

Natália Baraldi Cunha

**NEFROCALCINOSE INDUZIDA PELA HIPEROXALÚRIA:  
Modelo Experimental em Ratos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. João Luiz Amaro  
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano**

Botucatu  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Cunha, Natália Baraldi.

Nefrocalcinose induzida pela hiperoxalúria : modelo experimental em ratos /  
Natália Baraldi Cunha. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina de Botucatu

Orientador: João Luiz Amaro

Coorientador: Paulo Roberto Kawano

Capes: 40102009

1. Rins - Cálculos. 2. Aparelho urinário – Doenças - Cálculos. 3. Rato –  
Estudos experimentais. 4. Calcificação. 5. Vitamina D.

Palavras-chave: Etilenoglicol; Hidroxi-L-Prolina; Hiperoxalúria; Litíase  
urinária; Nefrocalcinose; Oxalato de cálcio; Ratos.

*Dedicatória*



Aos meus pais, *Gilberto e Luci*, pessoas que apoiam e incentivam cada passo de minha caminhada incondicionalmente. Meus pilares e exemplos de vida. Estão presentes em todos os momentos e construção da minha vida, sendo minha inspiração e energia para seguir.

À minha irmã, *Andréa*, que tem uma presença iluminada em minha vida e é um exemplo de força e garra para mim.

Ao meu namorado, *Pedro*, amigo e companheiro de todas as horas. Tranquilidade de minha vida, pelo apoio, confiança, cumplicidade e imensa felicidade vivida ao seu lado.

À minha família: minha avó *Alzira*, meu avô *Tide*, meus tios e tias e primos, tão presentes em minha formação pessoal, que também são minha força e meus grandes amores.

Ao vô *Tino* e à vó *Lourdes*, que não estão mais presentes ao meu lado fisicamente, mas muito intensos em meu coração e causando muita saudade, pelo inexplicável amor vivido aos seus lados.

Obrigada por tudo.

*Amo todos vocês!*

---

*Agradecimentos Especiais*



Em primeiro lugar, a *Deus*, pela força e perseverança na vida, por sempre me mostrar os melhores caminhos, mesmo que com dificuldades em alguns momentos, e por ter colocado as melhores pessoas nele.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. João Luiz Amaro*, grande mestre, que sempre regido de muita experiência e sabedoria me proporcionou grandes ensinamentos. Ao tempo disponibilizado à minha produção, para que ela pudesse sempre se tornar melhor. Pela confiança, ajuda nas decisões fáceis e difíceis, paciência, disponibilidade e dedicação.

Ao *Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano*, pela imensurável ajuda na realização deste trabalho, orientação, tempo disponibilizado, sempre de forma gentil e generosa, me apoiando e incentivando sempre.

À minha amiga e companheira de pós graduação *Patricia*, que desde a minha iniciação científica se mostrou aberta e disposta a ajudar. Pelo apoio pessoal e científico, sempre me mostrando os melhores caminhos pela sua experiência e humildade.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Urologia *Lucas, Lindalva e Mara* que tanto me ajudaram na parte prática deste trabalho. Em especial ao *Lucas*, peça essencial no desenvolvimento deste projeto, que me fez companhia em todos os finais de semana e feriados, pela amizade, paciência e parceria.

À *Dra. Carmen Amaro*, sempre disposta a nos ensinar e a nos ajudar, com muita experiência, sabedoria, ensinamentos e dedicação.

---

## *Agradecimientos*



Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela atenção e colaboração sempre calorosa e prestativa na análise estatística deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima, pela atenção, disposição e ajuda na realização das análises histopatológicas, sempre de maneira tão gentil e generosa.

À Equipe do laboratório LAMFI (Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos), no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP), que me recebeu e acolheu tão bem no período de realização das minhas dosagens de Cálcio no Parênquima Renal, além da imprescindível ajuda de todos, sem exceção. Em especial à Suene Bernardes, pós graduanda do laboratório, pela paciência, amizade e generosidade, além da preciosa colaboração e ensinamento das técnicas; ao Prof. Dr. Manfredo Harri Tabacniks, por ter aberto as portas de seu laboratório e compartilhado de tecnologias tão essenciais ao desenvolvimento do meu projeto e da ciência.

À funcionária Saete do Laboratório de Análises Clínicas de Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, pela imensurável ajuda, dedicação e paciência nos ensinamentos da dosagem de oxalato e citrato, que só ela sabia.

À Prof. Dra. Regina Kiomi Takahira, responsável pelo Laboratório Clínico Veterinário, pela prontidão e ajuda nas dosagens de sangue e urina dos ratos.

Às minhas companheiras alunas de Iniciação Científica, Thaisa de Assis, Eloá Siqueira Magalhães e Thayse Montebello Tapias, pela amizade e preciosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Sem elas, este trabalho não teria ocorrido da mesma forma.

---

À enfermeira, *Isabel Cristina Capela* e à secretária do Serviço de Litotripsia, *Daniela Capela*, pela companhia e ajuda no dia a dia de ambulatórios e realização de trabalhos.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Medicina, da Pós-Graduação da Cirurgia e do Departamento de Urologia :

*Janete, Regina, Nathanael, Márcia, Andréa e Gláucia* pela competência, prontidão e gentileza com as quais realizam seus trabalhos e estão sempre nos atendendo e socorrendo.

Às colegas de pós-graduação, em especial a *Isabella Leme, Luciana Fioretto, Andréa e Daniela Polo*, pela amizade e pelos momentos compartilhados de angústias e conquistas.

À família *Naxincha*, pela amizade e apoio aqui em Botucatu.

Às minhas amigas e irmãs de Botucatu ou que já se mudaram daqui, tão importantes em minha vida pessoal e profissional, que sem elas, nada teria sido igual: *Nara Costa, Ana Eliza Tonon, Ana Carolina Bernardes, Monique Tralli, Débora Dalle, Estela Ribeiro, Ana Carla Pichutte, Natália Sá, Ana Carolina Martiniano, Flávia Soares, Natália Cleto, Carolina Mayumi, Carina Alcalá.*

Agradeço também, sinceramente, àqueles que acabei não citando nomes, mas que são importantes para mim e que, de algum modo, me ajudaram e torceram por mim.

*Muito obrigada!*

---

*Epigrafe*



"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... E a vida é muito para ser insignificante."

*Charles Chaplin*

---

## *Lista de Figuras*



<b>Figura 1</b>	Esquema ilustrando as fases de transformação da Vitamina D desde a natureza até sua forma ativa em nosso organismo.....	34
<b>Figura 2</b>	Diagrama demonstrando os diferentes momentos e parâmetros estudados em cada grupo.....	41
<b>Figura 3</b>	Ilustração da exérese do rim esquerdo para determinação da concentração de cálcio tecidual.....	43
<b>Figura 4</b>	Corte transversal do rim direito, dividindo-o em metade superior(A) e inferior (B).....	44
<b>Figura 5</b>	Ilustração do procedimento de coleta de urina por punção da bexiga.....	45
<b>Figura 6</b>	Ilustração da punção cardíaca para coleta de sangue.....	48
<b>Figura 7</b>	Ilustração do Programa <i>Image J</i> <sup>®</sup> versão 1.44 (NIH, Bethesda, USA), com grade de 100 pontos gerada sobre a lâmina.....	49
<b>Figura 8</b>	<b>(A)</b> Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando uma atrofia leve (L), com 2 focos por campo (setas). <b>(B)</b> Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando uma atrofia intensa (I), com mais de 3 focos por campo (setas).....	50
<b>Figura 9</b>	<b>(A)</b> Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando um extravasamento estromal intermediário (FD), com 2 focos por campo (setas). <b>(B)</b> Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando um extravasamento estromal difuso (D), com 5 focos por campo.....	50
<b>Figura 10</b>	Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando também um infiltrado inflamatório leve (L), com um exsudativo agudo de neutrófilos.....	51

---

<b>Figura 11</b>	Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando os túbulos com cristais no lúmen.....	52
<b>Figura 12</b>	Triturador de tecidos moles.....	53
<b>Figura 13</b>	Rim esquerdo seco e triturado.....	53
<b>Figura 14</b>	Adição de ácido nítrico na amostra para digestão.....	55
<b>Figura 15</b>	Dispositivo utilizado para determinação do Cálcio no parênquima renal: O acelerador de partículas (A) fica acoplado a câmara PIXE (B) e aos detectores de alta energia (C) e de baixa energia (D).....	57
<b>Figura 16</b>	<b>(A)</b> Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo I (Controle) no momento M2, aumento de 40 vezes, coloração H.E., demonstrando arquitetura renal preservada. <b>(B)</b> Visualização dos cristais no parênquima renal de um animal do grupo II (Etileno Glicol 0,5% + Vitamina D3), no aumento de 40 vezes, coloração H.E.....	65
<b>Figura 17</b>	<b>(A)</b> Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo I (Controle) demonstrando a arquitetura renal preservada; aumento 40 vezes, coloração pelo H.E. Na figura <b>(B)</b> , corte histológico do rim direito de um animal do Grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3), aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E, demonstrando a atrofia intensa das células.....	67
<b>Figura 18</b>	Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3), aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E, demonstrando a presença de extravasamento estromal, classificado como difuso (D).....	68
<b>Figura 19</b>	Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3), momento M2, aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E, demonstrando a presença de infiltrado inflamatório agudo leve.....	69

---

## *Lista de Tabelas*



---

<b>Tabela 1</b>	Média e desvio padrão da Ingestão alimentar, segundo grupo e momento de avaliação.....	60
<b>Tabela 2</b>	Média e desvio padrão da ingestão de Líquidos, segundo grupo e momento de avaliação.....	60
<b>Tabela 3</b>	Mediana e valores mínimos e máximos do Volume urinário, segundo grupo e momento de avaliação.....	61
<b>Tabela 4</b>	Mediana e valores mínimos e máximos do pH final, segundo grupo e momento de avaliação.....	62
<b>Tabela 5</b>	Mediana e valores mínimos e máximos de Citrato urinário, segundo grupo e momento de avaliação.....	62
<b>Tabela 6</b>	Mediana e valores mínimos e máximos de Ácido úrico na urina, segundo grupo e momento de avaliação.....	63
<b>Tabela 7</b>	Mediana e valores mínimos e máximos do Oxalato urinário, segundo grupo e momento de avaliação.....	63
<b>Tabela 8</b>	Mediana e valores mínimos e máximos de Cálcio Urinário, segundo grupo e momento de avaliação.....	64
<b>Tabela 9</b>	Mediana e valores mínimos e máximos da Creatinina sérica, segundo grupo e momento de avaliação.....	64
<b>Tabela 10</b>	Mediana e valores mínimos e máximos de cálcio no parênquima renal, segundo grupo e momento de avaliação..	70

---

## *Lista de Gráficas*



---

<b>Gráfico 1</b>	Valores médios e desvios-padrão do peso inicial, segundo grupo nos diferentes momentos (M1 e M2).....	59
<b>Gráfico 2</b>	Valores médios e desvios-padrão da ingestão de ração segundo grupo nos diferentes momentos ( M1 e M2).....	59
<b>Gráfico 3</b>	Valores de mediana de cristalização renal segundo grupo, no momento M2.....	65
<b>Gráfico 4</b>	Valores de mediana do número de cristais por túbulo renal, segundo grupo, no momento M1.....	66
<b>Gráfico 5</b>	Valores de mediana do número de cristais por túbulo renal, segundo grupo, no momento M2.....	66
<b>Gráfico 6</b>	Análise da dispersão da Calcificação do Túbulo Renal em relação a Nefrocalcinose.....	67

---

## *Lista de Abreviaturas*



---

<b>Ca</b>	Cálcio
<b>Ox</b>	Oxalato
<b>OxCa</b>	Oxalato de Cálcio
<b>FMB</b>	Faculdade de Medicina de Botucatu.
<b>CEMIB</b>	Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Unicamp
<b>g</b>	Grama
<b>HP</b>	Hiperoxalúria Primária
<b>GI</b>	Grupo I
<b>GII</b>	Grupo II
<b>GIII</b>	Grupo III
<b>GIV</b>	Grupo IV
<b>M1</b>	Momento 1
<b>M2</b>	Momento 2
<b>VU</b>	Volume Urinário
<b>LTU</b>	Litíase do Trato Urinário
<b>EG</b>	Etileno Glicol
<b>HLP</b>	Hidroxi-L-Prolina
<b>L</b>	Litro
<b>CEEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>mV</b>	Milivolt
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mm</b>	Milímetro
<b>PIXE</b>	Proton Induced X-Ray Emission (Técnica Espectroscópica)
<b>ml</b>	Mililitro
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido Nítrico
<b>Ga</b>	Gálio
<b>LAMFI</b>	Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos
<b>IFUSP</b>	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
<b>keV</b>	Mil elétrons-volt

---

<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>Unesp</b>	Universidade Estadual Paulista
<b>H.E.</b>	Hematoxilina e Eosina

*Resumo*



**INTRODUÇÃO:** A litíase urinária constitui a terceira causa mais comum de afecção do trato urinário sendo superada apenas pelas infecções urinárias e doenças da próstata. Na maioria das vezes, o oxalato de cálcio (OxCa) é o principal componente metabólico envolvido na litíase. Diferentes autores têm utilizado a hiperoxalúria para estudar a deposição de cristais de OxCa nos túbulos renais em ratos. Em algumas situações, litíase e nefrocalcinose podem coexistir, no entanto, os resultados de estudos em modelos de ratos indicam que a deposição renal de cristais de OxCa é caracterizado pela nefrocalcinose e está relacionado com a lesão, inflamação e regeneração celular. A ingestão de etilenoglicol (EG) ou hidroxil-L-prolina (HLP) em alimentos ou água produz hiperoxalúria crônica. Esta, por sua vez, associada a cristalúria por OxCa com eventual deposição no parênquima renal. O EG pode ser associado ou não a outros componentes como a vitamina D3 (Colecalciferol), potencializando a deposição de OxCa no rim. Os indutores da nefrocalcinose (EG e HLP) podem ser utilizados em diferentes concentrações e períodos causando variação na intensidade da calcificação no parênquima renal. Entretanto, não está até o momento elucidado nem o melhor agente e nem a melhor concentração a ser utilizada a fim de se obter um modelo estável não nefrotóxico para o estudo de cristalização de OxCa. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizados 40 ratos machos da raça Sprague-Dawley, distribuídos de maneira randomizada em quatro grupos: GRUPO I (Controle clínico, n=10); GRUPO II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3, n=10); GRUPO III (Etileno Glicol a 1,25%, n=10); GRUPO IV (Hidroxil-L-prolina a 5%, n=10). Após uma semana de seguimento (momento M1), cinco animais de cada grupo foram sacrificados, e os demais ao término

---

de 4 semanas (Momento M2). Em todos os animais foram realizados estudo metabólico (análise de cálcio, oxalato, ácido úrico e citrato urinários e creatinina sérica) análise histopatológica e de nefrocalcinose. **RESULTADOS:** No momento M1, o oxalato na urina de 24 horas foi significativamente menor no grupo GI em relação ao GII e GIII ( $p < 0,05$ ). No momento M2, o oxalato foi significativamente menor no grupo GI em relação ao GIII ( $p < 0,05$ ). Observamos uma nefrocalcinose significativamente maior no grupo GII em relação aos demais grupos no momento M2 ( $p < 0,01$ ) e calcificação no túbulo renal significativamente maior no grupo GII em comparação aos demais grupos nos diferentes momentos (M1 e M2) ( $p < 0,01$ ). A quantificação de Cálcio no parênquima renal também foi significativamente maior no Grupo II, nos diferentes momentos. **CONCLUSÃO:** O indutor Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3 foi o modelo ideal para indução de nefrocalcinose em ratos após 28 dias de seguimento.

**Palavras-chave:** hiperoxalúria, litíase urinária, nefrocalcinose, ratos.

---

*Abstract*



**INTRODUCTION:** Urinary lithiasis is the third most common cause of urinary tract disease only surpassed by urinary and prostate diseases. Most often, the calcium oxalate (CaOx) is the major metabolic component involved in lithiasis. Different authors have used hyperoxaluria to study deposition of crystals in renal tubules CaOx in rats. In some situations, lithiasis and nephrocalcinosis may coexist, however, the results of studies in rat models indicate that renal deposition of crystals is characterized by CaOx nephrocalcinosis and is associated with injury, inflammation, and cell regeneration. Ingestion of ethylene glycol (EG) or hydroxy-L-proline (HLP) in food or water produces chronic hyperoxaluria. This, in turn, associated with crystalluria CaOx for eventual deposition in the renal parenchyma. The EG can be with or without other components like Vitamin D3 (Cholecalciferol), increasing the deposition OxCa kidney. The induce nephrocalcinosis (EG and HLP) can be used in different concentrations and times causing variation in the intensity of calcification in renal parenchyma. However, it is not yet elucidated neither the best nor agent and the optimal concentration to be used in order to obtain a stable non-nephrotoxic model for studying crystallization CaOx. **MATERIALS AND METHODS:** A total of 40 male rats of Sprague-Dawley rats, selected randomly distributed into four groups: group I (Clinical control, n = 10), group II (Ethylene Glycol 0.5% + Vitamin D3, n = 10); GROUP III (Ethylene Glycol 1.25%, n = 10) GROUP IV (Hydroxy-L-proline 5%, n = 10). After a week of monitoring (when M1), five animals from each group were sacrificed, and the other at the end of 4 weeks (M2 Moment). All animals were performed metabolic study (analysis of calcium, oxalate, uric acid and citrate urinary and serum creatinine) and

---

histopathology of nephrocalcinosis. **RESULTS:** At M1, the oxalate in the urine of 24 hours was significantly lower in Group I compared with GII and GIII ( $p < 0.05$ ). The moment M2, oxalate was significantly lower in GI relative to GIII ( $p < 0.05$ ). Nephrocalcinosis observed a significantly higher in group GII compared to other groups in M2 ( $p < 0.01$ ) and calcification in the renal tubule significantly higher in group GII compared to the other groups at different moments (M1 and M2) ( $p < 0, 01$ ). Quantification of calcium in the renal parenchyma was also significantly higher in Group II, at different moments. **CONCLUSION:** The inductor Ethylene Glycol + 0.5% Vitamin D3 was the ideal model to induce nephrocalcinosis in rats after 28 days of follow up.

**Key Words:** hyperoxaluria, urinary lithiasis, nephrocalcinosis, rats.

---

## *Sumário*



---

<b>Lista de Figuras</b> .....	12
<b>Lista de Tabelas</b> .....	15
<b>Lista de Gráficos</b> .....	17
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	19
<b>Resumo</b> .....	22
<b>Abstract</b> .....	25
<b>Introdução</b> .....	30
<b>Objetivo</b> .....	36
<b>Materiais e Métodos</b> .....	38
1. Animais de experimentação.....	39
2. Grupos Experimentais.....	40
3. Anestesia e sedação.....	42
4. Sequência Experimental.....	42
5. Sacrifício.....	44
6. Exames Laboratoriais.....	45
6.1. Urina.....	45
6.2. Urina de 24h.....	46
6.3. Sangue.....	47
7. Quantificação histomorfométrica da nefrocalcinose.....	48
8. Quantificação do cálcio no parênquima renal.....	52
8.1. Preparação das amostras.....	52
8.2. Sistema PIXE (Proton Induced X-Ray Emission).....	56
9. Análise estatística.....	57
<b>Resultados</b> .....	58
1. Avaliação do ganho de peso e da ingestão de ração.....	59
2. Avaliação da ingestão líquida.....	60
3. Exames Laboratoriais.....	61
3.1. Urocultura.....	61
3.2. Avaliação dos parâmetros urinários.....	61
3.3. Avaliação dos parâmetros séricos.....	64
3.4. Avaliação histomorfométrica .....	65
3.5. Quantificação do cálcio no parênquima renal.....	69
<b>Discussão</b> .....	71
<b>Conclusão</b> .....	77
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	79
<b>Anexo</b> .....	87

---

# *Introdução*



A litíase do trato urinário (LTU) é uma doença conhecida pela humanidade há vários séculos e tem sido relatada na história a partir do registro de litíase vesical em múmias egípcias datados de 4800 anos A.C. (KITTRIGE & DOWNS, 1952). Constitui a terceira causa mais comum de afecção do trato urinário sendo superada apenas pelas infecções urinárias e doenças da próstata (TOSTES & CARDOSO, 2001). Sua taxa de mortalidade devido às complicações do tratamento intervencionista da LTU é baixa, porém, a recorrência frequentemente está associada a um índice elevado de morbidade, absenteísmo, assim como problemas sociais (HEILBERG et al., 2002).

O principal componente metabólico envolvido na litíase urinária, na maioria das vezes, é o oxalato de cálcio (OxCa) (COE et al., 2005). Em nossa área observamos uma incidência de hiperocalciúria idiopática em 73% dos pacientes (AMARO et al., 2005). Cerca de dois terços destes cálculos apresentam Oxalato (Ox) em sua composição e quase metade é constituída exclusivamente por este composto, podendo ser decorrente de fatores genéticos (hiperoxalúria primária) ou ambientais (hiperoxalúria secundária).

A hiperocalciúria de origem entérica pode ser decorrente a doenças gastrointestinais como ressecção do íleo, doença de Crohn ou cirurgia bariátrica. Nestes casos, ocorre uma alteração da microbiota intestinal com diminuição da bactéria *Oxalobacter formigenes* que é responsável pela degradação do oxalato provindo da dieta (HATCH, 1993; ASPLIN, 2002; DUNCAN et al., 2002). A hiperocalciúria favorece a formação e a deposição renal do complexo OxCa podendo, assim, ocasionar patologias como urolitíase, nefrocalcinose, acidose metabólica e insuficiência renal.

---

A hiperoxalúria é responsável por cerca de 4,5% dos casos de nefrocalcinose. Na hiperoxalúria primária (HP), a produção endógena de Oxalato (Ox) está aumentada cerca de 20 vezes do normal, podendo ocasionar a deposição de Cálcio (Ca) em vários órgãos entre os quais o rim (SERRA & CORREIA, 2004).

Em algumas situações, litíase e nefrocalcinose podem coexistir; este fato pode ocorrer mais frequentemente na HP, hiperparatireoidismo primário e acidose tubular renal (ATR) (SERRA & CORREIA, 2004). Na HP pode ocorrer deposição de cristais no lúmen dos sistemas coletores como ureteres e bexiga ou, ainda, a deposição de sais de cálcio radiologicamente demonstrável no parênquima renal.

A nefrocalcinose pode ser dividida em duas categorias: intratubular ou intersticial. Os cálculos renais desenvolvem-se nos cálices e na pelve (EVAN, 2010). Estudos recentes utilizando modelos em ratos indicam que a deposição renal de cristais de OxCa ocorre principalmente na região intratubular podendo estar relacionado com o processo de lesão, inflamação e regeneração celular (KHAN, 2010; TOBLLI et al., 2002; TOBLLI et al., 2002).

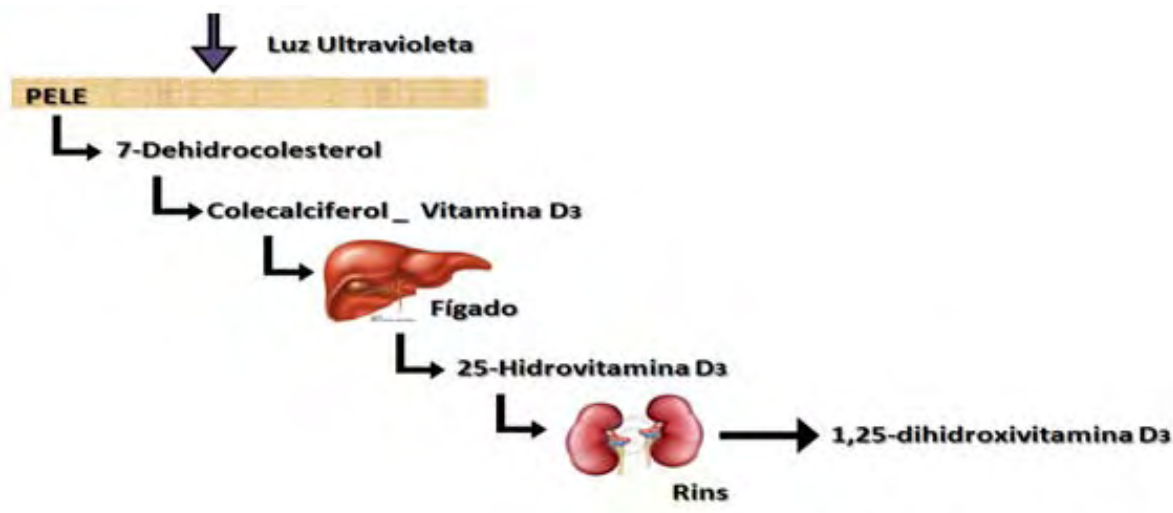
Vários animais como camundongos, coelhos, ratos e suínos têm sido usados em estudos experimentais da litíase renal, entretanto, os ratos e camundongos são os mais comumente utilizados (KHAN, 2010; KHAN, 1997; MANDEL et al., 2004). Esses modelos têm contribuído significativamente para a compreensão dos mecanismos envolvidos na nefrolitíase por OxCa e também permitem avaliar a eficácia de diversas terapias (KHAN & GLENTON, 2010).

---

A hiperoxalúria pode ser provocada em ratos pela administração de agentes indutores. A administração intraperitoneal do oxalato de sódio pode levar a uma rápida deposição de cristais no parênquima renal (KHAN et al., 2008). Por outro lado, a ingestão de etilenoglicol (EG) ou hidroxil-L-prolina (HLP) em alimentos ou água produz hiperoxalúria crônica (KHAN et al., 2006). Esta, por sua vez, quando associada à cristalúria por OxCa pode resultar na deposição desses cristais no parênquima renal.

O EG pode ainda ser associado a outras medicações como cloreto de amônio ou vitamina D3 (Colecalciferol). Esta associação visa a potencializar a deposição de OxCa no parênquima renal (KHAN, 1995; WATER et al., 1996). Esta vitamina é importante no metabolismo do Cálcio (Ca) sendo inicialmente hidroxilada a 25 (OH) D3 no fígado pela ação da enzima 25-hidroxilase. Após este processo, liga-se à transcalfiferina, uma proteína transportadora que tem alta afinidade e especificidade por este metabólito. A seguir, no túbulo contornado proximal do rim sofre uma segunda hidroxilação pela ação da enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase transformando-se na forma ativa da vitamina D3 (1,25 diidroxicolecalciferol) (Figura 1) (BOURDEAU & ATTIE, 1994; TURNBERG & RILEY, 1993; KARBACH, 1994; CANNIGIA et al., 1987). Este metabólito vai agir no intestino delgado sobre o nível do enterócito facilitando a penetração e a deposição de Ca no parênquima renal (GRÜDTNER et al., 1997). Apesar dos inúmeros estudos e dos diferentes modelos utilizados até o momento, ainda não existe consenso na literatura sobre a necessidade de se utilizar agentes potencializadores associados aos indutores da nefrocalcinose.

---



**Figura 1.** Esquema ilustrando as fases de transformação da Vitamina D a partir da natureza até sua forma ativa no organismo humano.

A hiperocalúria e a deposição de cristais estão associadas com peroxidação lipídica e dano ao epitélio renal (HUANG et al., 2002; KHAN et al., 1989) devido à produção de macromoléculas (ASSELMAN et al., 2003; FAN et al., 1998). Na literatura, não está totalmente elucidado se o EG *de per se* ou seus metabólitos causam lesão no epitélio renal (POLDELSKI, 2001). A dose mais frequentemente utilizada em estudos de EG para imitar a formação de cálculos urinários em humanos é de 0,75% (PATEL et al., 2012), entretanto, estudos relatam que o consumo desta droga em concentrações igual ou acima de 0,75% podem ocasionar lesões de múltiplos órgãos (ROBINSON et al., 1990; EDER et al., 1998; GREEN et al., 2005).

Devido as várias críticas e restrições ao modelo utilizando EG, alguns autores têm preconizado administração oral da hidroxil-L-prolina (HLP) que é um precursor fisiológico do Ox (KHAN et al., 2006). A HLP é um derivado do aminoácido prolina e um dos componentes do colágeno sendo, dessa forma,

um ingrediente comum a muitas dietas ocidentais. Seguindo este raciocínio, *Khan e colaboradores* conseguiram induzir a hiperoxalúria em ratos utilizando HLP a 5,2% durante dez dias, entretanto, este modelo não resultou em nefrolitíase (KHAN et al., 1989). Posteriormente, outros estudos avaliando a HLP em duas diferentes concentrações (3% ou 5%) administradas por 18 semanas em ratos geneticamente hipercalcúricos (GH) conseguiram produzir depósitos de cristais de OxCa no trato urinário desses animais (BUSHINSKY et al., 2002). Dessa forma, tanto o EG como HLP podem ser utilizados como indutores de nefrocalcinose em diferentes concentrações por períodos de tempo variáveis resultando em diferentes graus de calcificação do parênquima renal e tornando seus resultados bastante variáveis.

Diante desses resultados apresentados na literatura até o presente momento não foi ainda possível elucidar nem qual o melhor agente indutor de hiperoxalúria, tampouco a concentração ideal a ser utilizada a fim de se obter um modelo ideal não nefrotóxico para o estudo da nefrocalcinose.

---

*Objetiva*



O objetivo do presente trabalho foi avaliar a intensidade da nefrocalcinose provocada por dois diferentes agentes indutores.

---

# *Materiais e Métodos*



## 1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 40 ratos adultos machos da raça Sprague-Dawley, com peso entre 200 e 300 gramas, fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Com uma semana de antecedência ao início do experimento, os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu em gaiolas metabólicas individuais com 29 x 29 x 55 centímetros para adaptação ao novo ambiente e detecção de possíveis problemas clínicos. A temperatura foi mantida em torno de 20°C com iluminação natural. Os animais tiveram livre acesso à água e ração específica para ratos (fabricado pela *Presence ratos e camundongos*<sup>®</sup>, peso líquido 20 kg) com monitorização regular da ingesta.

De acordo com as normas de ética em pesquisa animal, este trabalho foi previamente submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Instituição (Protocolo CEEA 880-2011).

---

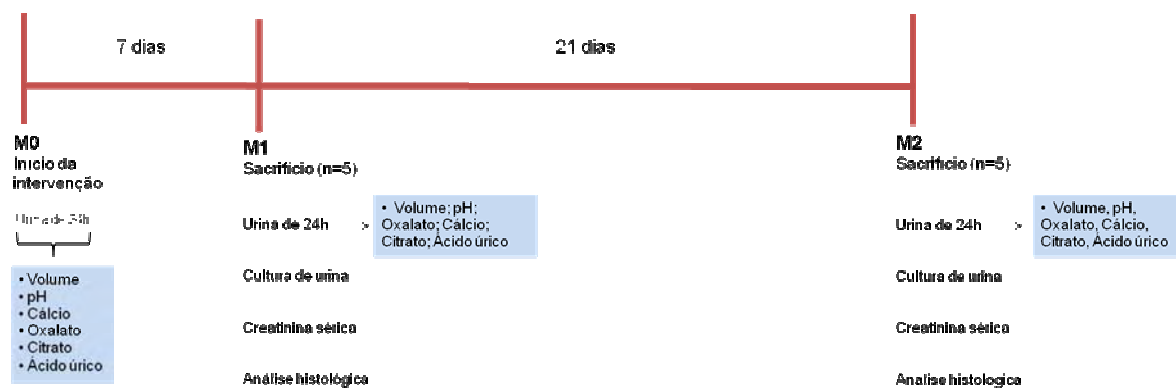
## 2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 40 animais utilizados foram distribuídos de maneira randomizada em quatro grupos assim constituídos:

- a. GRUPO I (n=10, Controle clínico): neste grupo, os animais não foram submetidos a nenhuma intervenção sendo, portanto, utilizados como controle clínico.
  - b. GRUPO II (n=10, Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3): os animais receberam Etileno Glicol a 0,5% (Fabricado pela SIGMA ALDRICH®) diluído em água, *ad libitum*. Objetivando a potencialização do agente indutor, a Vitamina D3 (Colecalciferol – Manipulada pela Farmácia Cruz Vermelha® Fórmulas e Cosméticos) na dose de 0,5 µM foi dissolvida em 1 ml de óleo e administrada via gavagem uma vez ao dia.
  - c. GRUPO III (n=10, Etileno Glicol a 1,25%): Neste grupo, o Etileno Glicol a 1,25% (Fabricado pela SIGMA ALDRICH®) foi diluído em água e oferecido “*ad libitum*” aos animais.
  - d. GRUPO IV (n=10, Hidroxi-L-prolina a 5%): neste grupo, a Hidroxi-L-prolina a 5% (Fabricado pela SIGMA ALDRICH®) foi diluída em água e administrado *ad libitum* aos animais.
-

O experimento foi dividido em três períodos. Momento M0: considerado imediatamente após o período de adaptação dos animais, a partir do qual teve início a execução da metodologia proposta; momento M1: decorrida uma semana (sete dias), cinco animais de cada grupo foram sacrificados para estudo dos diferentes parâmetros; momento M2: o restante dos animais (cinco animais por grupo) foi submetido à eutanásia ao término de quatro semanas (28 dias) de intervenção sendo realizados os mesmos procedimentos de coleta de material.

A seguir, serão descritos detalhadamente os diferentes parâmetros estudados, em cada grupo.



**Figura 2.** Diagrama demonstrando os diferentes momentos e parâmetros estudados em cada grupo.

### 3. ANESTESIA E SEDAÇÃO

Antes de cada sacrifício (momentos M1 e M2) os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (solução de pentobarbital sódico a 3% produzido pela Cristália<sup>®</sup>) na dose de 0,1 ml/100g de peso do rato, administrado por via intraperitoneal. Caso necessário, uma segunda aplicação utilizando-se metade da dose inicialmente calculada era novamente administrada.

### 4. SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Imediatamente antes do sacrifício (momentos M1 e M2), o animal foi anestesiado conforme técnica descrita, sendo realizada fixação dos quatro membros com fita adesiva (*Cremer*<sup>®</sup>, 18mmx50m) em goteira *Claude Bernard* seguida da tricotomia da região abdominal. Após antissepsia com iodopolidina tópica (Povidine Iodine, 10% iodo ativo fabricado pela *Made Care*<sup>®</sup> – produtos hospitalares Ltda.) e colocação do campo oftálmico estéril, a parede abdominal foi aberta por planos com lâmina de bisturi número 15 (lâmina de aço carbono da marca *Embramac*<sup>®</sup>) expondo-se a bexiga. Foi realizada coleta de aproximadamente 0,5ml de urina por punção para realização de cultura de urina.

Em seguida, a incisão abdominal foi estendida até o nível do apêndice xifóide com tesoura de Metzenbaum e procedida toracotomia lateral com

---

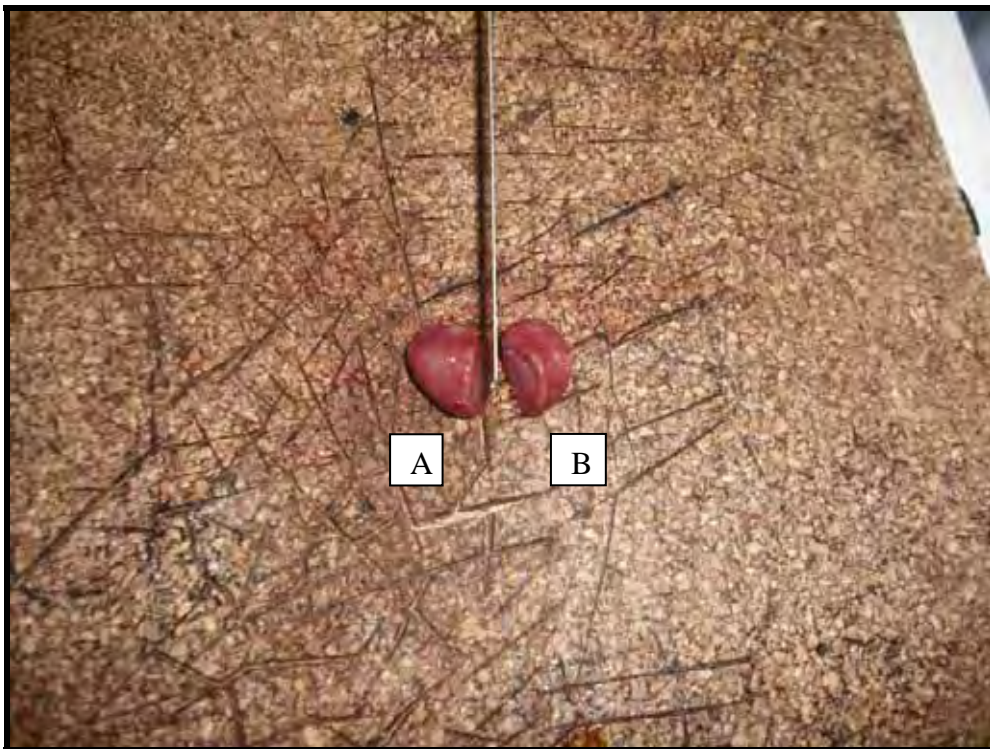
rebatimento do gradil costal para exposição do coração. Neste momento, foi realizada punção do ventrículo esquerdo para coleta de aproximadamente 9 ml de sangue para posterior determinação dos parâmetros bioquímicos.

Após dissecação romba da gordura perirrenal com *cotonetes*<sup>®</sup>, isolamento e ligadura bilateral do pedículo renal com fio de algodão 3-0 (fio de algodão trançado produzido pela *Ethicon*<sup>®</sup>) foi realizada nefrotomia bilateral. O rim esquerdo (Figura 3) foi identificado e congelado separadamente para posterior estudo do cálcio no parênquima pela técnica nuclear espectroscópica, conforme será descrito a seguir no item 8.



**Figura 3.** Ilustração da exérese do rim esquerdo para determinação da concentração de cálcio tecidual.

O rim direito foi seccionado em duas partes iguais com lâmina cirúrgica 21 (lâmina de aço carbono da marca Embramac<sup>®</sup>) na altura do hilo, sendo a metade superior incluída em bloco de parafina para posterior análise histopatológica e histomorfométrica. A região inferior foi congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  em freezer (Consul<sup>®</sup> Practice 240L) (Figura 4).



**Figura 4.** Corte transversal do rim direito, dividindo-o em metade superior (A) e inferior (B).

## 5. SACRIFÍCIO

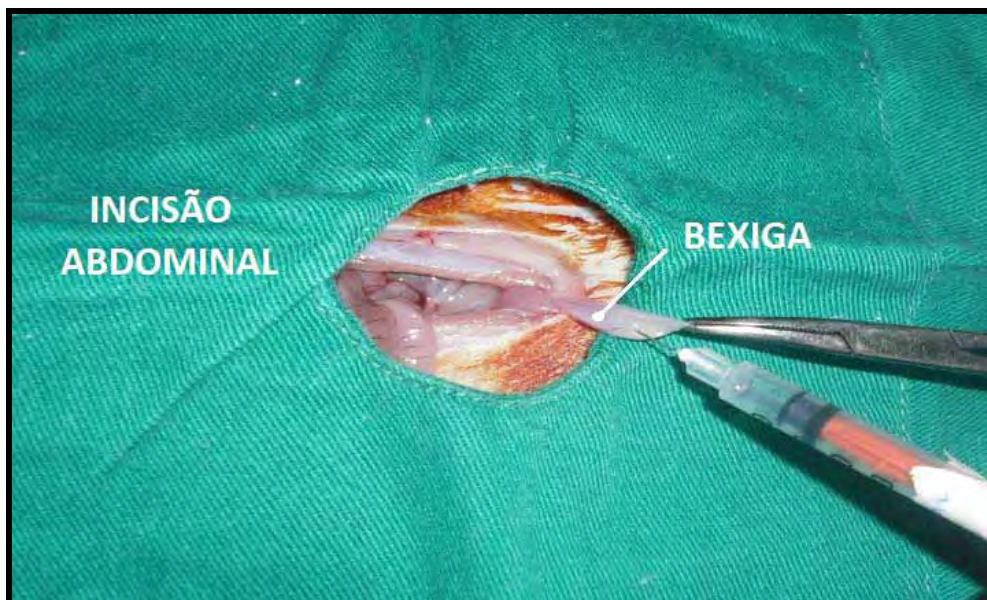
Para o sacrifício, em ambos os momentos (M1 e M2) utilizou-se uma dose letal de pentobarbital sódico 3% (cerca de 2,5 vezes o peso do animal), administrada por via intraperitoneal.

---

## 6. EXAMES LABORATORIAIS

### 6.1. Urina

Imediatamente antes do sacrifício, após incisão abdominal e exposição vesical conforme técnica descrita no item 4, realizava-se a coleta de aproximadamente 0,5ml de urina por punção (Figura 5) com agulha 13 x 0,45 e seringa de 1ml (marca BD<sup>®</sup>). A amostra foi identificada conforme o grupo do animal, acondicionada em gelo e imediatamente encaminhada para realização da cultura no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Unesp no *campus* de Botucatu.



**Figura 5.** Ilustração do procedimento de coleta de urina por punção vesical.

## 6.2. Urina de 24h

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais para coleta da urina de 24 horas. Periodicamente, sempre no mesmo horário, as amostras de urina obtidas foram rigorosamente aferidas utilizando-se uma proveta graduada, sendo seu volume expresso em "ml". Da mesma forma, o pH urinário foi determinado por meio de tiras reagentes utilizando-se o método colorimétrico comparativo (papel indicador de pH 0 a 14 da marca *Macherey-Nagel*<sup>®</sup>) e seu valor foi expresso em duas casas decimais. Foram aferidos os valores iniciais e finais de pH sendo que o primeiro foi medido no segundo dia de experimento na primeira urina de 24h e o segundo no dia da eutanásia de cada animal. Em seguida, as amostras foram congeladas e mantidas armazenadas a -10°C para posterior leitura dos seguintes parâmetros bioquímicos: oxalato, citrato, cálcio e ácido úrico. As análises do cálcio e ácido úrico foram realizadas utilizando-se *kits* bioquímicos da marca *KATAL*<sup>®</sup>. Para análise de ácido úrico, a urina foi diluída na proporção 1:10 (0,1ml de urina + 0,9ml de água destilada ou deionizada). Na medida do cálcio não foi realizada diluição. Todas as amostras foram aferidas utilizando-se o método automatizado *Cobas Mira Plus* da marca Roche<sup>®</sup>.

As alíquotas de urinas para análise do oxalato e citrato foram respectivamente de 2 ml e 1 ml, sendo armazenadas separadamente e conservadas em ácido clorídrico na concentração de 16µl de ácido clorídrico para cada mililitro (ml) de urina coletada. Para a dosagem de oxalato foi utilizado o *kit* bioquímico da marca *Trinity Biotech*<sup>®</sup>. Para análise do citrato utilizou-se o método enzimático automatizado com os reagentes preparados no

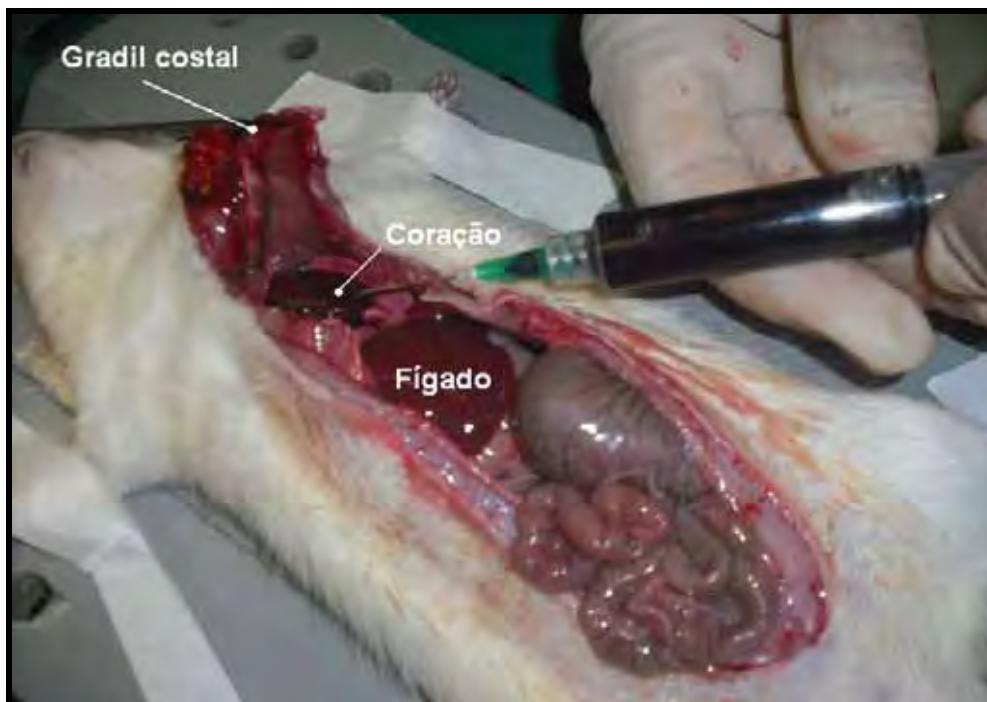
---

momento da dosagem de acordo com as orientações do fabricante. Na análise do citrato foram utilizadas as seguintes substâncias: citrato liase (citrato lyase from *Enterobacter aerogenes* fabricado pela *Sigma Aldrich*<sup>®</sup>), NADH ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide reduced sodium salt hydrate fabricado pela *Sigma Aldrich*<sup>®</sup>), ácido málico (malic dehydrogenase from porcine heart fabricado pela *Sigma Aldrich*<sup>®</sup>), lactato (l-lactic dehydrogenase solution from porcine heart fabricado pela *Sigma Aldrich*<sup>®</sup>), tampão triz (pH 8,2) e sulfato de zinco (30 mmol/L). Para ambas as aferições, utilizou-se o Aparelho de Automação *Cobas Mira S* da marca *Roche*<sup>®</sup>.

### 6.3. Sangue

Após toracotomia e exposição do coração foi realizada punção cardíaca com agulha 30 x 0,7 acoplada à seringa de 5ml para obtenção de sangue e posterior determinação dos parâmetros bioquímicos séricos (Figura 6). Cerca de 9 ml de sangue de cada animal foram mantidos em tubo de vidro seco, em repouso, por cerca de 15 minutos, após o qual ocorreu a retração do coágulo. Em seguida, o soro foi separado utilizando-se a centrífuga *IEKE*<sup>®</sup> modelo LC a 2500 rotações por minutos (rpm) por 15 minutos. O soro resultante deste processo foi identificado e congelado, sendo mantido a  $-18^{\circ}\text{C}$  em freezer (*Cônsul*<sup>®</sup> *Practice 240I*) para posterior dosagem da creatinina utilizando-se o *kit* bioquímico da marca *KATAL*<sup>®</sup> pelo método automatizado *Cobas Mira Plus* da marca *Roche*<sup>®</sup>.

---



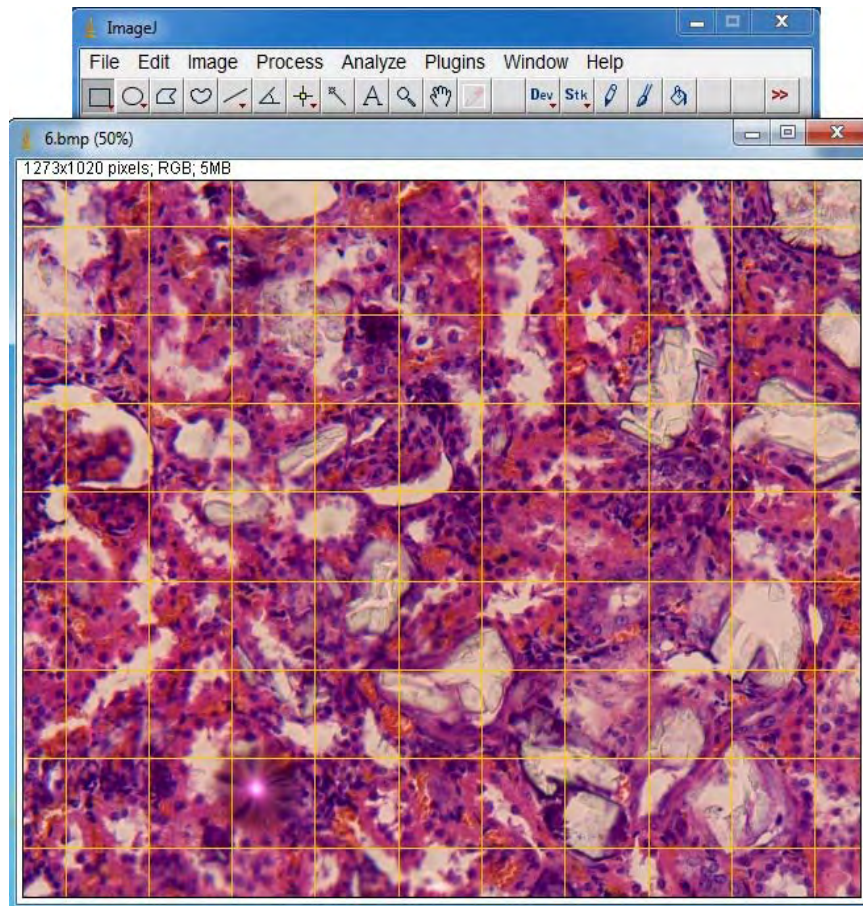
**Figura 6.** Ilustração da punção cardíaca para coleta de sangue.

## 7. QUANTIFICAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA NEFROCALCINOSE

O tecido de porção superior do rim direito foi incluído em blocos de parafina e seccionados na região longitudinal com espessura de 5  $\mu\text{m}$  e a seguir foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

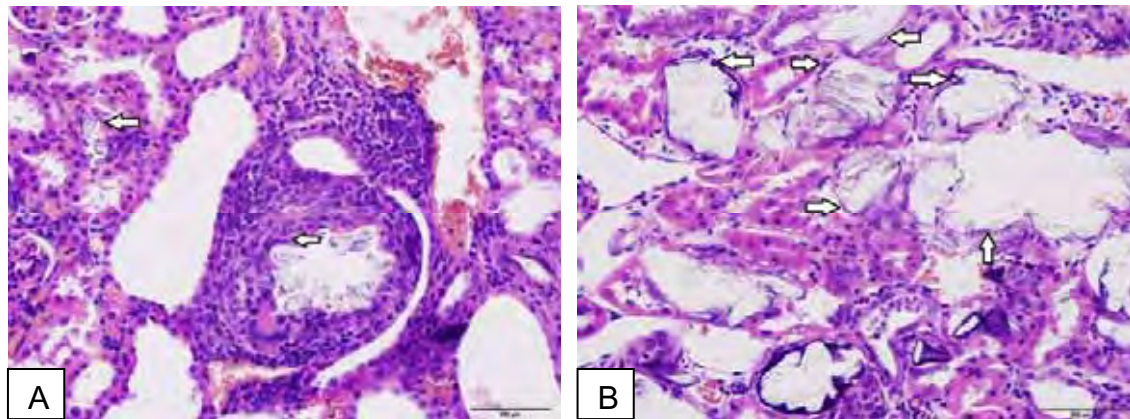
As lâminas foram fotografadas em um aumento final de 20 a 40 vezes utilizando-se uma câmera fotográfica digital (Sony<sup>®</sup> DCR-TRV 240) acoplada ao microscópio óptico (LEICA<sup>®</sup> DMLB) instalado em microcomputador (Pentium IV<sup>®</sup> com processador Celeron<sup>®</sup> 1200 MHz). Para avaliação da nefrocalcínose (contagem dos cristais no parênquima e túbulos renais) utilizou-se o programa *Image J*<sup>®</sup> versão 1.44 (NIH, Bethesda, USA). Para cada lâmina foram escolhidas cinco regiões aleatórias que foram criteriosamente examinadas. O

número de cálculos foi determinado utilizando o *plug-in grid* do *Image J*® que criou uma grade com 100 pontos por campo. O resultado foi então expresso em porcentagem, sendo computados os cálculos presentes em cada ponto de intersecção das linhas da grade gerada pelo referido programa (Figura 7).



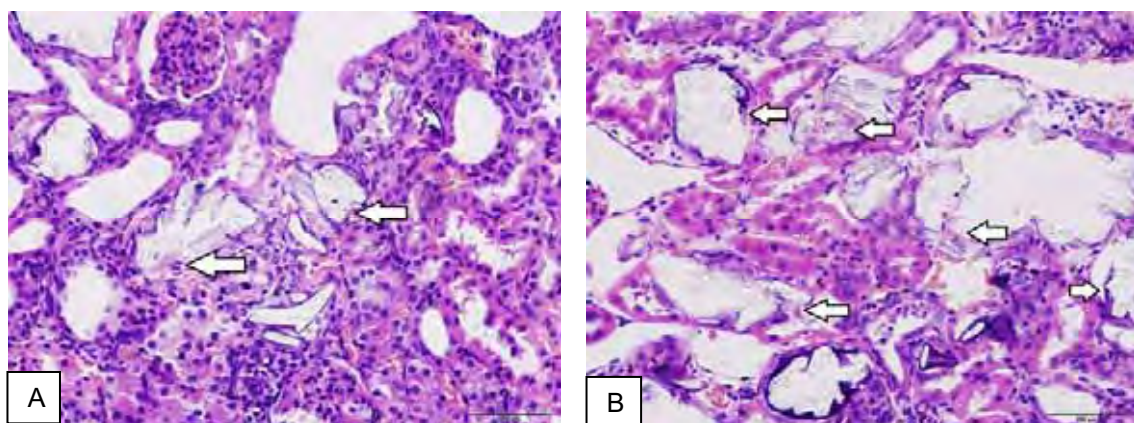
**Figura 7.** Ilustração do Programa *Image J*® versão 1.44 (NIH, Bethesda, USA), com grade de 100 pontos gerada sobre a lâmina.

Para análise histopatológica por microscopia óptica foram utilizados os seguintes critérios para classificação de atrofia: "N" quando ausente, "L" quando leve (um a dois focos de atrofia num campo de aumento de 40x) e "I" quando intensa (três ou mais focos de atrofia num campo de aumento de 40x) (Figura 8).



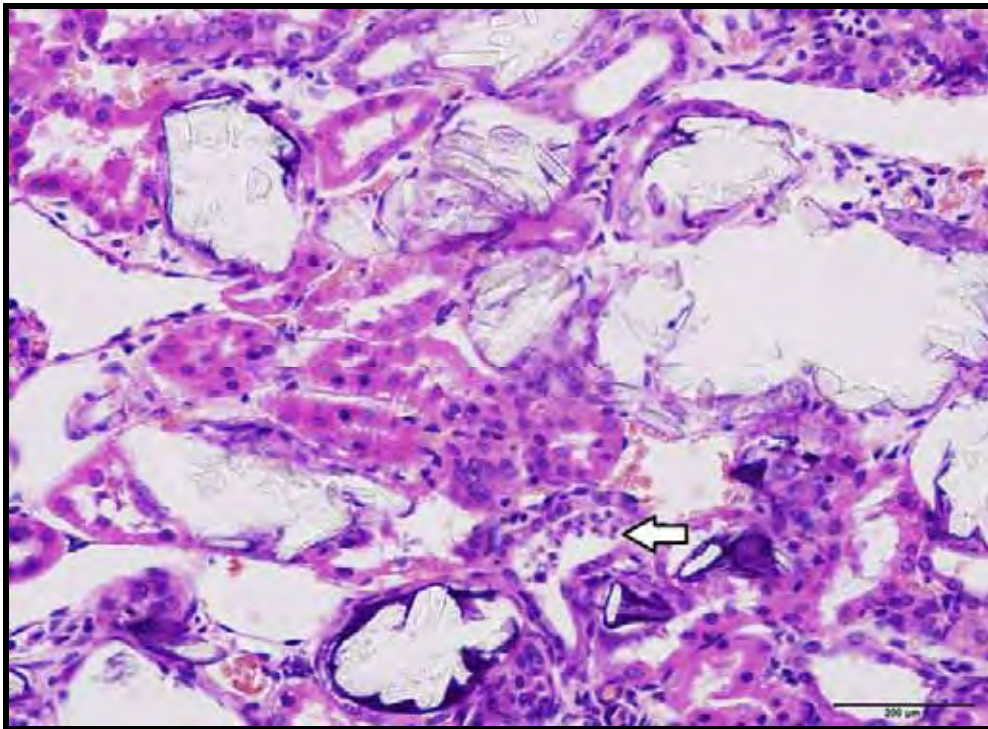
**Figura 8. (A)** Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando uma atrofia leve (L) com 2 focos por campo (setas). **(B)** Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando uma atrofia intensa (I) com mais de 3 focos por campo (setas).

No extravasamento estromal dos cristais utilizou-se "N" na sua ausência, "F" quando fosse focal, ou seja, quando houvesse um extravasamento num campo de aumento de 40x, "FD" para extravasamento intermediário, ou seja, dois a três num campo de aumento de 40x e "D" para difuso, com quatro ou mais nesse mesmo campo de aumento (Figura 9).



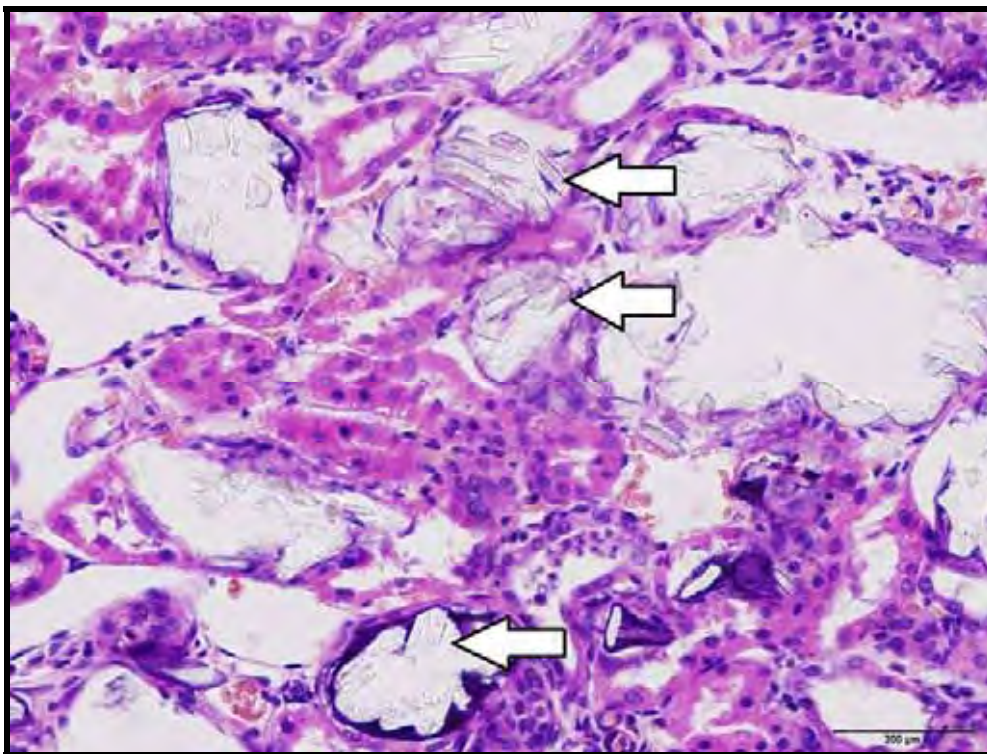
**Figura 9. (A)** Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando um extravasamento estromal intermediário (FD) com 2 focos por campo (setas). **(B)** Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando um extravasamento estromal difuso (D) com 5 focos por campo (setas).

O infiltrado inflamatório foi categorizado como ausente (N), leve (L) apresentando um tipo de infiltrado, moderado (M) com dois ou três tipos de infiltrados ou intenso (I) apresentando quatro ou mais tipos, sempre num campo de aumento de 40x. Os tipos de infiltrados inflamatórios foram caracterizados como "exudativo agudo neutrófilos (A)", "crônicos linfoplasmocitário (C)" e "granulomatoso histiócitos céls gigantes (G)" (figura 10).



**Figura 10.** Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando também um infiltrado inflamatório leve (L) com um exsudativo agudo de neutrófilos (seta).

A avaliação dos cristais no lúmen dos túbulos renais foi caracterizada como:  $n^{\circ}/5cga$  = número de túbulos com cristais no lúmen em cinco campos de grande aumento, no aumento de 40x na área com mais túbulos com cristais (*hot spots*) em áreas contíguas (Figura 11).



**Figura 11.** Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3) no momento M2, aumento de 40x, coloração H.E., demonstrando os túbulos com cristais no lúmen.

## 8. QUANTIFICAÇÃO DO CÁLCIO NO PARÊNQUIMA RENAL

### 8.1. Preparação das amostras

Uma vez removido, o rim esquerdo foi mantido em estufa de secagem (*Retilinea* fabricado pela FANEM<sup>®</sup> LTDA) a 60°C por 48 horas para a completa extração de umidade do órgão. A amostra resultante foi triturada por cinco minutos a 1070 rpm com triturador SPEX<sup>®</sup> *SamplePrep* (fabricado pela empresa Geno/Grinder, 2010) (Figuras 12 e 13) localizado no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp.



**Figura 12.** Triturador de tecidos moles.



**Figura 13.** Rim esquerdo seco e triturado.

Com o tecido já seco e triturado, a dosagem do cálcio no parênquima renal foi realizada no laboratório LAMFI (Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos), no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP), utilizando-se a técnica PIXE (Proton Induced X-Ray Emission). Para tanto, a amostra foi convertida em uma solução homogênea na seguinte proporção: 0,1g de amostra (pó do tecido renal) + 90µl de Gálio + 1,2ml de HNO<sub>3</sub> (ácido nítrico puro ou destilado). Em seguida, a mistura obtida foi acondicionada em estufa de secagem Quimis® por 13 horas (780 minutos) a 110°C.

Neste processo, o Gálio (Ga), por ser um elemento ausente na amostra, foi utilizado como padrão interno para quantificar Ca. A partir da determinação do mesmo, a concentração de Ca no tecido renal foi calculada considerando-se as áreas dos picos dos espectros de Ga e do elemento Ca. O HNO<sub>3</sub> foi utilizado para digerir a amostra e torná-la homogênea e aderente ao substrato utilizado (Figura 14). A partir da equação 1, consegue-se obter a concentração final de Ga na amostra.

$$M_1C_1 = M_2C_2$$

**Equação 1:** Onde M1 é a massa inicial do Gálio (pesada), C1 é a concentração inicial de Gálio conhecida (1020 ppm), M2 é a massa final (amostra + Gálio) e C2 é a concentração final de Gálio na amostra.



**Figura 14.** Adição de ácido nítrico na amostra para digestão.

Objetivando assegurar a eficácia das medidas realizadas, duas outras amostras foram preparadas (uma “branca” e outra com um material de referência) e submetidas a mesma rotina laboratorial. Ambas seguiram o mesmo modo de preparo das amostras de tecido renal, no entanto, a amostra “branca” não continha parênquima renal, estando presentes apenas o Gálio e o  $\text{HNO}_3$ . A segunda amostra foi preparada utilizando-se no lugar do tecido renal um material já certificado e aferido (*Bovine Liver 1577b*, da marca NIST®). Simultaneamente, discos com plástico *Kimfol* de 25 mm de diâmetro foram preparados e sobre este material foram pipetados 8  $\mu\text{l}$  da amostra obtida.

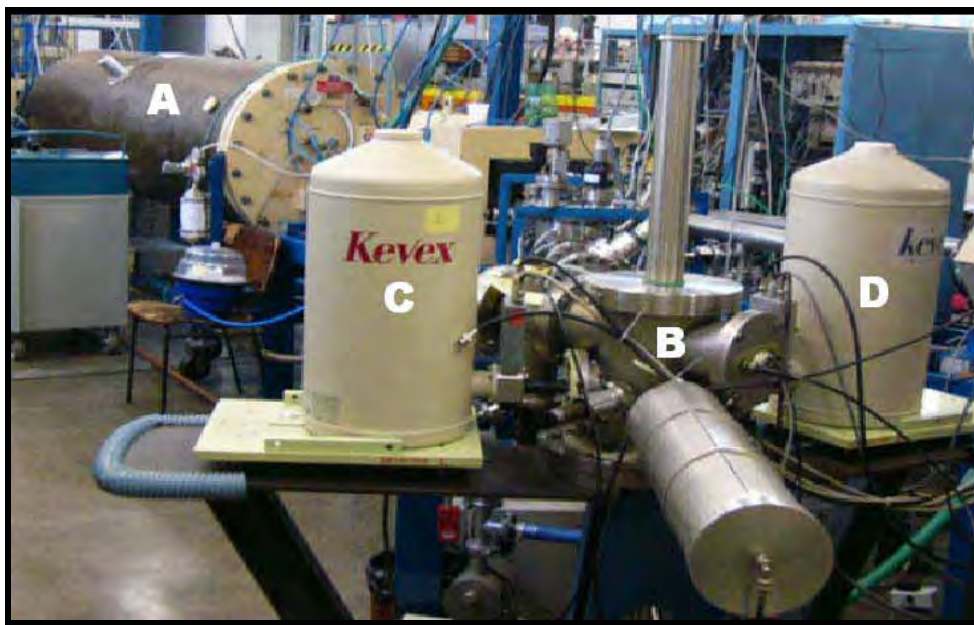
Todo o procedimento foi realizado em salas limpas para evitar contaminação das amostras e utilizando materiais de proteção pessoal como luvas, óculos e jalecos.

## 8.2. Sistema PIXE (Proton Induced X-Ray Emission).

Os alvos pipetados sobre o plástico foram colocados na câmara PIXE e irradiados durante dez minutos para a obtenção da concentração de cálcio. Este sistema é composto por um acelerador eletrostático tipo Pelletron-tandem, modelo 5SDH fornecido pela NEC<sup>®</sup> (*National Electrostatic Corporation; EUA*), que pode alcançar até 1,7MV de tensão no terminal. Tal equipamento é constituído por uma fonte de íons SNICS (*Source of Negative Ions by Cesium Sputtering*), uma câmara de análise de alto vácuo (construída no IFUSP) e dois detectores de raio-X do tipo Si (Li) (SANTOS, 2007).

A câmara para análise PIXE contém um dispositivo linear para acondicionamento das amostras com capacidade para 18 discos de 25 mm de diâmetro. Os controles XY manuais externos e dois detectores semicondutores, um ajustado para detectar raios-X com energia  $E < 6\text{keV}$  e outro para raios-X com energia  $E < 4\text{keV}$ , têm por objetivo otimizar os limites de detecção (TABACNIKS, 1983), conforme ilustrado na figura 15.

---



**Figura 15.** Dispositivo utilizado para determinação do Cálcio no parênquima renal: o acelerador de partículas (A) fica acoplado à câmara PIXE (B) e aos detectores de alta energia (C) e de baixa energia (D).

## 9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para contrastes entre populações binominais foi utilizado o Teste de *Goddman* (GODDMAN, 1964).

No estudo das variáveis quantitativas e momentos foi utilizado o modelo da análise de variância não-paramétrica para o modelo de dois fatores complementada com o teste de Dunn (ZAR, 2009).

Para indicação de significância das comparações nas tabelas foram utilizadas letras minúsculas nos contrastes entre os grupos. Proporções de uma mesma letra minúscula numa categoria de resposta referenciada não diferem na comparação dos grupos ( $p > 0,05$ ).

Todas as conclusões foram realizadas no nível de 5% de significância.

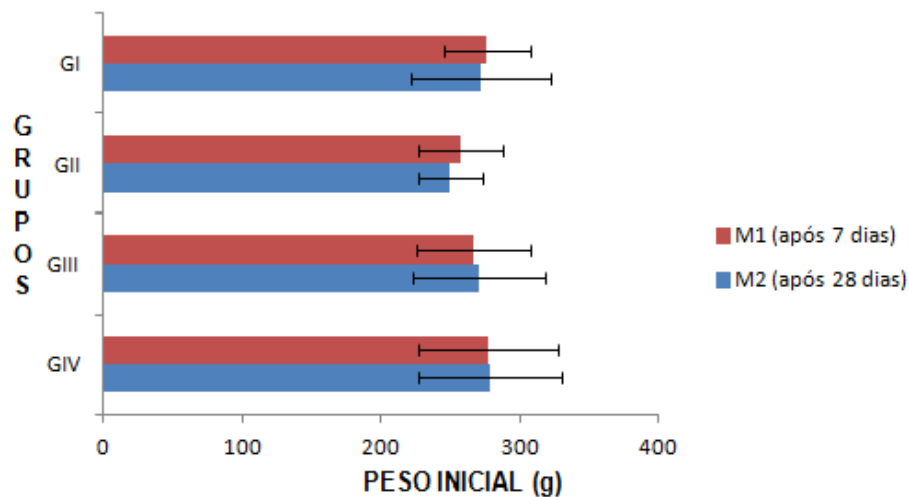
*Resultados*



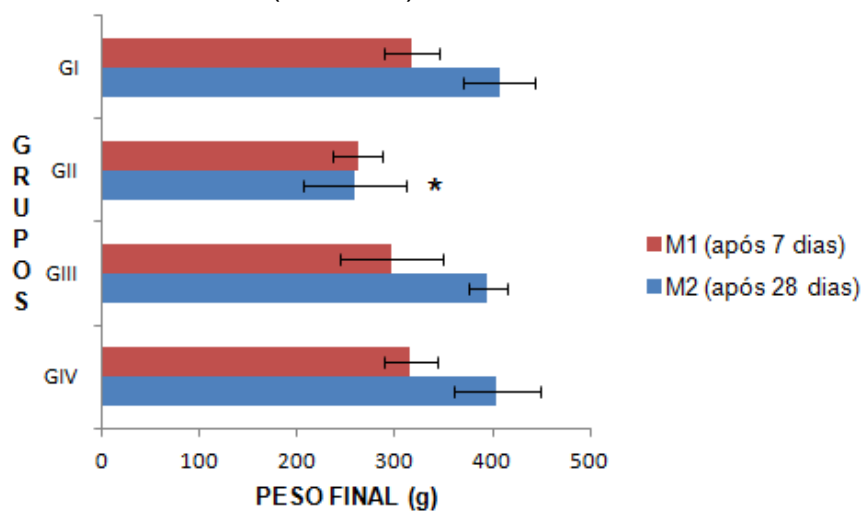
## 1. AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DA INGESTÃO DE RAÇÃO

Em relação ao peso inicial dos animais, não observamos diferença estatisticamente significativa seja nos diferentes grupos ou em relação aos diferentes momentos (Gráfico 1).

Na medida do peso final no momento M1 (após 7 dias), não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No momento M2 (após 28 dias), observamos um peso significativamente menor no GII em relação aos demais grupos (Gráfico 2).



**Gráfico 1:** Valores médios e desvios-padrão do peso inicial, segundo grupo nos diferentes momentos (M1 e M2) .



**Gráfico 2:** Valores médios e desvios-padrão da ingestão de ração segundo grupo nos diferentes momentos (M1 e M2).

\* $p < 0,05$ : GII < GI = GIII = GIV.

A ingestão de ração foi significativamente menor no grupo GII em relação aos demais, considerando os diferentes momentos (M1 e M2) (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.

**Tabela 1.** Média e desvio padrão da ingestão alimentar, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (g)	M2 (28 dias) (g)
I	25,80 ± 2,11 b	28,75 ± 2,23 b
II	16,15 ± 4,47 a	13,67 ± 6,44 a
III	23,07 ± 4,65 b	26,37 ± 4,11 b
IV	27,12 ± 2,72 b	28,57 ± 5,53 b

## 2. AVALIAÇÃO DA INGESTÃO LÍQUIDA

Não observamos diferença estatisticamente significativa na ingestão de líquidos seja entre os grupos ou nos diferentes momentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Média e desvio padrão da ingestão de líquidos, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias)	M2 (28 dias)
I	34,54 ± 7,61 a	41,83 ± 3,93 a
II	39,46 ± 16,08 a	34,63 ± 9,13 a
III	37,11 ± 14,99 a	42,11 ± 7,39 a
IV	40,20 ± 5,02 a	38,14 ± 10,04 a

### 3. EXAMES LABORATORIAIS

#### 3.1. UROCULTURA

Não foi observado crescimento bacteriano na urina dos animais nos diferentes grupos e momentos.

#### 3.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS URINÁRIOS

O volume urinário (VU) no período de 24 horas foi significativamente menor no grupo GI em relação ao GII, nos diferentes momentos (M1 e M2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos nos diferentes momentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Mediana e valores mínimos e máximos do Volume urinário, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (ml)	M2 (28 dias) (ml)
I	3,45 (2,48 ; 4,89) a	4,50 (2,24 ; 9,20) a
II	14,43 (5,87 ; 18,43) b	10,10 (5,33 ; 17,94) b
III	12,00 (3,28 ; 16,30) ab	4,39 (2,74 ; 20,19) ab
IV	6,46 (4,10 ; 14,04) ab	3,83 (3,04 ; 5,03) ab

Na análise do pH da urina final, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos diferentes momentos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Mediana e valores mínimos e máximos do pH final, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias)	M2 (28 dias)
I	8,5 (8,0 ; 9,0) a	9,0 (8,0 ; 9,0) a
II	9,0 (7,0 ; 9,0) a	9,0 (8,0 ; 9,0) a
III	9,0 (8,0 ; 9,0) a	9,0 (8,5 ; 10,0) a
IV	9,0 (7,0 ; 9,0) a	9,0 (9,0 ; 9,0) a

No citrato da urina de 24h não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos diferentes momentos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Mediana e valores mínimos e máximos de citrato urinário, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (mg/l)	M2 (28 dias) (mg/l)
I	25,28 (15,70 ; 42,64) a	1,80 (1,13 ; 23,27) a
II	7,25 (4,38 ; 102,91) a	2,16 (0,59 ; 3,08) a
III	9,83 (6,34 ; 81,25) a	3,73 (1,23 ; 13,93) a
IV	12,74 (2,41 ; 23,23) a	21,74 (2,18 ; 35,32) a

No momento M1, o ácido úrico da urina de 24h foi significativamente menor no grupo GII em relação ao GI e GIV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.

No momento M2, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Mediana e valores mínimos e máximos de ácido úrico na urina, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (mg/dl)	M2 (28 dias) (mg/dl)
I	16,1 (9,9 ; 22,3) b	1,3 (0,8 ; 10,0) a
II	1,7 (0,5 ; 2,5) a	1,0 (0,5 ; 16,1) a
III	4,0 (0,9 ; 7,9) ab	1,0 (0,6 ; 28,7) a
IV	16,1 (5,8 ; 25,3) b	6,0 (1,2 ; 20,3) a

No momento M1, o oxalato na urina de 24 horas foi significativamente menor no grupo GI em relação ao GII e GIII. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.

No momento M2, o oxalato foi significativamente menor no grupo GI em relação ao GIII. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Mediana e valores mínimos e máximos do oxalato urinário, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (mg/l)	M2 (28 dias) (mg/l)
I	1,54 (0,71 ; 3,15) a	3,65 (1,54 ; 8,75) a
II	11,47 (5,39 ; 18,38) b	5,41 (0,85 ; 11,28) ab
III	17,50 (2,22 ; 24,61) b	11,29 (1,74 ; 31,18) b
IV	1,81 (0,85 ; 3,40) ab	3,14 (2,87 ; 7,27) ab

No momento M1, o Cálcio da urina de 24h foi significativamente maior no grupo GIV em relação ao GII. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.

No momento M2, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 8).

**Tabela 8.** Mediana e valores mínimos e máximos de Cálcio Urinário, segundo grupo e momento de avaliação (M1 e M2).

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (mg/dl)	M2 (28 dias) (mg/dl)
I	5,9 (4,2 ; 7,7) ab	2,4 (0,8 ; 2,7) a
II	1,6 (0,5 ; 4,1) a	1,2 (0,6 ; 8,2) a
III	1,9 (1,1 ; 5,0) ab	1,6 (0,7 ; 5,3) a
IV	6,8 (4,4 ; 8,2) b	2,4 (2,1 ; 2,9) a

### 3.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SÉRICOS

No momento M1, a creatinina sérica foi significativamente maior no grupo GII em relação ao GI e GIV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.

No momento M2, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 9).

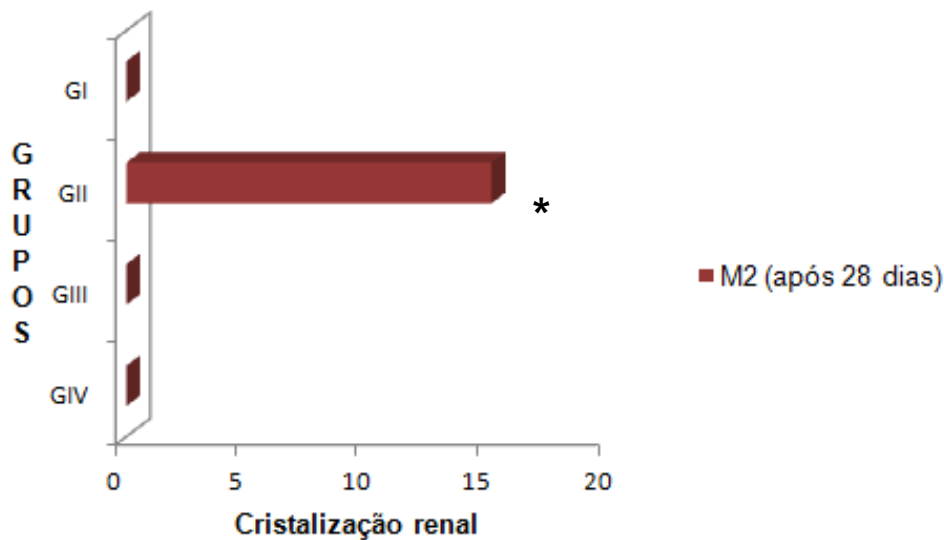
**Tabela 9.** Mediana e valores mínimos e máximos da creatinina sérica, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (mg/dl)	M2 (28 dias) (mg/dl)
I	0,5 (0,5 ; 0,5) a	0,6 (0,5 ; 0,7) a
II	0,8 (0,5 ; 0,9) b	0,6 (0,5 ; 0,8) a
III	0,5 (0,5 ; 0,6) ab	0,6 (0,5 ; 0,6) a
IV	0,5 (0,5 ; 0,5) a	0,6 (0,5 ; 0,7) a

### 3.4. AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

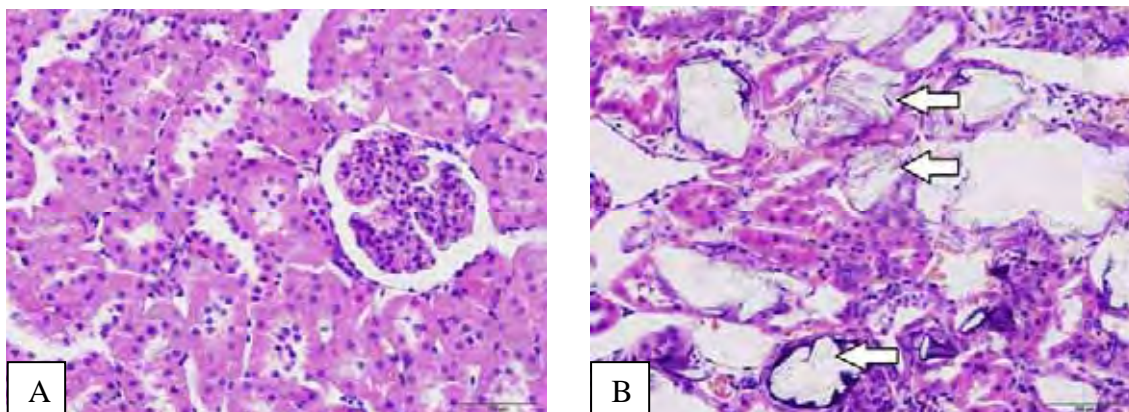
No momento M1, não houve diferença estatisticamente significativa na calcificação renal entre os diferentes grupos.

No momento M2, observamos uma calcificação renal significativamente maior no grupo GII em relação aos demais grupos (Gráfico 3) (Figura 16). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.



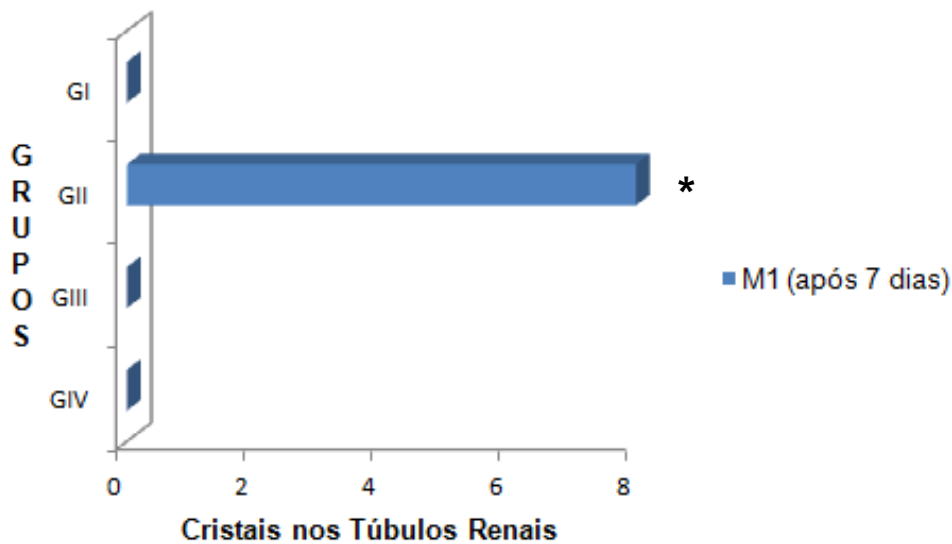
**Gráfico 3.** Valores de mediana de cristalização renal segundo grupo, no momento M2.

\* $p < 0,05$



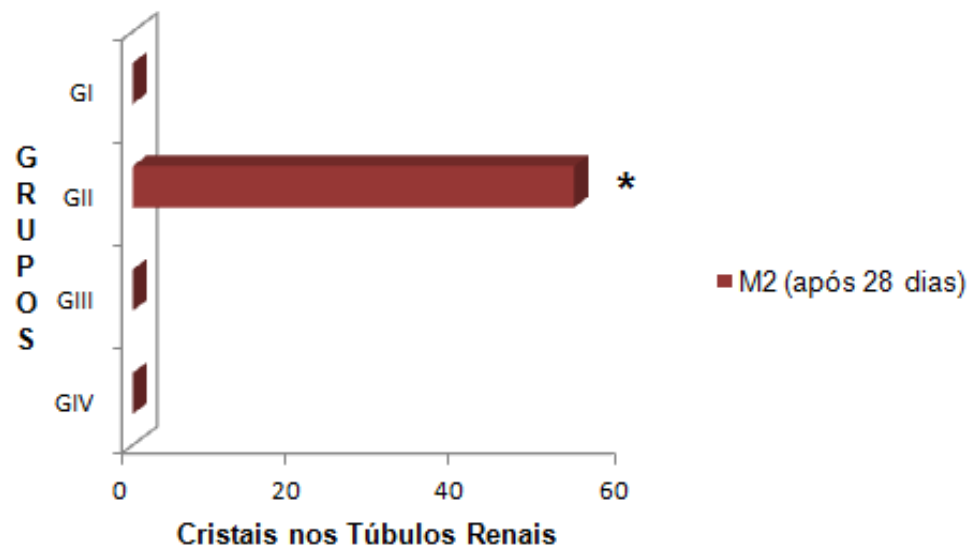
**Figura 16.** (A) Corte histológico do rim direito de um animal pertencente ao grupo I (Controle) no momento M2, aumento de 40 vezes, coloração H.E., demonstrando arquitetura renal preservada. (B) Visualização dos cristais no parênquima renal de um animal do grupo II (Etileno Glicol 0,5% + Vitamina D3), no aumento de 40 vezes, coloração H.E.

A calcificação no túbulo renal foi significativamente maior no grupo GII em comparação aos demais grupos nos diferentes momentos (Gráficos 4 e 5). Não observamos diferença estatisticamente significativa nos demais grupos nos diferentes momentos.



**Gráfico 4.** Valores de mediana do número de cristais por túbulo renal, segundo grupo, no momento M1.

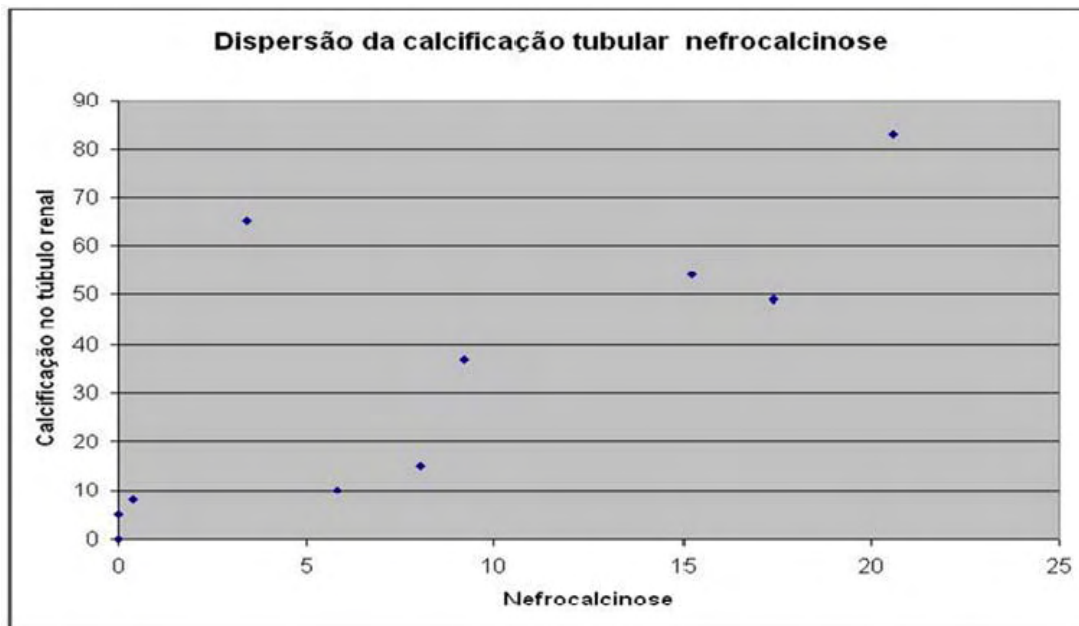
\*  $p < 0,01$



**Gráfico 5.** Valores de mediana do número de cristais por túbulo renal, segundo grupo, no momento M2.

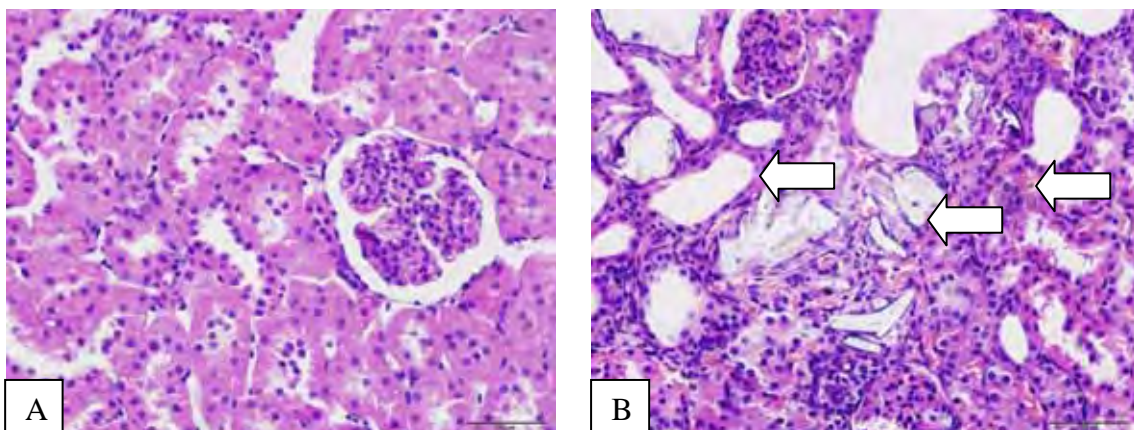
\*  $p < 0,01$

Houve uma boa correlação entre a calcificação renal e tubular utilizando-se os diferentes métodos de avaliação (Gráfico 6).



**Gráfico 6.** Análise da dispersão da Calcificação do Túbulo Renal em relação a Nefrocalcínose.

No grupo GII, observamos atrofia leve (L) em 60% dos animais no momento M1 e intensa (I) em 100% dos animais no momento M2 (Figura 17). Não houve atrofia nos demais grupos nos diferentes momentos.

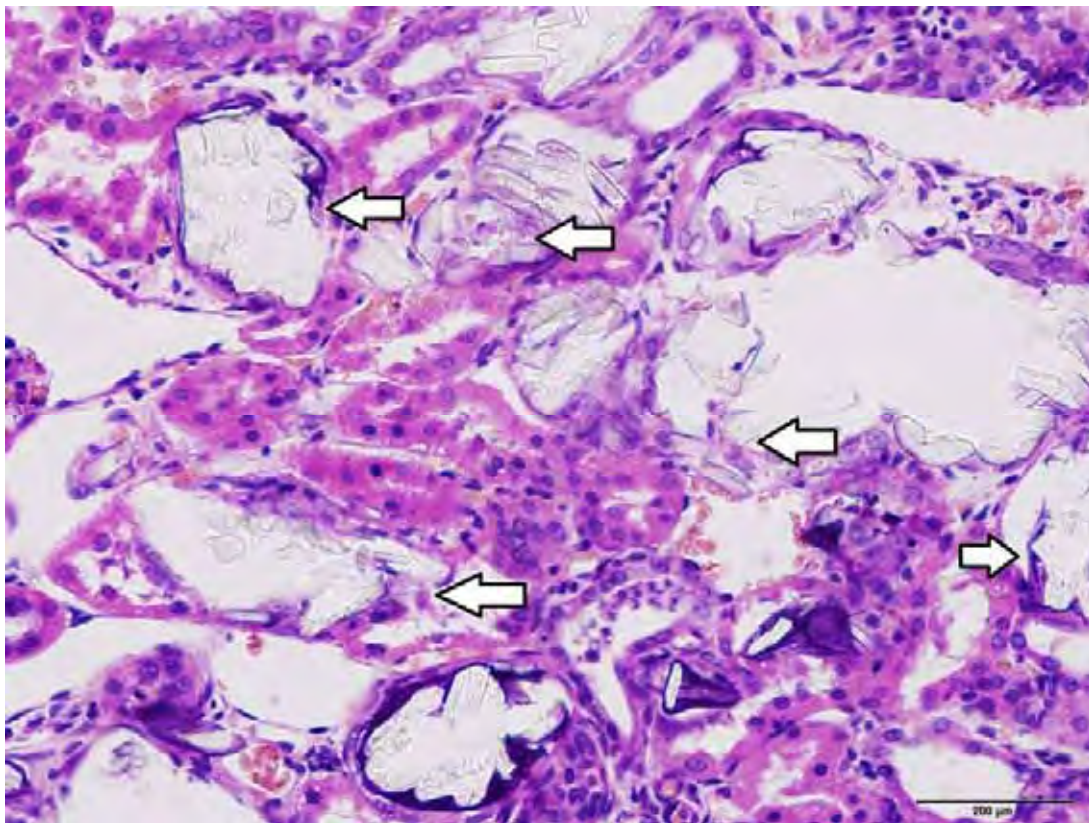


**Figura 17.** (A) Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo I (Controle) demonstrando a arquitetura renal preservada; aumento 40 vezes, coloração pelo H.E. Na figura (B), corte histológico do rim direito de um animal do Grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3), aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E, demonstrando a atrofia intensa das células (setas).

Em 20% dos animais no grupo GII observamos extravasamento estromal focal (F), no momento M1.

Observamos extravasamento em 80% dos animais do grupo GII no momento M2, sendo 75% intermediário (FD) e 25% difuso (D).

Não houve extravasamento nos demais grupos nos diferentes momentos (Figura 18).

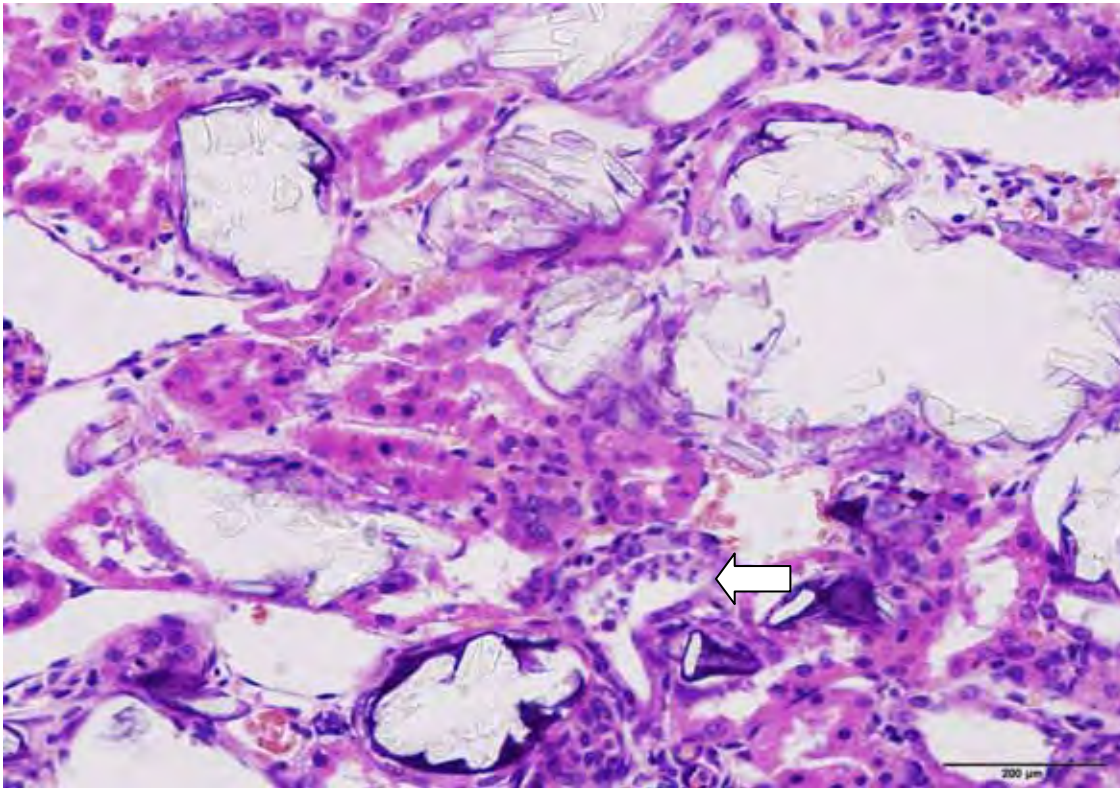


**Figura 18.** Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3), aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E, demonstrando a presença de extravasamento estromal, classificado como difuso (D) (setas).

No momento M1, 80% dos animais do grupo GII apresentaram infiltrado inflamatório agudo de intensidade leve (L).

No momento M2, 80% apresentaram processo inflamatório agudo, sendo 75% de intensidade leve (L) (Figura 19) e 25% moderado (M).

Não foi observado processo inflamatório nos demais grupos nos diferentes momentos.



**Figura 19.** Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo II (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3), momento M2, aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E, demonstrando a presença de infiltrado inflamatório agudo leve (seta).

### 3.5. QUANTIFICAÇÃO DO CÁLCIO NO PARÊNQUIMA RENAL

A quantificação de cálcio no parênquima renal foi significativamente maior no grupo GII em relação aos demais grupos nos diferentes momentos (M1 e M2).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos nos diferentes momentos (Tabela 10).

**Tabela 10.** Mediana e valores mínimos e máximos de cálcio no parênquima renal, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupos	Momentos	
	M1 (7 dias) (mg/kg)	M2 (28 dias) (mg/kg)
I	510 (495 ; 524) a	464 (415 ; 512) a
II	5146 (4477 ; 5815) b	54935 (48855 ; 61014) b
III	609 (538 ; 680) a	487 (482 ; 492) a
IV	277 (0 ; 554) a	338 (326 ; 349) a

*Discussão*



Em nossa série, após 28 dias (momento M2), observamos um peso e uma ingestão de ração significativamente menor no grupo GII em relação aos demais grupos. Estudos que utilizaram hiperoxalúria crônica por indução de Etileno Glicol (EG) não referiram alteração de peso corporal (Li & MacMartim, 2009; Khan & Glenton, 2010). Desta forma, provavelmente estes resultados devem ter relação com o processo de gavagem ou com uma gastrite devido a utilização da vitamina D3.

Não observamos diferença significativa na ingestão de líquidos e em todos os animais a cultura de urina foi negativa, demonstrando assim que esses fatores não influenciaram em nossa amostra, tendo em vista que alguns autores demonstram a interferência seja da ingestão de líquidos ou da presença de bactéria na gênese da litíase renal (Lotan et al., 2012; Hall, 2009).

O volume urinário (VU) é sabidamente um fator importante na etiopatogenia da litíase renal, pois uma baixa diurese pode ocasionar uma maior concentração de solutos litogênicos, podendo contribuir com a maior formação de cálculos renais (Hong et al., 2012). Observamos paradoxalmente um maior VU no grupo GII em relação ao grupo controle nos momentos M1 e M2 e não observamos diferença significativa para este parâmetro nos diferentes modelos de hiperoxalúria. Desta forma, o VU parece não ter influenciado em nossos resultados.

Em nosso estudo, o pH urinário se manteve em média alcalino nos diferentes momentos (M1 e M2), com uma variação não significativa entre os grupos. Isto demonstra que esse fator não parece ter influenciado na precipitação dos cristais renais, pois diferentes trabalhos referem que a

---

solubilidade do OxCa não é afetada pela variação do pH urinário (COPELOVITCH, 2012; OTOCKA, 2012).

O citrato é aceito como um eficiente inibidor da precipitação do cálcio na urina (Pak, 1994), pois formam um complexo solúvel que reduz a atividade iônica do cálcio e a supersaturação do OxCa (SOYGUR et al., 2002) e, ainda, previne a nucleação e a agregação dos cristais (CHOW et al, 2004). Por isso, o aumento de seus níveis seja por meio da dieta e/ou suplementação medicamentosa pode ser uma estratégia terapêutica eficaz seja evitando a formação de cálculos renais ou diminuindo a sua recorrência (WHALLEY et al., 1996; ETTINGER et al., 1997; McHARG et al., 2003; AKANAE, 2010). Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa do citrato nos diferentes grupos e momentos, demonstrando que este fator não influenciou nos achados em relação à nefrocalcinose.

A hiperuricosúria pode ser considerada o principal fator de risco nos cálculos urinários de ácido úrico, podendo ainda estar envolvido na litíase de OxCa (SIENER, 2006). Apesar de termos observado uma excreção significativamente maior no grupo Controle (GI) e HLP (GIV) em relação ao grupo EG 0,5% + Vitamina D3 (GII) no momento M1, não foi observada uma calcificação parenquimatosa ou tubular nestes grupos de animais.

No momento M1, observamos um aumento significativo do oxalato urinário nos grupos II e III em relação ao grupo controle e HLP, demonstrando assim que os grupos com indutores de EG produzem um modelo adequado de hiperossalúria. Porém, após 28 dias, apenas o grupo EG a 1,25% (GIII) manteve uma hiperossalúria significativa em relação aos demais grupos. Apesar disto, a

---

deposição de cristais foi observada somente no grupo GII (EG 0,5% + Vitamina D3), nos diferentes períodos de estudo, se tornando mais intensa ao final de 28 dias. A diminuição observada nos níveis de oxalato na urina após 28 dias, no grupo GII, poderia ser explicada pela maior formação de cristais urinários de OxCa, reduzindo a sua concentração na urina (Khandrika et al., 2012).

O cálcio urinário foi significativamente maior no grupo controle e HLP durante 7 dias de seguimento, porém este fato não está relacionado com a maior deposição de OxCa no parênquima renal. Após 28 dias, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, demonstrando a não correlação entre a hiper calciúria e o modelo de nefrocalcinose. Houve uma diminuição em números absolutos do cálcio urinário no grupo de nefrocalcinose (GII) nos diferentes momentos (M1 e M2) e, este fato, pode ser explicado pela cristalização do OxCa no parênquima renal, diminuindo a concentração deste íon, à semelhança do que foi proposto para o oxalato (Khandrika et al., 2012).

Apesar da creatinina sérica não ser considerada um biomarcador ideal para avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG), na falta de marcadores mais sensíveis, pode nos dar uma ideia da função renal global (Dalton, 2011). Alguns autores relataram uma correlação entre a diminuição da função renal e urolitíase, devido à obstrução do fluxo de urina pelos cálculos no sistema urinário e ao dano no parênquima renal (Alexander et al., 2012; Jagannath et al., 2012). Em nosso estudo, observamos uma creatinina sérica significativamente maior no grupo GII em relação ao grupo Controle e HLP após 7 dias. Entretanto, quando os animais eram acompanhados por um

---

período maior de seguimento (28 dias), não se observou uma diferença significativa na creatinina sérica nos diferentes grupos. Levando-se em consideração que um período maior de exposição aos diferentes agentes indutores deveriam ocasionar uma piora na função renal (Jagannath et al., 2012), esta diferença inicial poderia ser considerada uma variação biológica.

Water e colaboradores (1999), analisando o *stress* oxidativo no parênquima renal em um modelo de nefrocalcinose utilizando EG a 0,75%, observou alteração da função renal nestes animais. Em nosso estudo, a fim de evitar este efeito indesejável, diminuimos a concentração do EG para 0,5% e associamos a Vitamina D3, com o propósito de potencializar a deposição de cristais de cálcio (Liu et al, 2007). Obtivemos, assim, um modelo adequado para nefrocalcinose que, apesar da avaliação global da função renal, não observamos nefrotoxicidade.

As alterações histopatológicas ocorreram exclusivamente no grupo com nefrocalcinose (GII), havendo predominância de processo inflamatório agudo, atrofia epitelial e extravasamento estromal, demonstrando que a cristalização está envolvida nesses processos. Levando-se em consideração que, na nefrocalcinose, os cristais de OxCa são formados inicialmente na luz dos túbulos movendo-se para dentro da célula ou para o espaço intersticial, estes podem ocasionar os processos inflamatórios e morfológicos descritos (Khan, 2010), explicando os achados histopatológicos do nosso estudo.

A análise da dispersão dos dois diferentes métodos de avaliação de calcificação renal foi adequada, entretanto, se considerada a nefrocalcinose, notamos no grupo GII um aumento significativo da calcificação renal somente

---

após 28 dias de seguimento. Por outro lado, a calcificação no túbulo renal foi significativamente maior neste grupo nos dois diferentes momentos. Levando-se em consideração ainda a análise do cálcio no parênquima renal, observou-se uma maior concentração deste íon no grupo GII em relação aos demais grupos nos diferentes períodos de seguimento. Esses fatos vêm corroborar para o melhor modelo de nefrocalcinose no grupo EG 0,5% + Vitamina D3.

---

*Conclusão*



O indutor Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3 foi o modelo ideal para indução de nefrocalcinose em ratos após 28 dias de seguimento.

---

## *Referências Bibliográficas*



Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. *Orthosiphon grandiflorum* has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. Urol Res. 2010; 38: 89-96. rolled trial. J Endourol. 2002;16:140-52.

Alexander RT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, Bello A, Morgan C, Samuel S, et al. Kidney stones and kidney function loss: a cohort study. BMJ. 2012;345:5287.

Amaro CR, Goldberg J, Amaro JL, Padovani CR. Metabolic assessment in patients with lithiasis. Int Braz J Urol 2005;31:29-33.

Asplin JR, Mandel NS, Coe FL. Evidence of calcium phosphate supersaturation in the loop of Henle. Am J Physio. 1996;270:604-13.

Asselman M, Verhulst A, De Broe ME, Verkoelen CF. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluranin, osteopontin and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys. J Am Soc Nephrol. 2003;4:3155-63.

Bourdeau JE, Attie MF. Calcium metabolism. In: Maxwell MH, Kleeman CR: Clinical disorders fluids and eletrolites metabolism. 5th ed. New York: McGraw Hill; 1994. p. 243-306.

Bushinsky DA, Asplin JR, Grynpass MD, Evan AP, Parker WR, Alexander K, et al. Calcium oxalate stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. Kidney Int. 2002;61:975-87.

Cannigia A, Lore F, DiCairano G, Nuti R. Main endocrine modulators of vitamin D hydroxilases in human pathophysiology. J Steroid Biochem Mol Biol. 1987;27:815-24.

Chow K, Dixon J, Gilpin S, Kavanagh JP, Rao PN. Citrate inhibits growth of residual fragments in an in vitro model of calcium oxalate renal stones. Kidney Int. 2004; 65:1724-30.

---

Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest.* 2005;115:2598-608.

Copelovitch L. Urolithiasis in Children: Medical Approach. *Pediatric Clin North Am.* 2012;59:881-96.

Dalton RN. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. *J Bras Patol Med Lab.* 2011;47:8-11.

de Water R, Noordermeer C, van der Kwast TH, Nizze H, Boevé ER, Kok DJ, et al. Calcium oxalate nephrolithiasis: effect of renal crystal deposition on the cellular composition of the renal interstitium. *Am J Kidney Dis.* 1999;33:761-71.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.

Duncan SH, Richardson AJ, Kaul P, Holmes RP, Allison MJ, Stewart CS. Oxalobacter formigenes and its potential role in human health. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:3841-7.

Eder AF, McGrath CM, Dowdy YG, Tomaszewski JE, Rosenberg FM, Wilson RB, et al. Ethylene glycol poisoning: toxicokinetic and analytical factors affecting laboratory diagnosis. *Clin Chem.* 1998;44:168-77.

Ettinger B, Pak CYC, Citron JT. Potassium-magnesium citrate is an effective prophylaxis against recurrent calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol.* 1997;158:2069-73

Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:831-41.

Fan J, Glass MA, Chandhoke PS. Effects of castration and finasteride on urinary oxalate excretion in male rats. *Urol Res.* 1998;26:71-5.

---

Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat.* 1964;35:716-25.

Green ML, Hatch M, Freel RW. Ethylene glycol induces hyperoxaluria without metabolic acidosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:536–43.

Grüdtner VS, Weingrill P, Fernandes AL. Aspectos da absorção do metabolismo do cálcio e vitamina D. *Rev Bras Reumatol.* 1997;37:143-51.

Hall PM. Nephrolithiasis: Treatment, causes and prevention. *Clev Clin J Med.* 2009;76:583-91.

Hatch M. Oxalate status in stone formers: two distinct hyperoxaluric entities. *Urol Res.* 1993;21:55–9.

Heilberg IP, Schor N, Dos Santos DR, Cheidde L, Noronha N, Duarte RJ. Diretrizes de litíase urinária da sociedade brasileira de nefrologia. *J Bras Nefrol.* 2002;24:203-7.

Hong YH, Dublin N, Razack AH, Mohd MA, Husain R. Urinary Metabolic Evaluation of Stone Formers - A Malaysian Perspective. *Urol J.* 2012;80: 529-34.

Huang H-S, Ma M-C, Chen J, Chen C-F. Changes in the oxidant–antioxidant balance in the kidneys of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Urol.* 2002;167:2584–93.

Jagannath N, Chikkannasetty S, Govindadas D, Devasankaraiah G. Study of antiurolithiatic activity of *Asparagus racemosus* on albino rats. *Indian J Pharmacol.* 2012; 44: 576-9.

Karbach U. Neuere befunde über mechanismen und regulation des intestinalen kalziuntransport. *Z Gastroenterol.* 1994;32:500-13.

---

Khan SR, Finlayson B, Hackett RL. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis in the rat. Role of the renal papilla. *Am J Pathol.* 1982;107:59.

Khan SR, Finlayson B, Hackett RL. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis in the cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:1109.

Khan SR, Finlayson B, Hackett RL. Histologic study of the early events in oxalate induced intranephronic calculosis. *Invest Urol.* 1979;17:199.

Khan SR, Glenton PA, Byer KJ. Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy- L-proline. *Kidney Int.* 2006;70:914-23.

Khan SR, Glenton PA. Experimental induction of calcium oxalate nephrolithiasis in mice. *J Urol.* 2010;184:1189-96.

Khan SR, Shevock PN, Hackett R. Urinary enzymes and CaOx urolithiasis. *J Urol.* 1989;142:846–9.

Khan SR. Experimental CaOx nephrolithiasis and the formation of human urinary stones. *Scann Microsc.* 1995;9:89–100.

Khan SR. Nephrocalcinosis in animal models with and without Stones. *Urol Res.* 2010;38:429–38.

Khan SR: Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol.* 1997;15:236-43.

Khandrika L, Koul S, Meacham RB, Koul HK. Kidney injury molecule-1 is up-regulated in renal epithelial cells in response to oxalate *in vitro* and in renal tissues in response to hyperoxaluria *in vivo*. *PLoS One.* 2012;7:1-7.

---

Kittredge WE, Downs R. The role of gout in the formation of urinary calculi. *J Urol.* 1952;67:841-9.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.

Li Y, McMartin KE. Strain differences in urinary factors that promote calcium oxalate crystal formation in the kidneys of ethylene glycol-treated rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296:1080.

Liu J, Cao Z, Zhang Z, Zhou S, Ye Z. A comparative study on several models of experimental renal calcium oxalate stones formation in rats. *J Huazhong Univ Sci Technol.* 2007;27:83-7.

Lotan Y, Jiménez IB, Lenoir-Wijnkoop I, Daudon M, Molinier L, Tack I, et al. Increased Water Intake as a Prevention Strategy for Recurrence of Urolithiasis: Major Impact of Compliance on Cost-Effectiveness. *J Urol.* 2012; 12:1-3.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

Mandel NS, Henderson JD Jr, Hung LY, Wille DF, Wiessner JH. A porcine model of calcium oxalate kidney stone disease. *J Urol.* 2004;171:1301-3.

McHarg T, Rodgers A, Charlton K. Influence of cranberry juice on the urinary risk factors for calcium oxalate kidney stone formation. *B J Urol.* 2003; 92: 765-8.

Otocka A, Jabłońska J, Głowińska-Olszewska B, Porowski T, Bossowski A. Metabolic acidosis in children with newly diagnosed type 1 diabetes and risk factors of urolithiasis. 2012;18:101-6.

---

Pak CYC. Citrate and renal calculi: an update. *Mineral Electrolyte Metab.* 1994;20:371–7

Patel PK, Patel MA, Saralai MG, Ghandi TR. Antiurolithiatic effects of *Solanun xanthocarpum* fruit extract on Ethylene-Glycol-Induced Nephrolithiasis in rats. *J Young Pharm.* 2012;4:164-70.

Poldelski V, Johnson A, Wright S, Rosa VD, Zager RA. Ethylene glycol mediated tubular injury: identification of critical metabolites and injury pathways. *Am J Kidney Dis.* 2001;38:339–48.

Robinson M, Pond CL, Laurie RD, Bercz JP, Hennigsen G, Condie LW. Subacute and subchronic toxicity of ethylene glycol administered in drinking water to Sprague–Dawley rats. *Drug Chem Toxicity.* 1990;13:43–7.

Santos SB. Elementos traço em soro sanguíneo medidos pelos métodos PIXE e ICP-MS [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Física, Universidade de São Paulo; 2007.

Serra A, Correia M. Nefrocalcinose medular humana. *Rev Port Nefrol Hipert.* 2001;18:15-32.

Siener R. Impact of dietary habits on stone incidence. *Urol Res.* 2006;34:131-3.

Soygur T, Akbay A, Kupeli S. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and residual fragments after shockwave lithotripsy in lower caliceal calcium oxalate urolithiasis: a randomized controlled trial. *J Endourol.* 2002;16:149-52.

Tabacniks MH. Calibração do sistema PIXE-SP de análise elementar [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Física, Universidade de São Paulo; 1983.

---

Toblli JE, Ferder L, Stella I, Angerosa M, Inserra F. Enalapril prevents fatty liver in nephrotic rats. *J Nephrol.* 2002;15:358-67.

Toblli JE, Ferder L, Stella I, De Cavanaugh, Angerosa M, Inserra F. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade by losartan on tubulointerstitial lesions caused by hyperoxaluria. *J Urol.* 2002;168:1550-5.

Tostes V, Cardoso LR. Recentes avanços em litíase urinária. *J Bras Nefrol.* 2001;23:166-73.

Turnberg LA, Riley SA. Digestion and absorption of nutrients and vitamins. In: Sleisenger MH, Fordtran JS: *Gastrointestinal disease.* 5ª ed. Philadelphia: Saunders; 1993. p. 977-1008.

Water R, Boevé ER, van Miert PP, Deng G, Cao LC, Stijnen T, et al. Experimental nephrolithiasis in rats: the effect of ethylene glycol and vitamin D3 on the induction of renal calcium oxalate crystals. *Scann Microsc.* 1996;10:591-601.

Whalley NA, Meyers AM, Martins M, Margolius LP. Long-term effects of potassium citrate therapy on the formation of new stones in groups of recurrent stone formers with hypocitraturia. *Br J Urol.* 1996;78:10-4.

Zar JH. *Biostatistical analysis,* 5 th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 2009.

---

Anexo



## Anexo 1- Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL "JÚLIO DE MESQUITA"  
FACULDADE DE MEDICINA





Comitê de Ética em Pesquisa (CEEA)  
Comitê de Ética em Biotecnologia (COBEA)

# Certificado

Certificamos que (Protocolo CEEA 880-2011) Nefrolitíase induzida pela hiperovulária: Modelo experimental em ratos, a ser conduzido por Natália Bonaldi Cunha, orientado pelo Prof. Dr. João Luiz Amaro, com a colaboração de Carmen Regina Petean Ruiz Amaro, Marina Borges Curralo, Patrícia Capuzzo Garcia Damásio e Thaisa de Assis, com o apoio técnico de José Lucas de Carvalho e Lindalva Capreletto Bagliani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotada pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Bet Moraes Silva  
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capellupp  
Secretário da CEEA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 28/04/2011.

Dairios Rubião Junior, MEd - Botucatu - SP CEP: 16.011-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143 e-mail: secretaria\_ceeda@fmb.unesp.br