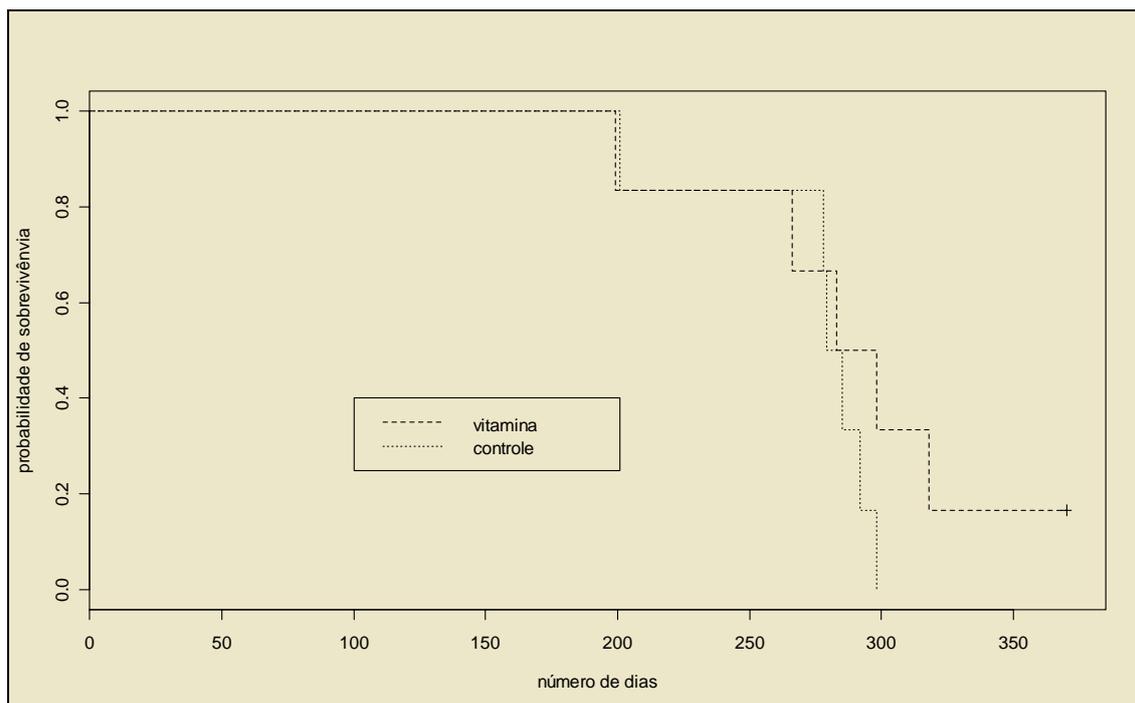


Figure 4 – Representa a curva de sobrevivência em dias de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5µg/kg-1 de colecalciferol (Vitamina D3) e seu controle. (*p<0.05)

Nesse grupo, a suplementação com 12,5µg/kg-1 de colecalciferol não alterou os parâmetros biológicos gerais, exceto o consumo de ração que foi reduzido no primeiro mês de uso da vitamina, mas retornando aos mesmos valores de consumo de ração que o grupo controle nos meses subseqüentes (Tabela 2).

Tabela 2 – Representa a média \pm DP do perfil de parâmetros biológicos de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol até o óbito. (*p<0.05)

Período	Grupo	Peso (g)	Diurese (ml)	Água (ml)	Ração (g)
Basal	Vit D3	137 \pm 17	1,5 \pm 0,5	24.5 \pm 3,5	16 \pm 1
	Controle	143,5 \pm 7,8	3,2 \pm 2	26 \pm 2,5	17,5 \pm 1
Mês 1	Vita D3	178,5 \pm 16,5	3,7 \pm 1	28.5 \pm 1,5	15 \pm 1*
	Controle	189 \pm 21	4,5 \pm 1,3	27.5 \pm 4	18,5 \pm 1,5
Mês 2	Vita D3	212 \pm 11,5	5,7 \pm 0,5	29 \pm 1	17 \pm 1,5
	Controle	228 \pm 7	6 \pm 0,7	31,5 \pm 1,5	17,5 \pm 0,5
Mês 3	Vit D3	237 \pm 5	7 \pm 1,3	32,5 \pm 5	17 \pm 0,5
	Controle	235,5 \pm 2,5	15 \pm 4	42 \pm 5,5	16,5 \pm 0,7
Mês 4	Vit D3	238 \pm 5	15 \pm 4	45 \pm 4,5	18 \pm 1,5
	Controle	244 \pm 6	21 \pm 3	48 \pm 5	16 \pm 2
Mês 5	Vit D3	242 \pm 7	26 \pm 4	55,5 \pm 4,5	17,5 \pm 1
	Controle	258 \pm 6	23 \pm 1,5	56 \pm 3	18 \pm 1,5
Mês 6	Vit D3	257 \pm 4,5	25 \pm 3	58 \pm 2	19 \pm 1,5
	Controle	260 \pm 6	26 \pm 2,5	62,5 \pm 4	19 \pm 1
Mês 7	Vit D3	250,5 \pm 3,5	30 \pm 6	63 \pm 9	18,5 \pm 1,5
	Controle	261,5 \pm 3,5	38,5 \pm 4	75 \pm 3,5	19,5 \pm 1
Mês 8	Vit D3	269 \pm 6	33,5 \pm 5,5	58 \pm 8	19 \pm 2,5
	Controle	247 \pm 25,5	37,5 \pm 9	64 \pm 15	15,5 \pm 3,5
Mês 9	Vit D3	265 \pm 5,5	24 \pm 5	49 \pm 8	17,5 \pm 2,5
	Controle	237,5 \pm 17	23 \pm 7	33,6 \pm 13.5	11,5 \pm 6

Quanto à determinação da pressão arterial sistólica, o efeito hipotensor do colecalciferol foi confirmado com níveis de 212,5 \pm 8mmHg (controle) versus 198,5 \pm 1mmHg (tratado) (p<0,05) ao final do primeiro mês e esse mesmo efeito foi mantido nos meses seguintes, tendo uma redução máxima de pressão de 230,5 \pm 0,9mmHg para 193 \pm 3,5mmHg (p<0,05) no terceiro de mês de tratamento.

A idade dos animais não alterou a resposta ao tratamento com vitamina D (Figura 5).

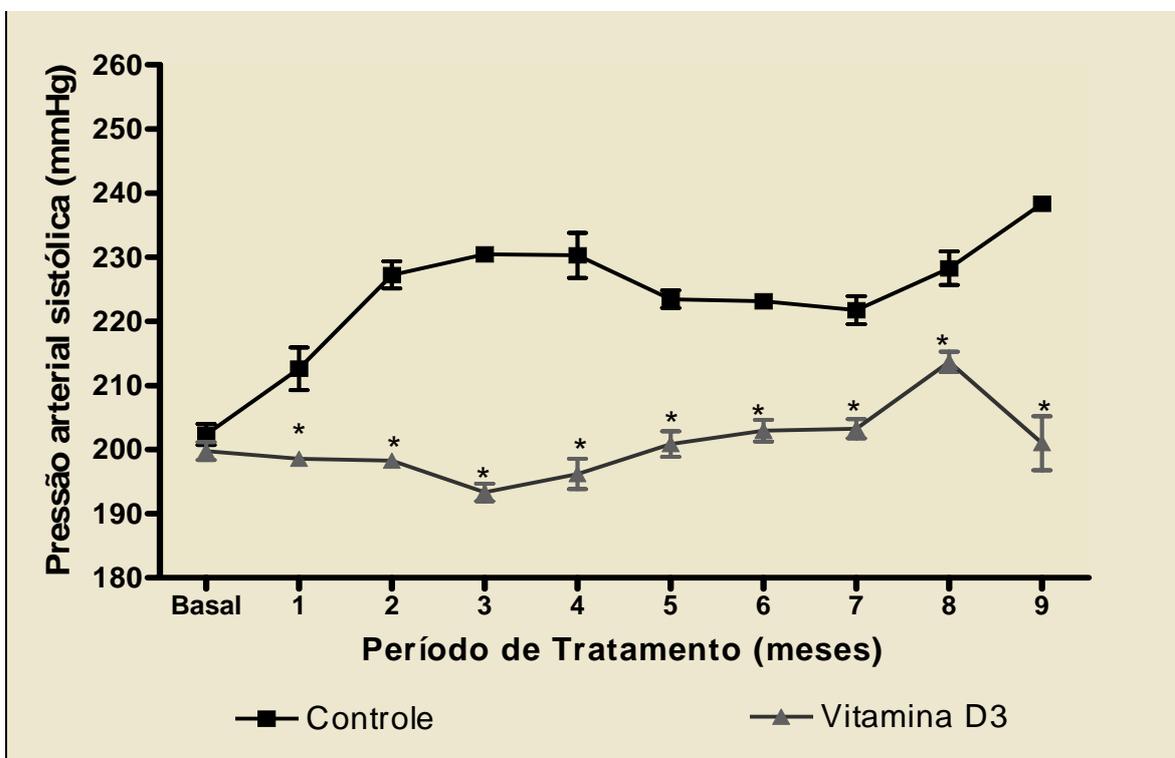


Figura 5 – Representa a média \pm DP da pressão arterial sistólica de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol (Vitamina D3) até o óbito (*p<0.05)

Em relação aos testes neurológicos, os animais do grupo que recebeu colecalciferol demoraram mais tempo para completar o percurso do labirinto durante o terceiro e quarto mês de tratamento que os animais do grupo controle. Todavia não encontramos diferença estaticamente significativa no exame de força e equilíbrio, representado pelo teste Barra de Equilíbrio entre os grupos, apesar de verificarmos uma redução em ambos os grupos quanto ao tempo que animais ficavam dependurados do período basal ao primeiro mês de suplementação. (Tabela 3).

O teste Viga de equilíbrio nos mostrou uma sutil, mas estatisticamente significativa diferença entre os grupos no sexto e sétimo mês de tratamento. Os

animais tratados permaneceram na viga em média $1'14''61 \pm 0'05''69$ no sexto mês e $1'11''87 \pm 0'12''22$ no sétimo mês, enquanto o grupo controle permaneceu $1'28''86 \pm 0'02''23$ e $1'25''71 \pm 0'04''99$, respectivamente. Contudo, nos oitavo mês de tratamento grupo controle permaneceu menos tempo na passarela ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Também observamos resposta mais prolongada do grupo tratado no que se refere à sensibilidade térmica, do quarto ao sétimo mês de suplementação (Tabela 3).

Tabela 3 – Representa a média \pm DP dos testes neurológicos: Memória; Barra de equilíbrio; Viga de Equilíbrio e Termo-sensório em minutos, segundos e centésimos de segundos de ratos SHRSP (n=12) suplementados com $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ -1 de colecalciferol até o óbito. (* $p < 0,05$)

Período	Grupo	Memória	Barra de Equilíbrio	Viga de Equilíbrio	Termo-sensório
Basal	Vit D3	0'12''34	0'14''00	1'30''00	0'01''81
		\pm	\pm	\pm	\pm
	Controle	0'04'58	0'02''65	0'00'00	0'00''21
		0'16''02	0'14''67	1'30''00	0'01''85
Mês 1	Vita D3	\pm	\pm	\pm	\pm
		0'01'19	0'06''18	0'00'00	0'00''16
	Controle	0'19'76	0'07''20	1'29''88	0'02''47
		0'02''44	0'00''72	0'00''23	0'00''62
Mês 2	Vita D3	0'23''02	0'06''66	1'30''00	0'02''10
		\pm	\pm	\pm	\pm
	Controle	0'05''02	0'02''31	0'00'00	0'00''45
		0'24''22	0'06''18	1'29''36	0'02''86
Mês 3	Vit D3	\pm	\pm	\pm	\pm
		0'09''40	0'09''92	0'01'07	0'00''30
	Controle	0'23''34	0'05''14	1'30''00	0'03''07
		\pm	\pm	\pm	\pm
Mês 3	Vit D3	0'02''70	0'00''66	0'00'00	0'00''26
		0'35''42*	0'05''81	1'29''32	0'03''57
	Controle	\pm	\pm	\pm	\pm
		0'06''41	0'00''45	0'01''36	0'00''63
Controle	0'19''45	0'05''06	1'28''41	0'03''14	
	\pm	\pm	\pm	\pm	
		0'02'69	0'00''10	0'01''88	0'00''09

Período	Grupo	Memória	Barra Equilíbrio	de Viga Equilíbrio	de Termo- sensório
Mês 4	Vit D3	0'35''34*	0'06''21	1'21''42	0'04''61*
		±	±	±	±
	Controle	0'03.38	0'00''97	0'04''52	0'00''50
		0'20''34	0'04''60	1'24''73	0'03''13
Mês 5	Vit D3	0'01''64	0'00''96	0'02''16	0'00''15
		0'39''39	0'05''29	1'18''62	0'05''21*
	Controle	0'12''54	0'00''52	0'07''72	0'00''58
		0'25''49	0'05''10	1'24''84	0'03''34
Mês 6	Vit D3	0'13''73	0'00''62	0'10''32	0'00''22
		0'30''11	0'05''18	1'14''61*	0'04''12*
	Controle	0'09''46	0'00''46	0'05''69	0'00''54
		0'22''79	0'05''42	1'28''86	0'03''28
Mês 7	Vit D3	0'04''75	0'00''07	0'02''23	0'00''26
		0'37''47	0'04''62	1'11''87*	0'04''43*
	Controle	0'13''19	0'00''32	0'12''22	0'00''16
		0'30''42	0'05''68	1'25''71	0'03''63
Mês 8	Vit D3	0'02''73	0'01''62	0'04''99	0'00''22
		0'31''39	0'04''52	1'21''08	0'03''84
	Controle	0'13''56	0'00''28	0'10''96	0'00''70
		1'03''54*	0'04''75	1'02''54*	0'03''81
		0'20''85	0'01''16	0'23''69	0'00''62

No teste de plano inclinado os animais do grupo tratado no sexto mês escorregaram ou caíram da rampa em maiores ângulos que os do grupo controle, todavia, no oitavo mês de suplementação ocorreu uma inversão de resultados. Os animais do grupo tratado foram mais resistentes à queda no plano inclinado. Concomitantemente, observamos resultados similares no teste de reflexo de pata dianteira.

O score do grupo controle no teste de reflexo postural foi mais elevado $0,82 \pm 1,5$ versus aos animais suplementados $0,025 \pm 0,05$ no quarto mês de

suplementação, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa nos demais meses de tratamento.

Os resultados do testes de reflexo de pata traseira e reflexo plantar também demonstram resposta menos agravada no grupo suplementado com vitamina D3 no oitavo mês de acompanhamento (Tabela 4).

Tabela 4 – Representa a média \pm DP dos testes neurológicos: Plano Inclinado (PI); Reflexo Postural (RP); Reflexo de Pata Traseira (RPT); Reflexo de Pata Dianteira; Teste de Colocação de Patas (TCP); Reflexo Plantar (RPt) em scores de ratos SHRSP (n=12) suplementados com 12,5 μ g/kg-1 de colecalciferol até o óbito. (*p<0.05)

Período	Grupo	PI	RP	RPT	RPD	TCP	RPt
Basal	Vit D3	–	–	–	–	–	–
	Controle	–	–	–	–	–	–
Mês 1	Vita D3	–	–	–	–	–	–
	Controle	0,03 \pm 0,04	–	–	–	0,06 \pm 0,06	–
Mês 2	Vita D3	–	–	–	–	–	–
	Controle	–	–	–	–	0,12 \pm 0,05	0,06 \pm 0,09
Mês 3	Vit D3	–	–	–	–	–	–
	Controle	0,01 \pm 0,03	0,008 \pm 0,01	0,008 \pm 0,01	0,008 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,008 \pm 0,01
Mês 4	Vit D3	0,15 \pm 0,04	0,025 \pm 0,05	0,01 \pm 0,09	0,05 \pm 0,063	–	0,016 \pm 0,03
	Controle	0,12 \pm 0,16	0,82 \pm 1,5*	0,21 \pm 0,07	0,066 \pm 0,09	0,16 \pm 0,16	0,05 \pm 0,1
Mês 5	Vit D3	0,37 \pm 0,23	0,24 \pm 1,5	0,22 \pm 0,16	0,14 \pm 0,04	0,17 \pm 0,18	–
	Controle	0,15 \pm 0,18	0,083 \pm 0,17	0,16 \pm 0,07	0,072 \pm 0,1	0,08 \pm 0,14	0,15 \pm 0,12*
Mês 6	Vit D3	0,34 \pm 0,11*	0,2 \pm 0	0,12 \pm 0,14	0,33 \pm 0,68*	–	0,02 \pm 0,04
	Controle	0,01 \pm 0,02	0,04 \pm 0,04	0,03 \pm 0,04	0,06 \pm 0,077	0,10 \pm 0,11	0,13 \pm 0,11
Mês 7	Vit D3	0,34 \pm 0,11	0,14 \pm 0,12	0,28 \pm 0,19	0,76 \pm 0,06	0,96 \pm 0,12	0,06 \pm 0,12
	Controle	0,11 \pm 0,17	0,17 \pm 0,12	0,12 \pm 0,14	0,16 \pm 0,11	0,05 \pm 0,06	0,13 \pm 0,06
Mês 8	Vit D3	0,27 \pm 0,32	0,11 \pm 0,13	0,13 \pm 0,21	0,06 \pm 0,95	0,09 \pm 0,12	0,06 \pm 0,12
	Controle	0,65 \pm 0,5*	0,11 \pm 0,13	0,74 \pm 0,56*	0,25 \pm 0,03*	0,20 \pm 0,26	0,30 \pm 0,19*

6. DISCUSSÃO

Considerando a hipertensão como o principal fator de risco para o acidente vascular encefálico, esse trabalho foi realizado para investigar os efeitos do colecalciferol em ratos hipertensos suscetíveis ao AVE. Estudos prévios têm apontado que o rato SHRSP seria o modelo experimental ideal para o estudo do prejuízo da hipertensão precedendo o infarto cerebral (GUERRINI, 2001).

Alterações do endotélio em tais animais podem prejudicar respostas vasodilatadoras na hipertensão crônica e predispor à isquemia, onde o conseqüente edema cerebral também seria precedido pela interrupção da barreira hematoencefálica. A implicação desses achados é que o aumento da suscetibilidade ao infarto cerebral na hipertensão crônica poderia ser relacionado, em parte, à resposta comprometida da circulação colateral (BAUMBACH *ET AL*, 1988; FARACI *ET AL*, 1990).

Como observado na literatura, os animais avaliados no presente estudo, possuíam no início dos ensaios, níveis pressóricos bem elevados, caracterizando hipertensão maligna, que poderia suscitar em infarto cerebral.

Epidemiologicamente observa-se que os hipertensos têm de 3 a 4 vezes mais probabilidades de ter um episódio de AVE (IADECOLA, 2004). Esse aumento de pressão arterial exerce poderosos efeitos na circulação cerebral, uma vez que produz hipertrofia e remodelação definida como uma redução no diâmetro externo

vascular, que promove aterosclerose. Na realidade, a hipertensão arterial altera também a habilidade das células endoteliais de liberar fatores vasoativos e aumenta o tônus constritor de artérias sistêmicas e cerebrais (IADECOLA, 2004).

O principal objetivo dessa primeira parte do projeto foi estabelecer uma curva dose-efeito da vitamina D3 sobre a pressão arterial de ratos SHRSP, e os resultados apresentados sugerem que alcançamos nosso objetivo. A redução da pressão arterial logo na primeira dosagem de colecalciferol aponta que esta seria a dose ideal para o tratamento com o colecalciferol sem suscitar efeitos tóxicos uma vez que a dosagem de $25\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ resultou em um consumo hídrico exacerbado, que foi também identificado com a dosagem de $50\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$. Acreditamos também que a observada alteração de diurese pode ter sido provocada por hipercalciúria, o que fisiologicamente traduz-se por aumento osmótico da excreção de líquido.

Adicionalmente, estudos prévios do nosso laboratório demonstram efeito hipotensor do colecalciferol em ratos hipertensos (SHR) (VIANNA, 1992) o que foi atribuído a ação dessa vitamina sobre a musculatura lisa vascular traduzida por aumento da resposta relaxante (VIANNA, 2002; VIANNA *ET AL* 2002, 1999). Em ratos hipertensos diabéticos o tratamento com colecalciferol também reduziu os níveis pressóricos. (DE SOUZA SANTOS & VIANNA, 2005) Portanto, o presente trabalho confirma a ação hipotensora do colecalciferol.

Concomitantemente foi observada significativa redução da aldosterona plasmática e esses resultados corroboram com os recentes achados da literatura sobre o papel da vitamina D sobre a expressão do SRAA e conseqüente modulação da pressão arterial sistólica (LI *ET AL*, 2004). De acordo com estudos prévios do nosso laboratório, a vitamina D foi capaz de reduzir os níveis

plasmáticos de aldosterona em ratos espontaneamente hipertensos de 45 ± 2 ng/dl para 30 ± 3 ng/dl e assim regular a pressão arterial sistólica (SANTOS *ET AL*, 2007). Embora em nossos ensaios não tenhamos estudado o mecanismo pelo qual a vitamina D foi capaz de modular a secreção de aldosterona, esta pode ser atribuída à supressão direta da transcrição de renina (LI *ET AL*, 2002). Estudos de Li *et al* e Kong *et al* (2002, 2003, 2003) apontam que a expressão de renina e a produção plasmática de angiotensina II estariam severamente aumentadas em camundongos deficientes em receptores de vitamina D e por isso esses animais teriam maior propensão à hipertensão, hipertrofia cardíaca e retenção hídrica.

A presença de receptores VDR em múltiplas regiões do cérebro e a identificação de uma relação inversa entre a concentração plasmática de 1,25-(OH)₂D₃ e a pressão arterial e/ou atividade plasmática de renina (LI, 2003), também apóiam os nossos achados.

No que se refere aos testes neurológicos, estes têm sido usados em estudo da recuperação da função seguindo injúria do sistema nervoso, bem como para medir a eficácia do comportamento e intervenções farmacológicas (HALLET, 2001; LIU *ET AL*, 1999; CHOI-LUNDBERG *ET AL*, 1998; KAWAMATA *ET AL*, 1997)

Quanto à significância dos testes neurológicos utilizados em animais, ainda não é possível detectar todos os prejuízos residuais que podem ser relevantes clinicamente, além disso, nem todos os testes são suscetíveis ao dano para estrutura sensoriais ou motoras (FUJIMOTO *ET AL*, 2004).

Nos animais SHRSP, apesar da reconhecida interação da hipertensão arterial, fatores genéticos e AVE, o seu grau de prejuízo sensoriomotor e subsequente recuperação funcional pós AVE tem sido ainda investigado (MCGILL *ET AL*, 2005)

O tempo escolhido para a administração dos testes é também provável de ser um fator crítico porque algumas recuperações espontâneas têm sido mostradas e estas ocorrem agudamente após tanto a injúria cerebral experimental quanto clínica (FUJIMOTO *ET AL*, 2004). Nesse sentido, é importante notar que a redução do estresse durante os testes de comportamento é crucial para obter dados confiáveis (SCARLLET *ET AL*, 2000)

Além disso, a frequência do teste de comportamento pode ter um impacto no estresse total do animal e no pesquisador (FUJIMOTO *ET AL*, 2004). Alguns fatores podem diminuir o estresse do animal através do treinamento, climatização ou aumentar o estresse como a troca de manipuladores, mudanças no tratamento, por exemplo.

Em relação a isto, observamos em nossos ensaios que os animais sofreram repostas adaptativas a alguns exames quando realizados diariamente, que pode ter sido provocada por falta de estímulo ou docilidade adquirida pelos animais acompanhados a longo prazo.

Devido às diferenças entre laboratórios e métodos utilizados, é difícil definir que teste é mais efetivo para detectar déficits e mensurar os efeitos do tratamento a curto ou longo prazo (FUJIMOTO *ET AL*, 2004). Esse trabalho adotou uma bateria de testes sensoriomotores e de cognição para uso diário, com o propósito de melhor detectar AITs de rápida recuperação e recorrência.

No que se refere ao teste de plano inclinado, observamos que o déficit durante a realização deste exame pode ser uma consequência do hábito da execução da tarefa, fazendo com que a motivação dos animais para girar e encarar a posição íngreme torne-se menor com a progressão do tempo, apesar de ser fisicamente capacitado para completar o teste. Assim, o baixo *score* neste

teste pode refletir preferivelmente falta de motivação do que prejuízo sensoriomotor (MCGILL *ET AL*, 2005). Em nossos ensaios a redução desta resposta em ratos tratados com vitamina D3 no sexto mês de suplementação, pode ser traduzida por um déficit motor observado pelo comprometimento no teste de reflexo de pata dianteira no mesmo período. Por outro lado esse achado se restringiu apenas a esse mês sugerindo que tenha sido consequência de AIT que teve posterior recuperação.

Quanto à função motora, esta é medida por um complexo sistema de rede neurais originadas no córtex e terminando no músculo esquelético (FUJIMOTO *ET AL*, 2004). Acredita-se que déficits motores são resultantes da interrupção em qualquer parte ou toda parte das vias motoras e isto subentende que qualquer teste de comportamento deve ser correlacionado ao déficit observado com a severidade do dano experimental induzido.

Os testes de reflexo postural, de patas traseiras e dianteiras testam a habilidade de um animal coordenar os movimentos nas quatro patas para ficar ereto e a injúria encontrada em um dos membros pode ser indicativo de AIT ou lesão decorrente de um AIT prévio como encontrado em nosso estudo, com agravo da resposta postural dos animais controle (FUJIMOTO *ET AL*, 2004; HALLET, 2001)

O teste de reflexo de patas dianteiras e traseiras pode representar também um dano unilateral no cérebro do rato, que mostra grau de assimetria entre os *scores* das duas patas dianteiras ou traseiras que se correlaciona com a severidade da injúria e o hemisfério afetado (SCHARLLET *ET AL*, 2000).

O teste de reflexo plantar é um teste de reflexo por natureza, mas é também uma medida de integração somatosensória e motora (DERYCK *ET AL*,

1989), sendo que uma deficiência motora pode afetar uma habilidade reflexora que não estaria afetada.

Embora, o teste de barra de equilíbrio possa ser influenciado por alterações no peso dos animais, uso de patas traseiras como apoio e motivação para ficar dependurado (FUJIMOTO *ET AL*, 2004), não encontramos prejuízos de tais vieses em nossos ensaios que provocasse alteração de resposta entre os grupos, contudo, notamos que aumento do peso durante o primeiro mês de tratamento causou redução no tempo em que os animais permaneciam dependurados em ambos os grupos.

Já os testes que avaliam a função vestibulomotora são desenhados para elucidar a coordenação motora fina, equilíbrio, coordenação e marcha. Testes vestibulomotores são tipicamente mais complexos que simples testes de força e reflexo, mas permitem uma sensibilidade maior na detecção de déficit motores finos (FUJIMOTO *ET AL*, 2004). Esses testes requerem treinamento, entretanto, se uma tarefa envolve aprendizado e motivação, o teste não serve por muito tempo como um teste puramente motor. Isto dificulta determinar se a melhora em certa tarefa é devido ao aumento da função motora ou aumento da motivação. A melhora no estímulo pode ser mascarada pelo déficit motor e o aproveitamento motor pode ser disfarçado pelo déficit atencional, como encontrado no exame de viga de equilíbrio em nossos ensaios, em que os animais suplementados com vitamina D3 possuíram uma resposta menor a partir do mês seis em função de uma baixa motivação e não por sua incapacidade motora ou incoordenação.

Um outro ponto a discutir, é que o aproveitamento ou déficit da tarefa motora não pode ser atribuído a uma única área do cérebro numa injúria difusa e o aproveitamento pode também ser devido à regeneração ou neuroproteção das

áreas injuriadas ou por compensação das áreas não injuriadas (FUJIMOTO *ET AL*, 2004), seja esta melhorada por tratamento farmacológico ou espontaneamente.

Desde que os animais não são verbais, a cognição deve ser medida indiretamente através da execução completa de certas tarefas comportamentais, incluindo especificamente labirintos e caixas. A habilidade de explorar e completar um labirinto requer habilidade de criar e armazenar um mapa cognitivo. (FUJIMOTO *ET AL*, 2004). Por isso, animais com memória funcional tendem a evitar áreas que eles já haviam explorado e exploram novas áreas para alcançar o fim do labirinto, motivados, por exemplo, com ração.

Entretanto, esses testes podem ser confundidos por déficits motores e motivação atencional (FUJIMOTO *ET AL*, 2004) ou ainda por hiperatividade, fatos estes observados em nosso trabalho.

Ademais, a literatura aponta que animais pós-oclusão carotídea teriam sua atividade locomotora aumentada (HUNTER, 2000), e este aumento parece refletir um déficit no hábito ou mapeamento espacial mais que função sensoriomotora por si (HUNTER *ET AL*, 1995). Além disso, no mesmo estudo, o nível de atividade espontânea foi significativamente reduzido em ratos sham operados quando comparados ao controle não operado, indicando que esses animais seriam mais calmos que os ratos não operados quando colocados em um novo ambiente (HUNTER *ET AL*, 1995). Esses achados vão ao encontro dos nossos resultados quanto ao retardo na resposta para saída do labirinto de ratos tratados, por serem estes, manipulados por mais tempo e assim, tornarem-se mais dóceis, enquanto os animais do grupo controle apresentavam uma hiperatividade que pode ter influenciado na resposta acelerada ao reflexo térmico e curto tempo de percurso do labirinto.

Embora seja importante examinar o comportamento em diferentes pontos de tempo durante a recuperação pós-injúria, testes múltiplos podem ocultar déficits e a recuperação verdadeira e freqüentemente refletem um comportamento primariamente compensatório, como estratégia usada pelo animal para alcançar sucesso na tarefa a ser executada (JONES *ET AL*, 1998, 1999; SCHALLERT *ET AL*, 1993). Com isso, percebemos que apesar de alguns testes refletirem uma piora na resposta do grupo tratado, nem sempre isso se reproduz em sinal de comprometimento neurológico em resposta ao tratamento e sim, resposta adaptativa dos animais. Por outro lado, vimos que os animais do grupo controle, ainda que tivessem estaticamente melhor resposta à maioria dos testes neurológicos, a severidade das lesões pareciam ser de maior gravidade, uma vez que os animais desse grupo morreram brevemente após as injúrias, enquanto o grupo suplementado com colecalciferol viveu por mais tempo, possivelmente em consequência de recuperações após os AITs.

Adicionalmente, embora tenhamos objetivado identificar aumento da expectativa de vida dos animais com o uso de colecalciferol, tal fato não foi estatisticamente significativo, apesar da curva de sobrevivência ter apontado para maior sobrevida nos animais tratados. Em concordância com a literatura, nossos ensaios demonstram que os animais SHRSP possuem elevada pressão arterial sistólica e curta expectativa de vida (HIGASHINO & SUZUKI, 1995). Em contrapartida, verificamos que a qualidade de vida dos animais tratados com colecalciferol foi melhor que a de animais controle, demonstrada pela redução do número de AITs e alterações neurológicas motoras.

7. CONCLUSÃO

- Esse trabalho confirma o efeito hipotensor do colecalciferol com $12,5\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ e estabelece como mecanismo de ação a redução dos níveis plasmáticos de aldosterona.
- A aparente redução tanto da resposta cognitiva quanto dos testes sensoriomotores parece estar associada a um processo de adaptação e não ao comprometimento neurológico.
- A suplementação com colecalciferol devido à pequena amostra, não teve influência significativa sobre a expectativa de vida dos animais.
- O tratamento contribuiu para a menor severidade dos AITs.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-DONIA, M.B.; DECHKOVSKAIA, A.M.; GOLDSTEIN, L.B. *et al.* Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.72, p.881-890. 2002.

AKIRA, K.; IMACHI, M. HASHIMOTO, T. Investigation into biochemical changes of genetic hypertensive rats using ¹H nuclear magnetic resonance based metabonomics. **Hypertens Rev.** v. 28, n. 5, p. 425-430. 2005.

BAUMBACH, GL; HEISTAD, DD. Cerebral circulation in chronic arterial hypertension. **Hypertension.** v. 12, n. 2, p. 89-95. 1988.

BREWER, L.D.; THIBAUT, V.; CHEN, K.C. *et al.* Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 98-108. 2001.

BROWN, W.V. Metabolic syndrome and risk of stroke. **Clin Cornerstone**, v.6, Suppl. 3, p. S30-34, 2004.

BROWN, A.J.; DUSSO, A.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. *Am J Physiol*, v. 277, p. F157-175. 1999.

BURNE, T.H.J.; McGRATH, J.J.; EYLES, D.W. *et al.* Behavioural characterization of Vitamin D receptor knockout mice. **Behavioural Brain Res.** v. 157, p. 299-308. 2005.

CANTORNA, M.T.; HAYES, C.E.; DeLUCA, H.F. 1,25 dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 93, p. 7861-7864. 1996.

CANTORNA M.T. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? **P.S.E.B.M.** v. 223, p.230-233. 2000.

CHAUDHURI, A. Why should after routine vitamin D supplementation in pregnancy and childhood to prevent multiple sclerosis. **Med Hypotheses.** v. 64, p. 608-618. 2005.

CHOI-LUNBERG, D.L.; LIN, Q.; SCHALLERT, T. *et al.* Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by n adenoviral vector encoding glial cell line-derived neurotrophic factor. **Experimental Neurology.** v. 154, p. 261-275. 1998.

De PÁDUA, M.A.; FÁTIMA, M.S. Stroke and ischemic heart disease mortality trends in Brazil from 1979 to 1996. **Neuroepidemiology**, v. 22, n. 3, p. 179-183, 2003.

DeRYCKY, M.; VANREEMPTS J.; BORGES M. et al. Photochemical stroke model-flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. **Stroke**. v. 20, n. 10, p. 1383-1390. 1989.

De SOUZA SANTOS,R.; VIANNA, L.M. Effect of cholecalciferol supplementation on blood glucose in experimental model of type 2 diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats. **Clin Chim Acta.**, v.358, n.1-2, p. 146-150. 2005.

DICKINSON , C.J. Why are strokes related to hypertension? **J Hyperten**, v. 19, p.1515-1521. 2001.

DZAU, V.J. circulating versus local rennin-angiotensin system in cardiovascular stasis. **Circulation**. v. 77, n. 19, suppl. 1, p. 4-13. 1988.

EPSTEIN, M. Aldosterone as a mediator of progressive renal dysfunction: evolving perspectives. **Inter Med**. v. 40, p. 573-583. 2001.

FARACI, F.M.; BAUMBACH, G.L.; HEISTAD, D.D. Cerebral Circulation: Humoral Regulation and Effects of Chronic hypertension. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.1, n.1, p.53-57. 1990.

FÉRON, F.; BURNE, T.H.J.; BROWN, J. *et al.* Developmental vitamin D3 deficiency alters the adults rat brain. **Brain Res Bull.** v. 65, p. 141-148. 2005.

FOSTER, R.H.; MacFARLANE, C.H. BUSTAMANTE, M.O. Recent progress in understanding aldosterone secretion. **Gen Pharmacol.** v. 28, p. 647-651. 1997.

FUJIMOTO, S.T; LONGHI, L.; SAATMAN, K.E *et al.* Motor and function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 365-378, 2004.

FUJIMATSU, Y. Role of the parathyroid gland on bone mass and metabolism in immobilized patients. **Kureme Med J**, v. 45, n. 3, p. 265-270. 1998.

GARCION, E.; NAFAT, S.; BEROD, A. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. **Mol Brain Res**, v. 45, p. 255-267. 1997.

GILES, M.F.; FLOSSMAN, E.; ROTHWELL, P.M. Patient Behavior Immediately After Transient Ischemic Attack According to Clinical Characteristics, Perception of the Event, and Predicted Risk of Stroke. **Stroke**, v.37, p.1254-1260. 2006.

GILES, T.D. Should we redefine hypertension? **Curr cardiol Rep.** v. 8, n. 6, p. 395-398. 2006.

GRANT, W.B. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency.

Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 92, p. 67-79, 2006.

GUERRINI, U.; SIRONI, L. New insights into brain damage in stroke-prone rats – a NUCLEAR magnetic imaging study. **Stroke**. v. 33, p. 825-30. 2001.

HALLETT, M. Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke.

Brain Research Reviews, v.36, p.169-174. 2001.

HANDOKO, H.Y.; NANCARROW, D.J; MOWRY, B.J. Polymorphisms in vitamin D receptor and their associations with risk of schizophrenia and selected anthropometric measures. **Am J Hum Biol**. v. 18, n. 3, p. 415- 417. 2006.

HIGASHINO, H.; SUZUKI, A. Upper shift on the set point in the thermocenter causes hyperthermia in SHRSP. **Acta Med Kinki Uni**, v. 20, p.279-289. 1995.

HORIUCHI, M.; NISHIYAMA, H.; HAMA, J. et al. Characterization of renal aldosterone receptors in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol*. v. 264, F286-291. 1993.

HUNTER, A.J.; CROSS, A.J.; GREEN A.R. Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? **TIPS**. v. 16, p. 123-128. 1995.

HUNTER, A.J. Functional assessments in mice and rats after focal stroke.

Neuropharmacology, v. 39, p. 806-816, 2000.

IADECOLA, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. **Nat rev Neuosci**,. V. 5, p. 347-360, 2004.

KALUEFF, A.V.; LOU, Y.R.; LAAKSI, I. *et al.* Increased anxiety in mice lacking vitamin D receptor gene. **Neuroreport**. v. 15, p. 1271-1274. 2004.

KATO, N. Genetic analysis in human hypertension. **Hypertension Res**. v. 25, p. 319-327. 2002.

KAWAMATA, T.; DIETRICH, W.D.; SCHALLERT, T. *et al.* Intracisternal basic fibroblast growth factor enhances functional recovery and up-regulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction. **Proceeding of the National Academy of Sciences**. v. 34, p. 8179-8184. 1997.

KIRALY, S.J.; KIRLY, M.A.; HAWES, R.D. *et al.* Vitamin D as a neuroactive substance: review. **ScientificWorldJournal**. V. 6, p. 125-139. 2006.

KONG, J.; LI, C.Y Effect of ANG II type I receptor antagonist and ACE inhibitor on vitamin D receptor-null mice. **Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol**. v. 285, p. 255-261. 2003.

KUNO, H. Vitamin D status and nonhemiplegic bone mass in patients following stroke. **Kurume Med J.** v. 45, n. 3, p. 257-263. 1998.

JONES, T.A., HAWRYLICK, N.; KLINTSOVA, A.Y. et al. Brain damage, behavior, rehabilitation, recovery, and brain plasticity. **Mental retardation and Developmental Disabilities Research Reviews.** v. 4, p. 231-237. 1998.

JONES, T.A.; CHU, C.J.; GRANDE, L.A. et al. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. **J Neurosci.** v. 19, p. 10153-10163. 1999.

LI, Y.C. Vitamin regulation of the rennin-angiotensin system. **J Cell Biochem.** v. 88, p. 327-331. 2003.

LI, Y.C.; KONG, J.; WEI, M. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **J Clin Invest,** v. 110, n. 2, p. 229-238, 2002.

LI, Y.C.; QIAO, G.; USKOKOVIC, M. et al. Vitamin D a negative regulator of renin-angiotensin system and blood pressure. **J Ster Biochem Mol Biol,** v. 89-90, p. 387-392. 2004.

LIU, Y.; KIM, D.; HIMES, B.T. et al. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. **Journal of Neuroscience**. v. 19, p. 4370-4387. 1999.

LOSEM-HEINRICHS, E;GORG, B.; REDECKER, C. *et al.* A combined treatment with $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D3 and 17β -estradiol reduces the expression of heat shock protein-32 (HSP-32) following cerebral cortical ischemia. **J Steroid Biochem Mol**, v. 89, p. 371-974. 2004.

LYNCH, J.K.; NELSON, K.B. Epidemiology of perinatal stroke. **Curr Opin Pediatric**, v. 13, n. 6, p. 499-505, 2001.

MANSINENI, S.N; PRAVEEN N.C.; GAGAN, D. *et al.* Male gender and not the severity of hypertension is associated with end-organdamage in aged stroke-prone spontaneously rats. **Am J Hyperten**. v. 18, n. 6, p. 878-884. 2005.

MARK, K.S.; DAVIS, T.P. Stroke: development, prevention and treatment with peptidase inhibitors. **Peptides**, v.21, p. 1965-1973, 2000.

MARK, B.L; CARSON, J.A.S. Vitamin D and autoimmune disease- implications for practice from the multiple sclerosis literature. **J Am Diet Assoc**. v. 106, p. 418-424. 2006.

McGILL, J.K.; GALLAGHER, L.; CARSWELL, H.V.O. *et al.* Impaired Functional Recovery After Stroke in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat. **Stroke**, v.36, p.135-141. 2005

McGRATH, J.J.; SAHA, S. LIEBERMAN, D.E. *et al.* Season of birth is associated with anthropometric and neurocognitive outcomes during infancy and childhood in general population birth cohort. **Schizophr Res**. v. 81, n. 1, p. 91-100. 2006.

MUNGER, K.L.; ZHANG, S.M.; O'REILLY, F. *et al.* Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. **Neurology**. v. 62, p. 60-65. 2004)

MUNGER, K.L., LEVIN, L.I.; HOLLIS, B.W. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. **JAMA**. v. 296, n. 23, p. 2832-2838. 2006.

NORMAN, A. W. Receptors for $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: past, present, and future. **JBMR**. v. 13, n.9, p.1360-65. 1998.

OKAMOTO, K.; YAMORI, Y.; NAGAOKA, A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). **Cir Res**. v. 34-35, suppl. 31, p. 143-143. 1974

PIEADADE, P.R.; GAGLIARDI, R.J.; DAMIANI, I.T. *et al.* Papel da curva de agregação plaquetária no controle da antiagregação na prevenção secundária do acidente vascular cerebral isquêmico. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 31, n. 3B, p. 764-767, 2003.

ROJAS, J.I.; ZURRU, M.C.; PATRUCCO, L. *et al.* Ischemic stroke registry.

Medicina (B Aires), v. 66, n. 6, p. 547-551, 2006.

ROTHWELL, P.P. *et al.* Resents advances in management of ischaemic attacks and minor attacks. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 4, p. 323-331, 2006.

RUDIJANTO, A. Hypertension: diagnostic problem, challenge and dilemmas. **Acta Med Indones**, v. 38, n.4, p.217-223.2006.

SANTOS, R. de S.; VIEIRA DA COSTA, V.A.; VIANNA, L.M. Cholecalciferol treatment changes urinary sodium-potassium ratio and plasma aldosterone of spontaneously hypertensive rats. **Clin Chim Acta**. v. 376, n. 1-2, p.353-354. 2007.

SATO, Y.; ASOH, T.; KONDO, I. *et al.* Vitamin D deficiency and risk of fractures among disabled elderly stroke patients. **Stroke**. v. 32, p. 1673-1677. 2001.

SATO, Y.; MARUOKA, H.; OIZUMIN, K. Amelioration of hemiplegia-associated osteopenia more than 4 years after stroke by 1..-hydroxyvitamin D3 and calcium supplementation. **Stroke**. v. 28, p. 736-739. 1997.

SATO, Y.; MARUOKA, H.; OIZUMIN, K. *et al.* Vitamin D deficiency and osteopenia in the hemiplegic limbs of stroke patients. **Stroke**. v. 27, p. 183-187.1996.

SAUERBECK, R.L. Primary stroke prevention. **AJN**, v.16, n. 11. 2006.

SERNA, C.D.; MORENO PEREZ, O.; MOLTO, J.J.M. Evidence for treating hypertension in stroke prevention. **Med Clin (Barc)**, v. 127, n. 16, p. 626-633, 2006.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S.M.; LEASURE, J.L. *et al.* CSN plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v.39, p.777-787. 2000.

SCHALLERT, T.; JONES, T.A. " Exuberant" neuronal growth after brain damage in adult rats: the essential rote of behavioral experience. **Journal of Neural Transplantation and Plasticity**. v. 4, p. 193-198. 1993.

SPACH, K.M.; PEDERSEN, L.B.; NASHOLD, F.E. *et al.* Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. **Physiol Genomics**. v. 18, p. 141-151. 2004.

TAKEDA, Y. YONEDA, T.; DEMURA, M. Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, p. 495-500. 2000.

TAKEDA, Y. Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension. **Moll Cell Endocrinol**. v. 217, p. 75-79. 2004.

TAKEDA, Y. Role of cardiovascular aldosterone in hypertension. **Curr Med Chem. Cardiovasc Hematol Agents**. v. 3, n. 3, p. 261-266. 2005.

TOESCU, E.C. Apoptosis and cell death in neuronal cells: where does Ca⁺⁺ fit in? **Cell Cal.** V. 24, n. 5/6, p. 387-403. 1998.

VAN AMERONGEN, B.M.; DIJHSTRA, C.D.; LIPS, P. *et al.* Multiple sclerosis and vitamin D: An update. **Eur J Clin Nutr.** V. 58, p. 1095-1109. 2004.

VEENSTRA, T.D.; PRUFER, K.; KOENIGSBERGER, C. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the central nervous system of the rat embryo. **Brain Res.** v. 804, p. 193-205. 1998.

VEENSTRA, T.D.; LONDOWSKI, J.L.; BRIMIJOIN, S. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of neuroblastoma cells by increasing the expression of nerve growth factor. **Dev. Brain Res.** v. 99, p. 53-60. 1997.

VIANNA, L.M. Efeito da administração crônica de vitamina D₃ em ratos espontaneamente hipertensos. 1992. 107p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal do Estado de São Paulo, São Paulo.

VIANNA, L.M.; BORGES, A.CR.; FERES, T.; PAIVA, T.B P. Effect of cholecalciferol treatment on the relaxant responses of spontaneously hypertensive rat arteries to acetylcholine. **Hypertension.** v. 34, n. 4, p. 897-901. 1999.

VIANNA, L.M; BORGES, A.CR.; FERES, T.; PAIVA, T.B. Cholecalciferol treatment restores the relaxant responses of SHR arteries to bradykinin. **Pathophysiology. Irlanda.** v. 8, n. 4, p. 263-268. 2002.

VIANNA, L.M. A influencia das vitaminas lipossolúveis na composição dos fosfolípidios de membrana e sua repercussão fisiológica. **Rev .Nutrição Bras.** v. 3, p. 161-164, set. 2002.

WANG, Y.; LIN, S.Z.; CHIOU, A.L. *et al.* Glial Cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex. **J Neurosci.** v. 17, n. 11, p. 4341-4348. 1997.

WANG Y *et al.* Vitamin D3 attenuates cortical infarction by middle cerebral arterial ligation in rats. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 873-880, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report: 2002: Reducing risks, promoting healthy life. **World Health Organization.**2002.

WU, Z.; NAKURA, J.; ABE, M. *et al.* Genome-wide linkage disequilibrium mapping of hypertension in Japan. **Hypertension Res.** v. 26, p.533-540. 2003.