



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA

Isabela Bertanholi Leme da Silva

Avaliação dos efeitos da suplementação da dieta  
com *cranberry* na nefrolitíase induzida em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano

Botucatu

Isabela Bertanholi Leme da Silva

Avaliação dos efeitos da suplementação da dieta com  
*cranberry* na nefrolitíase induzida em ratos

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano

Botucatu  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Isabela Bertanholi Leme da.

Avaliação dos efeitos da suplementação da dieta com *cranberry* na nefrolitíase induzida em ratos / Isabela Bertanholi Leme da Silva. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Paulo Roberto Kawano  
Capes: 40500004

1. *Vaccinium macrocarpon*. 2. Nefrolitíase. 3. Etilenoglicol. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: *cranberry*; etileno glicol; nefrolitíase; ratos.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Bia e Paulo**, meus exemplos de vida, que me motivaram a seguir.  
Que sempre acreditaram e investiram em mim, não medindo esforços para que eu  
chegasse até aqui.

Aos meus padrinhos, **Sandra e Marcos**, meus segundos pais, que sempre  
estiveram presentes na minha formação pessoal.

Aos meus tios, **Lita e Rogério**, que estão sempre presentes, exemplos de força e  
garra.

As minhas primas, **Ana Flávia e Juliana**, por me darem a certeza de que não estou  
sozinha nessa caminhada.

E a toda minha família, que mesmo não tão presentes são meus exemplos de vida.  
Obrigada por fazerem parte da minha vida.

**Amo todos vocês!**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre presente na minha vida, me proteger e iluminar meu caminho. Agradeço-O por me dar forças e me acalmar nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano**, pela orientação segura e por ser exemplo de paciência e dedicação ao ensino e pesquisa. E ainda, por me ensinar valores muito maiores do que a ciência poderia explicar.

Ao meu colega nutricionista, **Matheus Augusto Callegari**, que me ajudou com o experimento, sem ele este trabalho não teria sido completo.

Aos **animais** que doaram suas vidas por estes resultados.

Aos funcionários da seção de pós graduação, do Programa de Bases Gerais da Cirurgia e as funcionárias do Departamento de Urologia, por toda a atenção e colaboração.

Às minhas duas grandes famílias de Botucatu, **ToaToa e Coxera**, pela amizade e ótimos momentos que compartilharam comigo.

Às minhas irmãs de coração, **Juliana Arruda Ramos, Nadia Maebara Bueno e Mayara Zanote**, por estarem presentes nesta fase da minha vida, sempre me ajudando, me acalmando e me suportando nos meus piores momentos.

E toda equipe do meu trabalho, **UPECLIN**, por me apoiarem nos meus momentos de tensão e por todo crescimento profissional que me foi ensinado.

Agradeço também a todas as outras pessoas que não foram aqui citadas, que de alguma maneira me ajudaram e torceram por mim.

**Muito Obrigada!**

“Viva como se fosse morrer amanhã.  
Aprenda como se fosse viver para sempre.”

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

SILVA, IBL. **Avaliação dos efeitos da suplementação da dieta com *cranberry* na nefrolitíase induzida em ratos.** 2018. 71f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

**Introdução:** Embora a LTU seja conhecida pela humanidade desde a antiguidade, o real mecanismo envolvido na formação do cálculo renal ainda não foi completamente esclarecido. Trata-se de um processo complexo, envolvendo uma doença multifatorial resultante de interações entre fatores ambientais, predisposição genética e distúrbios metabólicos. Alterações nos fatores dietéticos têm sido propostas para prevenir ou minimizar o risco da litíase recorrente. Dentre estes fatores, o *cranberry* tem sido sugerido como potencial agente terapêutico capaz de atenuar os efeitos da hiperoxalúria, porém com resultados ainda controversos.

**Objetivo:** Avaliar as eventuais repercussões metabólicas e histológicas decorrentes da suplementação oral da dieta com *cranberry*, sobre as alterações morfológicas e urinárias secundárias à hiperoxalúria provocada por agentes indutores, em um modelo experimental em ratos.

**Métodos:** Foram utilizados 40 ratos machos da raça Sprague-Dawley, randomicamente distribuídos em quatro grupos: GRUPO 1 (G1: n=7) controle clínico; GRUPO 2 [G2: Etileno glicol (EG) a 0,5%+vitamina D3 (VD3), n=11] no qual a hiperoxalúria foi induzida a partir da administração de EG diluído em água e ofertado em associação com a VD3 (Colecalciferol) na dose de 0,5  $\mu$ M; GRUPO 3 [G3: EG 0,5%+VD3+*Cranberry*]; n=11] cujos animais receberam as mesmas drogas ofertadas ao G2 acrescido de xarope de *cranberry* na dose de 800mg/kg peso/dia; GRUPO 4 (G4, n=11) animais suplementados apenas com a *cranberry* na mesma dose do G3. Foi coletada urina de 24 horas após 28 dias de intervenção para estudo metabólico. Neste dia os animais foram eutanasiados e os rins removidos para análise histopatológica/morfométrica, análise do estresse oxidativo no parênquima renal, bem como dosagem do cálcio no parênquima.

**Resultados:** Dentre os parâmetros urinários avaliados, observou-se significativa redução do citrato em todos os grupos em relação ao controle, enquanto que o oxalato mostrou-se significativamente aumentado nos G2 e G3 quando comparado ao G1 (85,8, 93,6 e 51,7 mg/24h, respectivamente). O cálcio urinário foi

significativamente menor nos grupos induzidos (G2: 0,84, G3: 1,07 e G1: 1,76mg/dL). A análise histomorfométrica revelou que apenas os animais dos G2 e G3 desenvolveram nefrolitíase sem, no entanto, apresentar diferença significativa entre si na contagem dos cristais intratubulares. Da mesma forma, considerando-se a análise histopatológica, apenas os animais induzidos (G2 e G3) exibiram atrofia, extravasamento estromal e infiltrado inflamatório no parênquima renal, em um padrão bastante semelhante entre os dois grupos. A análise do estresse oxidativo demonstrou níveis aumentados de hidroperóxido de lipídio no grupo induzido (G2), quando comparado aos demais grupos. A quantificação do cálcio no parênquima renal foi significativamente maior em G2 e G3 quando comparado aos grupos sem indução.

**Conclusão:** Embora a suplementação alimentar com *cranberry* tenha apresentado alguns efeitos positivos sobre a análise do estresse oxidativo, tais benefícios não foram suficientemente relevantes para impactar positivamente na redução da deposição dos cristais de oxalato de Cálcio e/ou na prevenção dos danos histológicos ao parênquima renal dos animais submetidos ao modelo de indução de hiperossalúria.

**Palavras-chave:** *cranberry*, etileno glicol, nefrolitíase, ratos

## ABSTRACT

SILVA, IBL. **Evaluation of the effects of cranberry diet supplementation in nephrolithiasis induced in rats.** 2018. 71f. Thesis (Doctoral) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

**Introduction:** Although the importance of UTL, the actual mechanism involved in kidney stone formation has not yet been fully elucidated. It is a complex process, involving a multifactorial disease resulting from interactions between environmental factors, genetic predisposition and metabolic disorders. Changes in dietary factors have been proposed to prevent or minimize the risk of recurrent lithiasis. Among them, cranberry has been suggested as a potential therapeutic agent that can minimize the hyperoxaluria effects. However, the results are controversial.

**Objective:** Evaluate the possible metabolic and histological repercussions resulting from oral supplementation with *cranberry*, on the morphological and urinary alterations secondary to hyperoxaluria, in an experimental model in rats.

**Methods:** It was used 40 Sprague Dawley male rats and were randomized into four groups: Group 1 [(G1: n = 7) clinical control]; Group 2 [G2: Ethylene glycol (EG) 0.5% + Vitamin D3 (VD3), n = 11], which hyperoxaluria was induced by the administration of EG diluted in water and offered in association with VD3 (Cholecalciferol) at a dose of 0.5 uM; Group 3 [G3: 0.5% EG + VD3 + *cranberry*; n = 11], which the animals received the same drugs offered to the G2 plus *cranberry* at a dose of 800mg / kg body weight / day; Group 4 (G4, n = 11) which the animals are supplemented only with the same dose of *cranberry* in G3. 24 hours urine was collected after 28 days of intervention for metabolic study. On this day the animals were euthanized and the kidneys removed for histopathological / morphometric analysis; oxidative stress analysis; and measurement of renal parenchymal calcium.

**Results:** Among the urinary parameters evaluated, there was significant reduction in the citrate in all the groups compared to the control group, while the oxalate was significantly increased in G2 and G3 compared to G1 (85.8, 93.6 and 51.7mg/24h, respectively). The urinary calcium was significantly lower in the induced groups (G2: 0.84, G3: 1.07 and G1: 1.76 mg/dL). Histomorphometric analysis revealed that only the animals of G2 and G3 developed nephrolithiasis without, however, no substantially differences from each other in the counting of intratubular crystals were

found. Similarly, considering the histopathologic analysis, only the induced animals (G2 and G3) exhibited atrophy, stromal extravasation and inflammatory infiltrate in the renal parenchyma in a similar pattern between the two groups. Regarding to the analysis of oxidative stress, an increase of lipid hydroperoxide levels was found in induced group (G2), while compared with all others. As expected, the quantification of calcium in the renal parenchyma was significantly higher in G2 and G3 as compared to groups without induction.

**Conclusion:** Although dietary supplementation with cranberry had some positive effects on the oxidative stress analysis, these benefits were not sufficiently relevant to reduce the deposition of Calcium Oxalate crystals and / or the prevention of histological damage to the renal parenchyma in rats with secondary hyperoxaluria obtained from the administration of induced agents.

**Key-words:** *cranberry*, ethylene glycol, nephrolithiasis, rats

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Acondicionamento dos animais em gaiola metabólica .....	<b>22</b>
<b>Figura 2</b> - Animal na gaiola metabólica .....	<b>24</b>
<b>Figura 3</b> - Fluxograma do desenho do estudo .....	<b>26</b>
<b>Figura 4</b> - Punção vesical* .....	<b>27</b>
<b>Figura 5</b> - Mensuração do volume da urina de 24 horas .....	<b>28</b>
<b>Figura 6</b> - Punção cardíaca, sob sedação, para coleta de sangue (determinação da creatinina sérica) .....	<b>29</b>
<b>Figura 7</b> - Ilustração do Programa Image J® com grade de 100 pontos gerada sobre a lâmina.....	<b>30</b>
<b>Figura 8</b> - Triturador de partes moles .....	<b>33</b>
<b>Figura 9</b> - Pastilhador .....	<b>34</b>
<b>Figura 10</b> - Pastilha posicionada em feixe iônico.....	<b>35</b>
<b>Figura 11</b> - Fluorescência de Raio X .....	<b>36</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Comparação do peso e da média da ingestão de ração e de líquidos pelos animais, segundo o grupo, entre os diferentes momentos: .....	<b>38</b>
<b>Tabela 2</b> - Comparação da média do pH urinário, segundo o grupo, nos diferentes momentos:.....	<b>39</b>
<b>Tabela 3</b> - Média e desvio padrão do volume urinário em 24 horas, segundo grupo: .....	<b>39</b>
<b>Tabela 4</b> - Média e desvio padrão do cálcio na urina 24 horas, segundo o grupo: ...	<b>40</b>
<b>Tabela 5</b> - Valores médios dos parâmetros urinários, Citrato e Oxalato (mg/24h), segundo os grupos: .....	<b>41</b>
<b>Tabela 6</b> - Valores médios e desvio padrão da creatinina sérica, segundo grupo: ...	<b>41</b>
<b>Tabela 7</b> - Valores médios e desvio padrão da atividade das principais enzimas envolvidas no estresse oxidativo do parênquima renal, segundo grupo: .....	<b>44</b>
<b>Tabela 8</b> - Valores médios do cálcio quantificado no parênquima renal, segundo grupo: .....	<b>44</b>

## Lista de Gráficos

<b>Gráfico 1</b> - Número médio de cristais por animal utilizando software Image J, segundo os diferentes grupos de estudo .....	<b>42</b>
--	-----------

## Lista de Abreviaturas

°C	Grau Celsio
µM	Micromol
24h	Vinte e quatro horas
ANOVA	Análise de variância
BHT	Butirato hidroxituloeno
Ca	Cálcio
CAT	Catalase
CEMIB	Centro Multi Institucional de Bioterismo da UNICAMP
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EO	estresse oxidativo
ERRO	espécies reagentes de oxigênio
Fe <sup>2+</sup>	Sulfato ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Íon férrico
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramma
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSSG	Glutationa oxidada
HE	Hematoxilina e eosina
IFUSP	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
Kg	Quilograma
LOOH	hidroperóxido de lipídeo
LTDA	Limitada
LTU	Litíase do trato urinário
M	Mol
Mg	Miligrama
ml	Mililitro

NADPH <sub>2</sub>	Di-hidrogenofosfato de adenina dinucleótido nicotinamida
NBT	Nitroblue-tetrazólico
Nm	Nanômetro
Nmol	Nanomole
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Oxigênio
OxCa	Oxalato de Cálcio
PT	Proteínas totais
RJ	Rio de Janeiro
Rpm	Rotações por minuto
RX	Raio X
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
UNESP	Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental
VetLab	Laboratório Veterinário de Petrópolis
xG	Número de vezes (x) aplicada sobre a gravidade (g)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVO .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1. Animais de experimentação.....	22
3.2. Grupos experimentais .....	23
3.3. Delineamento do estudo e sequencia experimental .....	24
3.4. Exames Laboratoriais .....	26
3.4.1. Urina .....	26
3.4.2. Urina 24 horas .....	27
3.4.3. Sangue .....	28
3.5. Quantificação Histomorfométrica da Nefrocalcinose.....	29
3.6. Análise do Estresse Oxidativo .....	31
3.6.1. Determinação da concentração de Hidroperóxido de Lipídio .....	31
3.6.2. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	31
3.7. Quantificação do Cálcio no Parênquima Renal .....	32
3.7.1. Preparo das amostras.....	32
3.7.2. Fluorescência de raios X por dispersão de energia .....	34
3.8. Análise Estatística.....	36
4. RESULTADOS .....	38
4.1. Ganho de peso, ingestão de ração e líquidos .....	38
4.2. Avaliação dos parâmetros urinários.....	38
4.2.1. Análise microbiológica da urina .....	38
4.2.2. Análise do pH.....	39
4.2.3. Análise do volume urinário .....	39
4.2.4. Análise bioquímica da urina .....	40
4.3. Análise dos parâmetros séricos.....	41
4.4. Avaliação histomorfométrica .....	42
4.5. Avaliação histopatológica.....	42
4.6. Análise do estresse oxidativo .....	43
4.7. Análise da quantificação de Cálcio no parênquima renal .....	44
5. DISCUSSÃO .....	45
6. CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS.....	53

ANEXO 1 .....	58
ANEXO 2 – ARTIGO EM INGLÊS .....	59

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA COM CRANBERRY NA NEFROLITÍASE INDUZIDA EM RATOS**

### **1. INTRODUÇÃO**

A Litíase do Trato Urinário (LTU) é conhecida em todo o mundo há vários séculos, sendo documentado o seu primeiro registro na história a partir de cálculos urinários encontrados em múmias egípcias cerca de quatro mil anos antes de Cristo. Trata-se de uma afecção frequente na prática clínica diária, constituindo a terceira patologia mais comum do aparelho gênito-urinário, sendo superada apenas pelas infecções urinárias e doenças da próstata [1].

Dados epidemiológicos tem demonstrado um aumento da incidência e da prevalência da LTU em todo o mundo nas últimas décadas, fato este que pode ser explicado, em parte, pela melhora nas técnicas diagnósticas, bem como pelo aumento nas taxas de obesidade [2]. Tal fato tem colaborado para um aumento global dos custos com saúde em uma proporção preocupante. Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que os gastos com custos diretos, como serviços médicos e indiretos, como perda de produtividade no trabalho, girem em torno de US\$ 5 bilhões ao ano [3]. Já no Brasil, de acordo com o DATASUS de 2011, 69.039 admissões hospitalares ocorreram devido à LTU, correspondendo à 0,61% das internações hospitalares no SUS naquele período, gerando um gasto anual de mais de vinte e nove milhões de reais [4].

No entanto, embora a LTU seja conhecida desde a antiguidade, o real mecanismo envolvido na formação do cálculo renal ainda não foi completamente esclarecido. Trata-se de um processo complexo, envolvendo uma doença multifatorial resultante de interações entre fatores ambientais, predisposição genética e distúrbios metabólicos [5]: tais como raça, idade, gênero, profissão,

sedentarismo, aspectos higieno-dietéticos, geográficos, climáticos e hereditariedade, entre outros [6, 7].

Sabe-se que a composição da urina é claramente influenciada pela dieta. Esta correlação é tão significativa que alterações nos fatores dietéticos têm sido propostas para prevenir ou minimizar o risco da litíase recorrente [8]. O baixo volume urinário, por exemplo, é considerado por muitos como um dos fatores determinantes para ocorrência da LTU [9]. Por esta razão, pacientes litíasicos são aconselhados a aumentar a ingestão de líquidos para atingir um volume urinário em torno de dois litros/dia, na tentativa de diminuir o risco de formação de novos cálculos [10, 11]. De acordo com esta teoria, o aumento da ingestão líquida implicaria em uma maior diluição da urina reduzindo as concentrações de íons e a saturação dos sais que estão relacionados com a formação dos cálculos urinários. No entanto, o líquido ingerido deve ser escolhido com cautela, uma vez que cada tipo de bebida apresenta características particulares. De acordo com sua composição, podem alterar as propriedades físico-químicas na urina e, interferir com a formação dos cristais, exercendo assim um impacto direto sobre a incidência de novos cálculos [12, 13].

Estudos clássicos já demonstraram que muitos fluídos, como bebidas carbonatadas, suco de *grapefruit* [14] e refrigerantes à base de cola [15], podem ser responsáveis por aumentar o risco de formação de cálculos nas vias urinárias. Por outro lado, muitos outros foram eficientes em prevenir recidivas, como a água mineral [16], chás de frutas e ervas [17], suco de laranja [12] e o suco de limão [18].

O *Cranberry* (*Vaccinium Macrocarpon*), também conhecido como mirtilo vermelho, é uma fruta que faz parte da família da *Ericaceae*, que se desenvolve em ambientes úmidos, como florestas e pântanos, principalmente, nos países norte

americanos [19]. É composto por 88% de água, sendo rico em ácidos orgânicos (ácido acetil salicílico), vitamina C, magnésio, flavonóides, catequinas e antocianidinas. Pode ser facilmente encontrado na forma de frutas secas, extratos e sucos, os quais contêm cerca de 10 à 25% da fruta concentrada [20]. Suas aparentes propriedades terapêuticas tornam o *cranberry* mundialmente conhecido como benéfico à saúde, com inúmeros estudos avaliando seu papel na prevenção das infecções do trato urinário, na desobstrução de cateteres e, até mesmo, auxiliando a cicatrização da pele ao redor de estomas [21, 22].

Considerando-se a etiopatogenia da litíase, é sabido que o citrato exerce papel fundamental neste processo, inibindo a formação de complexos solúveis com o cálcio. Tal importância pode ser facilmente comprovada avaliando-se pacientes portadores de hipocitratúria, uma desordem urinária frequente em formadores crônicos de cálculos de OxCa. Já foi demonstrado que a administração de sais de citrato nestes pacientes aumenta o citrato urinário e, conseqüentemente, auxilia no retardo da recidiva e na prevenção de novos cálculos. Como o suco de *cranberry* é rico em ácido cítrico, presume-se que sua ingestão regular poderia elevar os níveis de citrato urinário, auxiliando assim na redução da ocorrência da LTU [23].

Conforme sugerido por Lee e colaboradores [24], outra potencial vantagem do suco de *cranberry* seria a sua atividade antibacteriana, uma vez que a formação de cálculos à base de cálcio pode ser potencializada pela ocorrência de infecções urinárias de repetição. Sendo assim, as propriedades antibacterianas e de anti-adesão do *cranberry* poderiam ajudar a inibir a fixação de cristais de OxCa ao urotélio [25]. Outro efeito do consumo do *cranberry* seria a elevação dos níveis de ácido quínico no organismo, gerando aumento da excreção de ácido hipúrico na

urina, o qual é um agente bacteriostático [26] e apresenta potencial para acidificar a urina [27].

Conforme dito anteriormente, é importante ressaltar ainda que o *cranberry* possui vários compostos bioativos [28], dentre eles o ácido ascórbico e os flavonoides, os quais apresentam importante atividade antioxidante [29]. Dessa forma, tais compostos atuam combatendo o estresse oxidativo gerado no processo de formação do cálculo renal, fato este já demonstrado em diversos estudos com extratos de plantas com atividade antioxidante [30].

Embora os potenciais benefícios do consumo do *cranberry* sejam promissores, há poucos estudos avaliando os reais impactos da sua ingestão sobre o metabolismo e seus efeitos na etiologia e prevenção da litíase do trato gênito-urinário. Dentre os escassos trabalhos atualmente disponíveis na literatura, a falta de padronização nas doses utilizadas bem como a interferência de fatores dietéticos associada à grande heterogeneidade das populações estudadas [31,32], tornam os resultados conflitantes e pouco conclusivos.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar as eventuais repercussões metabólicas e histológicas decorrentes da suplementação oral da dieta com *cranberry*, sobre as alterações morfológicas e urinárias secundárias à hiperoxalúria provocada por agentes indutores, em um modelo experimental em ratos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais de experimentação

Foram utilizados 40 ratos da raça *Sprague-Dawley*, adultos machos, pesando entre 200 e 300 gramas, obtidos no Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas no Biotério da Unidade de pesquisa Experimental - UNIPLEX, com livre acesso à água e ração para ratos uma semana antes do início do experimento, para adaptação ao novo ambiente e detecção de possíveis problemas clínicos (Figura 1). A temperatura foi mantida em 22°C com ciclo de iluminação de 12 horas.



**Figura 1** – Acondicionamento dos animais em gaiola metabólica

Este trabalho foi previamente submetido à análise e aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Instituição, de acordo com as normas de ética vigentes para pesquisa animal (Certificado nº 1102/2014 – CEUA) (ANEXO 1).

### 3.2. Grupos experimentais

Os animais foram randomizados em quatro grupos assim constituídos:

- i. GRUPO I (n=7): Controle clínico.

Neste grupo, os animais não foram submetidos a nenhuma intervenção.

- ii. GRUPO II (n=11): Etileno glicol a 0,5% + Vitamina D3.

Neste grupo, os animais receberam Etileno Glicol a 0,5% (Fabricado pela SIGMA ALDRICH®) diluído em água, e ofertado “*ad libitum*”. Objetivando a potencialização do agente indutor, a Vitamina D3 (Colecalciferol – Manipulada pela Farmácia Cruz Vermelha® Fórmulas e Cosméticos) foi dissolvida em 1 ml de óleo comestível e administrada via gavagem uma vez ao dia, na dose de 0,5 µM, conforme modelo padronizado por Cunha e colaboradores (2013) [31].

- iii. GRUPO III (n=11): Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3 + 800mg/kg de peso do animal por dia de *cranberry*.

Neste grupo, além da indução com Etileno Glicol e Vitamina D, os animais receberam xarope de *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon* – Manipulado pela Magistral Pharma®), na dosagem de 800mg/kg peso do animal, administrado via gavagem uma vez ao dia.

- iv. GRUPO IV (n=11): 800mg/kg peso do animal, por dia, de *cranberry*.

Neste grupo, os animais receberam somente o xarope de *cranberry* na dosagem de 800mg/kg peso do animal, administrado via gavagem uma vez ao dia.

### 3.3. Delineamento do estudo e sequencia experimental

Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas (Figura 2) a fim de permitir adequado controle da ingestão de sólidos e líquidos, bem como a coleta da diurese no período de 24 horas. O experimento teve duração de quatro semanas (28 dias).



**Figura 2** - Animal na gaiola metabólica

Diariamente era realizada a pesagem dos animais, aferição do volume urinário, a quantificação da ração ingerida em 24 horas e a reposição das mamadeiras de água, com aferição do volume ingerido por cada animal. Nos grupos 2 e 3 era realizada diluição do agente indutor com etileno glicol na dose de 0,5%.

A suplementação da Vitamina D3 nos grupos II e III foi feita via gavagem dissolvendo-se em um mililitro de óleo comestível, uma vez ao dia, na dose de 0,5  $\mu$ M. Na sequência, era realizada a suplementação com xarope de *cranberry* nos grupos III e IV, também por gavagem, na dosagem de 800mg/kg peso do animal. O cálculo da dosagem a ser administrada foi realizado de acordo com a pesagem

diária dos animais, considerando-se que o xarope apresentava concentração de 300mg de extrato seco por ml de líquido.

No segundo dia do experimento, considerado momento M0, foi colhida urina de 24 horas de cada animal para análise do pH, cálcio, oxalato, citrato e ácido úrico. Tal procedimento foi repetido ao final de quatro semanas (momento M1), para análise dos mesmos parâmetros.

Ao término do período de intervenção (28 dias), os animais foram imobilizados para coleta das amostras de material de interesse da pesquisa. Com o animal fixado pelas quatro patas, imediatamente após antissepsia com iodopolidine tópico e colocação do campo oftálmico estéril, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (Hypnol 3%® - Syntec, Brasil) na dose de 0,1 ml/100g de peso do animal, por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada a punção cardíaca para coleta de sangue, destinada à análise da creatinina. A parede abdominal foi incisada longitudinalmente para exposição da bexiga e realizou-se a coleta da amostra de urina estéril para avaliação microbiológica. Os animais foram então eutanasiados utilizando-se dose letal de pentobarbital sódico a 3% (Hypnol 3%® - Syntec, Brasil) na dose de 2,5 a dose anestésica, por via intraperitoneal. A (Figura 3) ilustra o tempo e as intervenções realizados no estudo.

Imediatamente após a parada cardiorrespiratória do animal, realizou-se a nefrectomia bilateral. Os rins foram pesados em balança analítica de precisão digital. O rim esquerdo foi identificado para posterior análise do cálcio no parênquima pelo método de fluorescência de raios X (RX) por dispersão de energia. Com auxílio de lâmina cirúrgica fria, o rim direito foi bivalvado, sendo uma das partes congelada a -80°C para análise do estresse oxidativo. A outra metade foi fixada em formol e incluída em bloco de parafina para estudo histopatológico e histomorfométrico.

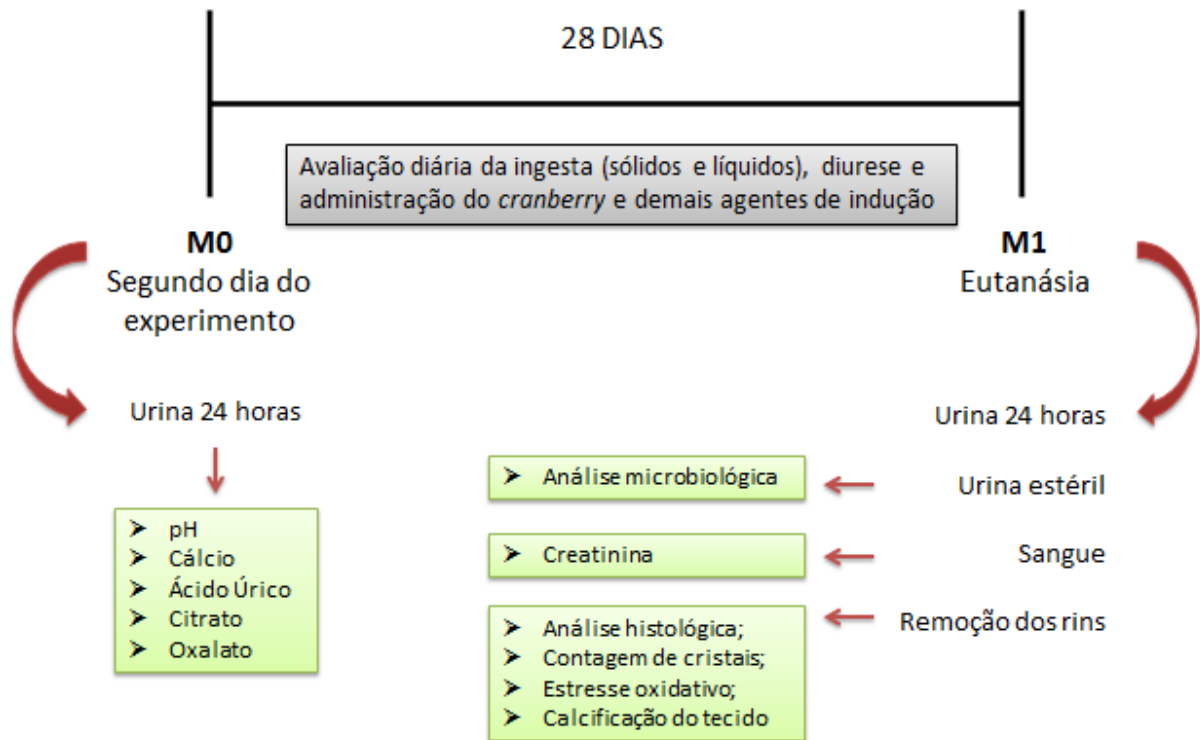


Figura 3 - Fluxograma do desenho do estudo

### 3.4. Exames Laboratoriais

#### 3.4.1. Urina

Imediatamente antes da eutanásia, a urina foi coletada em tubo estéril por meio de punção vesical utilizando seringa de 1 ml e agulha 13x45, estéreis (BD®ultrafine, Brasil) (Figura 4). A amostra foi refrigerada a 4° C e enviada para cultura no Serviço de Diagnóstico Microbiológico e Micológico do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP de Botucatu.



**Figura 4 - Punção vesical\***

\* O campo cirúrgico foi removido para facilitar a aquisição das imagens.

### **3.4.2. Urina 24 horas**

Os animais, acondicionados em gaiolas metabólicas individuais, tiveram os volumes de diurese aferidos diariamente utilizando-se proveta graduada em mililitros (Figura 5). O pH urinário foi determinado por meio de tiras reagentes utilizando-se método colorimétrico comparativo (papel indicador de pH 0-14, da Merck®), antes do congelamento das amostras. Tais medidas foram efetuadas em dois momentos distintos, no segundo e no último dia de experimento.

As alíquotas de urina para análise do oxalato e citrato foram respectivamente de 2 ml e 1 ml, sendo armazenadas separadamente, congeladas e conservadas em ácido clorídrico na concentração de 16µl de ácido clorídrico para cada mililitro (ml) de urina coletada. As determinações de oxalato e citrato foram realizadas na VetLab – Laboratório Veterinário de Petrópolis (RJ).

O restante das amostras de urina obtidas em M0 e M1 foram congeladas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior leitura do cálcio e ácido úrico, as quais foram realizadas no Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP Campus de Botucatu.



**Figura 5** - Mensuração do volume da urina de 24 horas

### 3.4.3. Sangue

Após a sedação do animal, uma amostra de cerca de 3 mililitros de sangue foi obtida por punção cardíaca com agulha 30 x 0,7 acoplada à seringa de 5ml (BD<sup>®</sup>) (Figura 6) para posterior determinação da creatinina sérica. O sangue de cada animal foi colocado em tubo de vidro seco e deixado em repouso por 15 minutos para retração do coágulo. A seguir, foram colocados em centrífuga (*Excelsa baby II Modelo 206-R*) a 2500 rotações por minutos (rpm) durante 15 minutos para desagregação do soro. As amostras foram identificadas, congeladas e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em freezer, até o momento da dosagem da creatinina sérica pelo método automatizado *Cobas Mira Plus*, no Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP Campus de Botucatu.



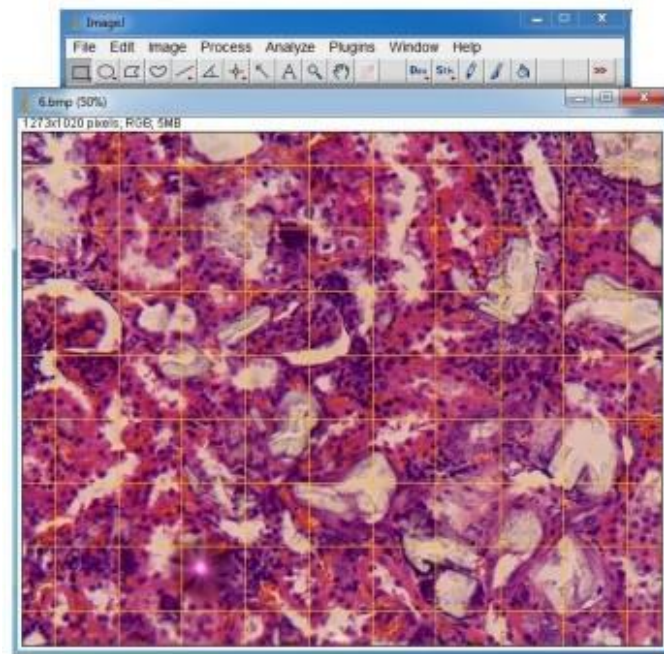
**Figura 6** - Punção cardíaca, sob sedação, para coleta de sangue (determinação da creatinina sérica)

### 3.5. Quantificação Histomorfométrica da Nefrocalcinose

A metade do rim direito, previamente incluída em bloco de parafina, foi seccionada na posição longitudinal com 5 $\mu$ m de espessura e os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), conforme técnica padronizada por JUNQUEIRA & CARNEIRO (2004) [33].

As lâminas foram fotografadas com câmera digital (Sony® DCR-TRV 240) acoplada ao microscópio óptico (LEICA® DMLB) em aumento final de 40 vezes. Para avaliação da nefrocalcinose utilizou-se o software *Image J*® versão 1.44 (NIH, Bethesda, USA) onde dois examinadores independentes contaram, de maneira cega, os cristais localizados no parênquima e túbulos renais em cinco regiões aleatórias para cada lâmina. A metodologia consistiu na utilização do *plug-in grid* do *Image J*® a partir de uma grade com 100 pontos por campo. Os cálculos localizados nos pontos de intersecção das linhas da grade gerada pelo programa foram

contados e a média obtida a partir das leituras realizadas pelos dois examinadores foi considerada como o número de cristais presentes em cada animal (Figura 7).



**Figura 7** - Ilustração do Programa Image J® com grade de 100 pontos gerada sobre a lâmina

A análise histopatológica por microscopia óptica foi realizada por um único patologista, de maneira cega utilizando-se software Panoramic Viewer®, segundo os critérios abaixo:

- Atrofia tubular: utilizou-se "A" quando ausente, "L" quando leve (um a dois focos de atrofia num campo de aumento de 40x), "M" quando moderada (três focos de atrofia num campo de aumento de 40x) e "I" quando intensa (quatro ou mais focos de atrofia num campo de aumento de 40x).

- Extravasamento estromal dos cristais: classificou-se "A" na ausência, "F" quando focal (um extravasamento num campo de aumento de 40x), "FD" para intermediário (dois a três extravasamentos num campo de aumento de 40x) e "D" para difuso (quatro ou mais extravasamentos nesse mesmo campo de aumento).

- Infiltrado inflamatório: classificou-se como ausente (A); leve (L) quando formado por somente 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.

### **3.6. Análise do Estresse Oxidativo**

As amostras de cerca de 200mg de tecido renal foram homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, em meio com tampão fosfato de sódio (0,01M) pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 12 000 xG, durante 15 minutos a -4°C [35]. O sobrenadante foi utilizado para as determinações da concentração de proteínas totais, hidroperóxido de lipídio e atividade das enzimas antioxidantes.

#### **3.6.1. Determinação da concentração de Hidroperóxido de Lipídio**

Na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilatohidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente, através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal ( $\text{Fe}^{2+}$ ) foi determinada a concentração de hidroperóxido de lipídio. A intensidade da coloração do cromógeno, formado por  $\text{Fe}^{3+}$  reagindo com alaranjado de xilenol, foi medida espectrofotometricamente [36].

#### **3.6.2. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes**

##### **3.6.2.1. Glutationa Peroxidase**

A atividade da glutaciona peroxidase (GSH-Px) foi determinada pela técnica enzimática-colorimétrica de NAKAMURA et al. (1974) [37] com peróxido de hidrogênio. Foram utilizados para a mistura da reação tampão fosfato de sódio,  $\text{NADPH}_2$ , azida sódica, EDTA, glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona redutase.

Dessa maneira, a atividade da GSH-Px foi determinada pela redução da glutathiona oxidada (GSSG) que é catalisada pela oxidação do NADPH<sub>2</sub> a 340nm na presença de glutathiona redutase.

### **3.6.2.2. Superóxido Dismutase**

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo método de EWING & JANERO [38], que tem como embasamento a capacidade da enzima de inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por meio de radicais livres originados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). Em temperatura ambiente, a hidroxilamina gera fluxo de O<sub>2</sub><sup>-</sup> do NBT para blue-formazana. A velocidade de redução do NBT foi inibida, quando a amostra foi adicionada, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra.

### **3.6.2.3. Catalase**

Foi utilizado tampão fosfato pH 7,0, em 0,5 mL de amostra e peróxido de oxigênio (30%) para determinação da atividade da enzima catalase. As leituras foram realizadas a 240nm [39].

## **3.7. Quantificação do Cálcio no Parênquima Renal**

### **3.7.1. Preparo das amostras**

Após a sua remoção, o rim esquerdo foi colocado em estufa de secagem (Retilinea, FANEM® LTDA) por 48 horas a 60°C para a extração total de umidade do órgão. A amostra resultante passou pelo triturador SPEX® Sample Prep (Geno/Grinder®) por quinze minutos a 1070 rpm, no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências, UNESP Campus de Botucatu (Figura 8).



**Figura 8** - Triturador de partes moles

O tecido já seco e triturado foi encaminhado ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP), onde o mesmo foi prensado na forma de pastilhas (Figura 9) para dosagem do cálcio no parênquima renal, utilizando-se feixes iônicos e fluorescência de Raio X.

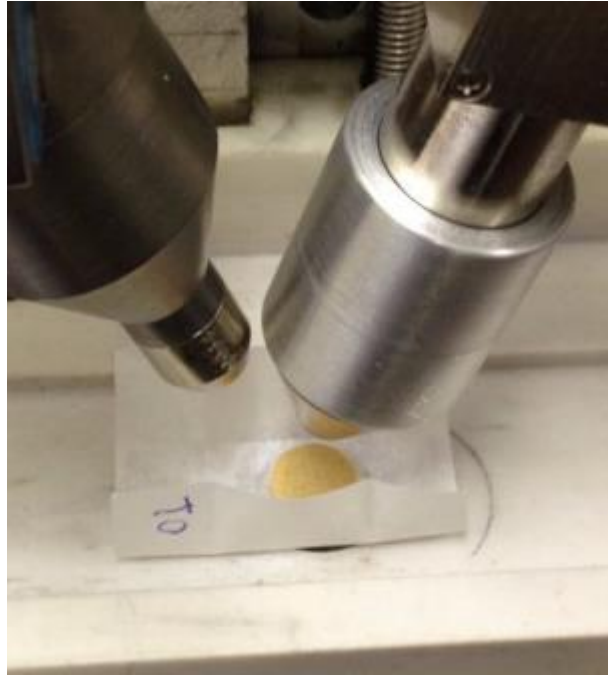


**Figura 9 - Pastilhador**

### **3.7.2. Fluorescência de raios X por dispersão de energia**

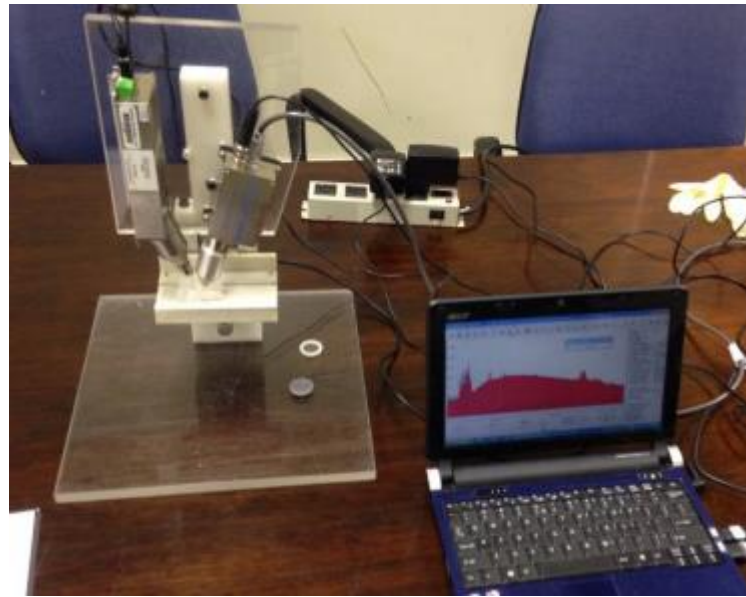
A fluorescência de raios X (RX) por dispersão de energia (ED-XRF) é uma técnica analítica multi-elementar baseada na medida dos RX característicos emitidos pelos elementos constituintes da amostra, quando devidamente excitada. Trata-se de um método não destrutivo capaz de identificar elementos químicos com número atômico maior que 12 (Mg) [40]. Nesta técnica, o parênquima renal liofilizado foi irradiado utilizando fontes radioativas emissoras de RX (Figura 10). A radiação incidente interagiu com a amostra provocando a ionização de seus átomos, ejetando elétrons das camadas mais internas, deixando-os num estado excitado instável. As vacâncias geradas foram então espontaneamente preenchidas por elétrons das camadas mais externas fazendo com que o átomo retornasse ao seu estado fundamental [41] resultando na emissão de RX característicos dos elementos constituintes da matéria, os quais apresentam uma energia específica, bem definida e conhecida para cada linha espectral do elemento analisado, neste caso, o cálcio.

As intensidades dos fótons emitidos estão relacionadas com as concentrações dos elementos na amostra.



**Figura 10** - Pastilha posicionada em feixe iônico

Os fótons emitidos pelos átomos com diferentes energias (isto é, RX correspondentes às diferentes transições de diferentes elementos) possuem diferentes amplitudes, os quais são distinguidos pelo analisador multicanal e registrados em diferentes canais formando um espectro [42]. Para identificar os elementos correspondentes aos picos do espectro foi necessário associar as energias de raios X detectados aos canais dos picos (Figura 11). A relação entre estes dois parâmetros define a calibração em energia [43]. O processamento dos espectros com auxílio de um programa computacional específico para este tipo de análise possibilitou a identificação dos elementos presentes na amostra e a extração das suas respectivas áreas, as quais foram proporcionais à concentração elementar de cálcio na amostra [44].



**Figura 11** - Fluorescência de Raio X

### **3.8. Análise Estatística**

A comparação das médias entre momentos e grupos foi feita utilizando um delineamento em medidas repetidas através do teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparação múltipla Tukey ajustado para as variáveis com distribuição simétrica. Nos casos de assimetria, o mesmo delineamento foi utilizado, ajustado em uma distribuição gama, seguido do teste de comparação múltipla de Wald.

Para os dados obtidos apenas no momento final, a comparação entre as médias dos diferentes grupos foi feita através de ANOVA seguido do teste de Tukey para variáveis simétricas ou ajuste de uma distribuição gama seguido do teste de Wald no caso de assimetria (considerando apenas para um fator de classificação).

Para analisar o número de cristais, apenas no momento final (M1), a comparação de médias entre grupos foi feita utilizando-se uma distribuição de Poisson seguido do teste de comparação múltipla de Wald.

Em todos os testes foi fixado o valor de significância de 5% ou p-valor correspondente. Todas as análises foram feitas no programa SAS for Windows versão 9.3.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ganho de peso, ingestão de ração e líquidos

No momento inicial, o grupo 3 apresentou peso discretamente maior quando comparado ao controle. Comparando-se o período total do experimento, observa-se que apenas os animais dos grupos G1 e G4 apresentaram ganho de peso significativo, enquanto que os grupos G2 e G3 mantiveram seu peso estável, associado ao menor consumo de ração.

Com relação à ingestão de líquidos, somente o grupo controle manteve a ingestão estável nos diferentes momentos (M0 e M1), enquanto que os demais grupos (G2, G3 e G4) apresentaram aumento significativo deste parâmetro ao longo do experimento. Estes dados estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Comparação do peso e da média da ingestão de ração e de líquidos pelos animais, segundo o grupo, entre os diferentes momentos:

Média dos Parâmetros	Inicial				Final			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
<b>Peso (g)</b>	304,72 <sup>aA</sup>	328,08 <sup>aA</sup>	337,63 <sup>bA</sup>	333,97 <sup>abA</sup>	345,72 <sup>aB</sup>	326,91 <sup>aA</sup>	324,61 <sup>aA</sup>	371,83 <sup>aB</sup>
<b>Ingestão de ração (g)</b>	20,03 <sup>aA</sup>	24,83 <sup>aA</sup>	21,85 <sup>aB</sup>	21,13 <sup>aA</sup>	25,19 <sup>bA</sup>	22,92 <sup>bA</sup>	16,73 <sup>aA</sup>	29,86 <sup>cB</sup>
<b>Ingestão de líquidos (ml)</b>	28,14 <sup>aA</sup>	46,91 <sup>bA</sup>	39,82 <sup>bA</sup>	29,89 <sup>aA</sup>	30,57 <sup>aA</sup>	58,73 <sup>cB</sup>	47,73 <sup>bB</sup>	36,67 <sup>aB</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação. Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatística entre diferentes momentos.

\* g= gramas; ml= mililitros

### 4.2. Avaliação dos parâmetros urinários

#### 4.2.1. Análise microbiológica da urina

Não houve crescimento bacteriano em nenhuma das amostras de urina enviadas para análise microbiológica.

#### 4.2.2. Análise do pH

A análise do pH urinário não revelou diferença estatística entre os grupos no momento inicial. Considerando-se o mesmo grupo, nos diferentes momentos, todos apresentaram aumento significativo do pH na urina. No momento final (M1), o pH urinário do G1 apresentou-se significativamente mais básico que os demais (Tabela 2).

**Tabela 2** - Comparação da média do pH urinário, segundo o grupo, nos diferentes momentos:

	Inicial				Final			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
<b>pH</b>	8 <sup>aA</sup>	7,91 <sup>aA</sup>	8 <sup>aA</sup>	8 <sup>aA</sup>	9 <sup>bB</sup>	8,36 <sup>aB</sup>	8,73 <sup>aB</sup>	8,5 <sup>aB</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação. Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatística entre diferentes momentos.

#### 4.2.3. Análise do volume urinário

O cálculo da média do volume urinário dos animais no período de 24 horas, durante todo o experimento, foi significativamente maior nos grupos G2 e G3, quando comparados aos grupos G1 e G4 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Média e desvio padrão do volume urinário em 24 horas, segundo grupo:

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>Volume urinário (ml)</b>	8,71 (3,86) <sup>a</sup>	32,82 (12,60) <sup>b</sup>	27,55 (7,23) <sup>b</sup>	11,67 (5,00) <sup>a</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação.

#### 4.2.4. Análise bioquímica da urina

A análise bioquímica dos diferentes parâmetros urinários no momento M0 não revelou diferença entre os grupos. Entretanto, ao final do experimento (momento M1) observou-se uma redução significativa do cálcio urinário nos grupos induzidos (G2 e G3), quando comparados ao controle G1. Quando considerados apenas os animais que receberam a indução, essa redução foi acentuadamente maior em G2. Não foi observada variação dos níveis de cálcio urinário entre os animais que receberam apenas o *cranberry* (G4).

A dosagem do ácido úrico na urina de 24 horas, no momento final (M1), não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os resultados estão demonstrados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Média e desvio padrão do cálcio na urina 24 horas, segundo o grupo:

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>Cálcio (mg/dL)</b>	1,76 (0,44) <sup>c</sup>	0,84 (0,28) <sup>a</sup>	1,07 (0,24) <sup>b</sup>	1,82 (0,71) <sup>c</sup>
<b>Ácido Úrico (mg/dL)</b>	6,57 (5,14) <sup>a</sup>	4,45 (4,23) <sup>a</sup>	3,39 (4,54) <sup>a</sup>	5,66 (4,87) <sup>a</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação.

Ao final do experimento a análise do citrato urinário demonstrou redução significativa em todos os grupos quando comparado ao controle (G1). Embora esta queda tenha sido menos pronunciada (em números absolutos) entre os animais induzidos e tratados com *cranberry* (G3) em relação ao grupo induzido (G2), não houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos.

A dosagem do oxalato na urina de 24 horas mostrou-se aumentada nos grupos G2 e G3 quando comparadas ao grupo controle (G1). O G4 manteve-se estatisticamente igual com controle G1 (Tabela 5).

**Tabela 5** - Valores médios dos parâmetros urinários, Citrato e Oxalato (mg/24h), segundo os grupos:

Parâmetros urinários	Final			
	G1	G2	G3	G4
<b>Citrato (mg/24h)</b>	1002,71 <sup>b</sup>	350,64 <sup>a</sup>	444,36 <sup>a</sup>	369,00 <sup>a</sup>
<b>Oxalato (mg/24h)</b>	51,7 <sup>a</sup>	85,8 <sup>b</sup>	93,6 <sup>b</sup>	62,5 <sup>a</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação.

#### 4.3. Análise dos parâmetros séricos

O valor obtido a partir da dosagem de creatinina sérica foi significativamente maior entre os animais pertencentes ao grupo que recebeu apenas indução com etileno glicol (G2). O grupo induzido e tratado com *cranberry* (G3) manteve os valores de creatinina próximos aos animais do grupo controle. Entretanto a administração isolada de *cranberry* (G4) mostrou redução significativa da creatinina sérica em relação ao controle. Estes dados estão representados da Tabela 6.

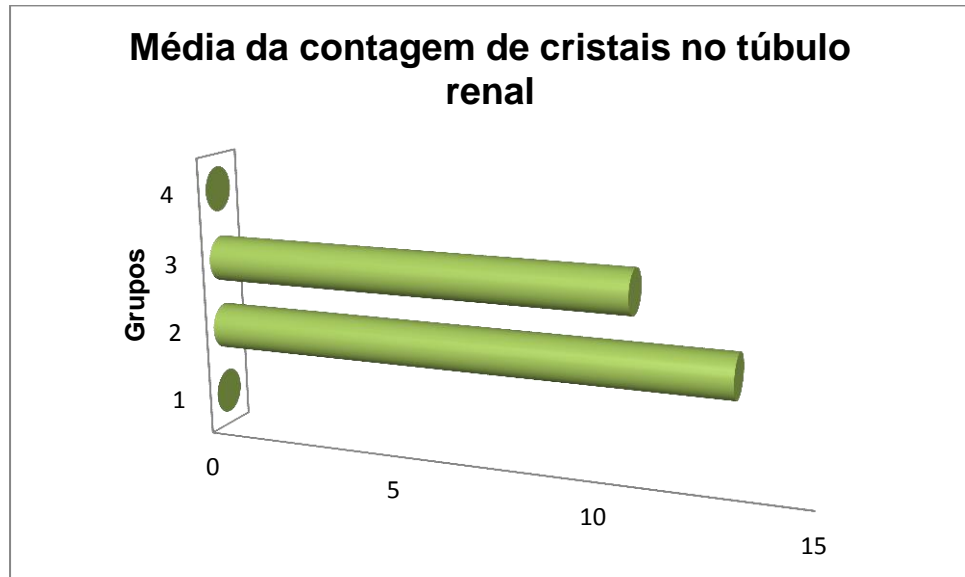
**Tabela 6** - Valores médios e desvio padrão da creatinina sérica, segundo grupo:

	Final			
	G1	G2	G3	G4
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,41 (0,08) <sup>b</sup>	0,5 (0,08) <sup>c</sup>	0,4 (0,11) <sup>b</sup>	0,29 (0,07) <sup>a</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação.

#### 4.4. Avaliação histomorfométrica

Conforme o esperado, apenas os grupos 2 e 3 apresentaram precipitação de cristais no rim, porém sem diferença significativa entre eles (Gráfico 1).



**Gráfico 1** - Número médio de cristais por animal utilizando software Image J, segundo os diferentes grupos de estudo

#### 4.5. Avaliação histopatológica

Todos os animais que foram submetidos à indução de hiperoxalúria (G2 e G3) apresentaram algum grau de atrofia tubular, porém sem diferença significativa entre os grupos. De acordo com a avaliação do patologista, a atrofia foi classificada como leve “L” em 9% dos animais, moderada “M” em 22% e intensa nos demais 68%. Não foi observada atrofia tubular nos demais grupos.

Da mesma forma, 100% dos animais induzidos apresentaram extravasamento estromal, sendo este classificado como (D) difuso na maioria dos animais do G2 (90%) e, como focal (F), em apenas 10% dos casos. No G3, 18% dos rins avaliados exibiram extravasamento: 27% intermediário e 55% D. Não foi observado extravasamento estromal nos demais grupos.

A presença de um infiltrado inflamatório difuso parenquimatoso foi identificada em 72% dos animais do grupo G2, sendo classificado como leve (L) em 37,5% dos casos, 50% como moderado (M) e 12,5% intenso (I). Já entre os animais do grupo G3, o infiltrado inflamatório esteve presente em 100% dos casos, sendo classificado como L em 27%, 63% como M e 10% como I. Os demais grupos não exibiram a presença de infiltrado inflamatório à avaliação histopatológica.

#### **4.6. Análise do estresse oxidativo**

Todos os grupos estudados apresentaram elevação significativa do hidroperóxido de lipídeo (LOOH) quando comparados ao grupo controle (G1), sendo os maiores níveis observados entre os animais que receberam a indução sem tratamento (G2).

A atividade da catalase (CAT), por sua vez, mostrou-se estável não sendo observada variação significativa entre os grupos quando comparados ao controle.

Da mesma forma, a enzima Glutathione Peroxidase (GPx) revelou comportamento semelhante entre os grupos, mantendo-se estável independentemente do tipo de intervenção.

A análise da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) demonstrou-se aumentada apenas entre os animais hiperoxalúricos tratados com *cranberry* (G3), não sendo observada variação deste parâmetro nos demais grupos. Estes dados estão ilustrados na tabela 7.

**Tabela 7** - Valores médios e desvio padrão da atividade das principais enzimas envolvidas no estresse oxidativo do parênquima renal, segundo grupo:

Estresse Oxidativo	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
LOOH (nmol/g de tecido)	145,35 (39,3) <sup>a</sup>	265,98 (51,1) <sup>c</sup>	196,89 (42,6) <sup>b</sup>	188,44 (31,9) <sup>b</sup>
CAT (micromol/g tecido)	38,49 (9,6) <sup>ab</sup>	40,14 (9,1) <sup>b</sup>	32,47 (4,9) <sup>a</sup>	39,61 (6,9) <sup>b</sup>
GPx (nmol/mg de tecido)	54,72 (6,9) <sup>a</sup>	51,08 (13,4) <sup>a</sup>	52,30 (13,2) <sup>a</sup>	58,18 (9,1) <sup>a</sup>
SOD (nmol/mg de PT)	6,36 (1,0) <sup>a</sup>	6,18 (1,4) <sup>a</sup>	7,78 (1,7) <sup>b</sup>	7,25 (0,5) <sup>ab</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação.

#### 4.7. Análise da quantificação de Cálcio no parênquima renal

A quantificação de cálcio no parênquima renal utilizando-se feixes iônicos e fluorescência de raios X foi significativamente maior nos animais pertencentes aos grupos de indução da hiperossalúria (G2 e G3) quando comparados ao controle (mais de 150 vezes), porém sem apresentar diferença significativa entre eles. O grupo suplementado com *cranberry* (G4) também apresentou aumento relativo da quantificação de cálcio no parênquima renal em relação ao controle (cerca de 1.7 vezes), porém menos importante quando comparados aos induzidos (G2 e G3) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Valores médios do cálcio quantificado no parênquima renal, segundo grupo:

Ca no parênquima renal (mg/kg)	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Ca no parênquima renal (mg/kg)	490,86 <sup>a</sup>	93636,36 <sup>c</sup>	75536,27 <sup>c</sup>	823,33 <sup>b</sup>

\* Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos em um mesmo momento de observação.

## 5. DISCUSSÃO

Com uma prevalência estimada em cerca de 1-5% na Ásia, 5-9% na Europa e de 13% na América do Norte, a LTU apresenta altas taxas de recorrência, excedendo os 50% em um período de 5 a 10 anos [45]. Tipicamente de etiologia multifatorial, pode ser entendida como consequência de uma ou mais alterações nas condições normais da cristalização da urina. Conforme dito anteriormente, alguns de seus fatores etiológicos podem ser significativamente modificados por meio de adequações na dieta na tentativa de prevenir e/ou reduzir sua recidiva, uma vez que a composição da urina está diretamente relacionada ao tipo e quantidade de alimentos ingeridos. De fato, o papel nutricional é tão relevante que, na opinião de muitos autores, uma reorientação efetiva e permanente nos padrões de uma dieta sabidamente inapropriada pode ser uma das principais medidas auxiliares na prevenção dos cálculos renais [46]. Neste sentido, considerando-se as conhecidas propriedades nutricionais e terapêuticas previamente descritas do *cranberry*, o presente estudo buscou avaliar os possíveis efeitos da sua suplementação sobre a LTU, em um modelo experimental em ratos.

A discreta diferença de peso nos animais do grupo 3 em relação ao controle observada no momento inicial (M0) se deveu, provavelmente, ao acaso sugerindo uma possível falha no processo de randomização. Entretanto, tal fato não interferiu nos resultados finais, já que o grupo apresentou comportamento homogêneo ao longo do experimento. A análise desta variável nos demais grupos ao longo do experimento, mostra que apenas os animais dos G1 e G4 apresentaram ganho de peso significativo. Tal fato pode ser explicado pela menor ingestão de ração, durante o período de observação, entre os animais pertencentes aos grupos induzidos (G2 e G3) quando comparados ao grupo controle. Em nossa opinião, esse efeito

observado no comportamento alimentar dos animais submetidos à indução da hiperoxalúria pode ser justificado, pelas alterações gastrointestinais e metabólicas produzidas pelo próprio agente indutor (etileno glicol), uma vez que o mesmo é rápida e extensivamente absorvido pelo trato gastrointestinal causando diminuição do apetite, devido à ocorrência de náuseas, pirose, cólicas e dores abdominais [47].

Estudos anteriores sugerem que o suco de *cranberry* causaria uma diminuição no pH urinário [48,49], devido a presença de ácidos quinicos e benzóico, precursores do ácido hipúrico, que ao serem excretados pelos rins acidificariam a urina [49]. Entretanto, essa suposta capacidade do suco de *cranberry* em acidificar a urina ainda é questionada por outros autores [50,51]. No presente estudo, apesar da análise do pH na urina não apresentar diferença estatística entre os grupos no momento inicial (M0), todos os animais apresentaram aumento significativo do pH urinário ao término do período de observação (M1). A alcalinização observada também entre os animais do grupo controle sugere que o fenômeno observado, provavelmente, esteja relacionado a uma possível imprecisão metodológica ou à imprecisão do método colorimétrico na determinação do pH urinário. De qualquer maneira, devido ao comportamento homogêneo desta variável nos diferentes grupos ( $p > 0,005$ ), podemos inferir que esta aparente alcalinização não interferiu nos resultados obtidos. Adicionalmente, é importante ressaltar que, sabidamente, a solubilidade e a agregação de cristais de OxCa não é afetada pela variação do pH urinário [52, 53].

Sabe-se que o volume urinário exerce papel fundamental na etiopatogenia da litíase renal, pois uma baixa diurese pode levar a uma maior concentração dos solutos litogênicos, resultando assim na maior formação de cálculos [54]. Paradoxalmente, em nosso estudo, observamos uma maior diurese nos grupos

induzidos quando comparados ao grupo controle (G1). Este aparente contrassenso pode ser explicado pela maior ingestão de líquidos nestes grupos em relação ao controle (G1), sem diferença estatística entre eles. Em parte, o maior consumo hídrico pode ter sido estimulado pelo fato de que o etileno glicol é um álcool de sabor adocicado, assim como o xarope de *cranberry*. Independente do real motivo para a diurese aumentada nesses animais, o ocorrido não foi capaz de prevenir os danos causados pela deposição dos cristais no rim dos animais submetidos à indução de hiperossalúria.

Níveis aumentados de cálcio urinário podem ser considerados fatores promotores de nucleação e precipitação de  $\text{OxCa}$  e posterior agregação de cristais [55]. Contudo, nossos resultados revelam uma diminuição significativa do cálcio urinário nos grupos induzidos, G2 e G3, quando comparados ao grupo controle (G1). Tal achado pode ser explicado pela formação de precipitados de  $\text{OxCa}$  no parênquima renal. Esta hipótese é corroborada tanto pela análise histomorfométrica dos cristais no parênquima renal quanto pela técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia. De acordo com ambas as metodologias utilizadas, a quantificação do cálcio no parênquima renal foi significativamente maior justamente nos grupos submetidos ao processo de indução (G2 e G3) quando comparados ao grupo controle (G1). Tais fatos demonstram claramente a eficácia do papel do etileno glicol como agente indutor da nefrolitíase e nefrocalcinose.

Assim como o aumento do volume urinário, o citrato também atua na prevenção da LTU, sendo considerado um eficiente inibidor da precipitação de cálculos. Por esta razão, o citrato desempenha importante papel na prevenção da nucleação e agregação dos cristais na via urinária [56, 57], onde tentativas de aumentar seus níveis na urina por meio de adequações na dieta e/ou

suplementação são utilizadas como estratégia para evitar a recorrência dos cálculos renais. A análise urinária do citrato na urina de 24 horas dos animais estudados revelou importante diminuição de seus níveis nos grupos 2, 3 e 4 quando comparados ao controle. Analisando-se apenas os animais submetidos à indução, o grupo tratado (G3), em valores absolutos, apresentou uma menor redução do citrato urinário, quando comparado ao grupo 2, sugerindo que a suplementação de *cranberry* poderia ter minimizado o impacto negativo do etileno glicol sobre a excreção do citrato. Contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Contrariando nossas expectativas, os animais suplementados com *cranberry* (G4) não apresentaram elevação dos níveis de citrato, mas sim uma significativa redução deste parâmetro urinário. Infelizmente não conseguimos encontrar uma explicação satisfatória para justificar o ocorrido.

A indução da hiperoxalúria com etileno glicol, como era esperado, resultou em um significativo aumento dos níveis de oxalato na urina de 24 horas nos grupos G2 e G3. Entretanto, conforme demonstrado na tabela 5, a administração concomitante do xarope de *cranberry* não foi capaz de reduzir os níveis de oxalato urinário (G3).

Diversos autores afirmam que há uma correlação direta entre a piora da função renal e a urolitíase, na qual a obstrução do fluxo urinário causada pelos cálculos levaria a um dano progressivo do parênquima renal, com consequente perda de sua função [58, 59]. Apesar da creatinina não ser considerada um biomarcador ideal para avaliar a taxa de filtração glomerular (TFG), alterações séricas deste parâmetro são fortemente sugestivas de comprometimento da função renal global [60]. A análise da creatinina sérica dos animais estudados revelou um aumento significativo dos seus níveis no grupo submetido à indução (G2) em relação ao controle, confirmando os efeitos nefrotóxicos do etileno glicol previamente

reportados na literatura. Entretanto, a creatinina se manteve estável nos animais induzidos e naqueles que receberam a suplementação com o xarope de *cranberry*. Curiosamente, os animais que receberam apenas a suplementação (G4) apresentaram redução nos níveis de creatinina sérica ao final do experimento. Considerando estes dois últimos achados poderíamos supor que o *cranberry* apresentou um efeito protetor sobre a função renal desses animais. Infelizmente, tais resultados não foram corroborados pelos achados histopatológicos, onde os parâmetros avaliados (atrofia tubular, extravasamento estromal e infiltrado inflamatório) não diferiram significativamente entre os grupos induzidos, independentemente da suplementação realizada (G3). Da mesma forma, a ausência de diferença estatisticamente significativa na contagem dos cristais no parênquima renal demonstrou que a suplementação com *cranberry* não foi capaz de prevenir a precipitação de cristais nos rins dos animais submetidos à indução de hiperoxalúria. Embora não possam justificar o comportamento da creatinina, a concordância destes achados sugere que as alterações histológicas observadas estão diretamente relacionadas com a deposição dos cristais nos túbulos e no parênquima renal. De fato, as mesmas alterações inflamatórias e morfológicas por nós observadas foram previamente descritas por Khan (2010) como sendo responsáveis pela progressiva lesão do tecido renal, a qual é resultado do deslocamento dos cristais de OxCa, que inicialmente são formados na luz dos túbulos, para dentro das células ou para o espaço intersticial, caracterizando a nefrocalcinose [61].

Embora os mecanismos fisiopatológicos da litíase ainda não estejam completamente elucidados, sabe-se que as alterações envolvidas na sua formação e manutenção produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e, conseqüentemente, o

desenvolvimento do estresse oxidativo (EO). A instalação do estresse oxidativo decorre, em última instância, do desequilíbrio entre a produção e o consumo de compostos oxidantes e antioxidantes resultando no acúmulo de radicais livres e EROs. Este processo causa oxidação de biomoléculas com consequente perda e/ou desequilíbrio de suas funções biológicas, cuja manifestação final é o dano potencial contra células e tecidos [62]. Neste sentido, objetivando quantificar os eventuais danos causados ao tecido renal em nível celular realizamos o estudo das principais vias do sistema enzimático envolvendo o EO nesses animais. Como discutido anteriormente, espécies reativas de oxigênio podem causar danos a várias moléculas, onde os lipídios ricos em ácidos graxos poliinsaturados estão entre os alvos mais susceptíveis a este ataque. Este processo auto catalítico, conhecido como peroxidação lipídica, resultará na formação de produtos como hidroperóxido de lipídeo (LOOH). Conforme demonstrado na tabela 7, o aumento significativo do LOOH nos grupos induzidos caracteriza a maior atividade do EO no parênquima renal destes animais. Considerando-se as enzimas antioxidantes estudadas, as atividades da catalase e da glutathiona peroxidase se mostraram estáveis em relação ao controle, sugerindo que a suplementação com *cranberry* não interferiu neste processo. Entretanto, a Superóxido Dismutase, exibiu significativo aumento de sua atividade tanto entre os animais induzidos e tratados (G3) assim como no grupo suplementado (G4), quando comparados ao controle. Sendo assim, considerando-se apenas os animais hiperoxalúricos, é possível inferir que a redução nos níveis de LOOH observados no G3 possa estar relacionada à maior atividade enzimática da SOD nestes animais. Tais achados, associados ao aumento da atividade da SOD também entre os animais suplementados (G4), sugerem que o *cranberry* possa realmente exercer algum efeito antioxidante nesse modelo.

Finalmente, diante dos fatos que foram aqui apresentados e discutidos, vale a pena destacar os diferentes resultados favoráveis observados entre os animais induzidos que foram tratados com *cranberry* (como número de cristais por túbulo, infiltrado inflamatório, quantificação do cálcio no parênquima), mas que não foram estatisticamente significativos. É possível que tais resultados não tenham alcançado significância devido à intensidade do processo de indução da hiperoxalúria causada pelo etilenoglicol. Parece razoável considerar que, em patologias onde as alterações metabólicas presentes não sejam tão intensas, as propriedades benéficas do *cranberry* possam ser suficientes para minimizar os efeitos deletérios causados pelos distúrbios presentes. Novos estudos, considerando diferentes concentrações de *cranberry* e, talvez, processos menos agressivos de indução se fazem necessários para que possamos confirmar nossas suposições.

## 6. CONCLUSÃO

Conforme demonstrado por nossos resultados, embora a suplementação alimentar com *cranberry* na dose de 800mg/kg de peso do animal por dia, tenha apresentado alguns efeitos positivos sobre a análise do estresse oxidativo, tais benefícios não foram suficientemente relevantes para impactar positivamente na redução da deposição dos cristais de OxCa e/ou na prevenção dos danos histológicos ao parênquima renal dos animais submetidos ao modelo de indução de hiperoxalúria.

## REFERÊNCIAS

- 1 - Tostes V, Cardoso LR. Recentes avanços em litíase urinária. J Bras Nefrol. 2001 Set; 23(3):166-73.
- 2 - Rendina D, De Filippo G, De Pascale F, Zampa G, Muscariello R, De Palma D, et al. The changing profile of patients with calcium nephrolithiasis: a comparison of two patient series observed 25 years apart. Nephrol Dial Transplant. 2013 Apr 17; [Epub ahead of print].
- 3 - Hyams ES, Matlaga BR. Economic impact of urinary stones. Transl Androl Urol. 2014;3:278-83.
- 4 - Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.
- 5 - Ortiz-Alvarado O, Miyaoka R, Kriedberg C, Leavitt DA, Moeding A, Stessman M, et al. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the management of hypercalciuric stone formers. Urology. 2012 Feb;79(2):282-6.
- 6 - Ekane S, Wildschutz T, Simon J, Schulman CC. Urinary lithiasis: epidemiology and physiopathology. Acta Urol Belg. 1997 Oct; 65(3):1-8.
- 7 - Pak CY, Resnick MI, Preminger GM. Ethnic and geographic diversity of stone disease. Urology. 1997 Oct; 50(4):504-7.
- 8 - Negri AL, Spivacow FR, Del Valle EE. Diet in the treatment of renal lithiasis. Pathophysiological basis. Medicina (B Aires). 2013;73(3):267-71.
- 9 - Borghi L, Nouvenne A, Meschi T. Nephrolithiasis and urinary tract infections: 'the chicken or the egg' dilemma? Nephrol Dial Transplant. 2012 Nov;27(11):3982-4.
- 10 - Pak CY, Sakhaee K, Crowther C, Brinkley L. Evidence justifying a high fluid intake in treatment of nephrolithiasis. Ann Intern Med. 1980 Jul;93(1):36-9.
- 11 - Borghi L, Meschi T, Amato F, Briganti A, Novarini A, Giannini A. Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. J Urol. 1996 Mar;155(3):839-43.
- 12 - Hesse A, Siener R, Heynck H, Jahn A. The influence of dietary factors on the risk of urinary stone formation. Scanning Microsc. 1993 Sep;7(3):1119-27.
- 13 - Wabner CL, Pak CY. Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors. J Urol. 1993 Jun;149(6):1405-8.
- 14 - Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Beverage use and risk for kidney stones in women. Ann Intern Med. 1998; 128 : 534-40

- 15 - Rodgers AL. Effect of cola consumption on urinary biochemical and physicochemical risk factors associated with calcium oxalate urolithiasis. *Urol Res.* 1999; 27: 77–81
- 16 - Rodgers AL. The influence of South African mineral water on reduction of risk of calcium oxalate kidney stone formation. *SAMJ.* 1998; 88: 448–51.
- 17 - Vahlensieck W. Review: The importance of diet in urinary stones. *Urol Res.* 1986; 14: 283–8.
- 18 - Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol.* 1996; 156 : 907–9.
- 19 - Salo J, Uhari M, Helminen M, Korppi M, Nieminen T, Pokka T, Kontiokari T. Cranberry juice for the prevention of recurrences of urinary tract infections in children: a randomized placebocontrolled trial. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (3): 340-6.
- 20 - Saona CR, Vorsa N, Singh AP, Cicalese JJ, Szendrei Z, Mescher MS, Frost CJ. Tracing the history of plant traits under domestication in cranberries: potential consequences on antiherbivore defences. *J Exp Bot.* 2010; 62 (8): 2633-44.
- 21 - Harkins KJ. What's the use of cranberry juice? *Age Ageing.* 2000 Jan; 29(1): 9-12.
- 22 - Kuzminski LN. Cranberry juice and urinary tract infections: is there a beneficial relationship? *Nutr Rev.* 1996 Nov; 54(11 Pt 2): S87-90.
- 23 - Pak CY. Citrate and renal calculi: an update. *Miner Electro-lyte Metab.* 1994; 20(6): 371-7.
- 24 - Lee YL, Owens J, Thrupp L, Cesario TC. Does cranberry juice have antibacterial activity? *JAMA.* 2000 Apr; 283(13):1691.
- 25 - Kramer G, Klinger HC, Steiner GE. Role of bacteria in the development of kidney stones. *Current Opin Urol.* 2000; 10:35-8.
- 26 - Blatherwick NR. The specific role of foods in relation to the composition of the urine. *Arch Intern Med (Chic).* 1914; XIV(3): 409-450.
- 27 - Moen DV. Observations on the effectiveness of cranberry juice in urinary infections. *Wis Med J.* 1962 May; 61:282-3.
- 28 - Nardi GM, Januario AGF, Freire CG, Megiolaro F, Schneider K, Perazzoli MRA, et al. Anti-inflammatory Activity of Berry Fruits in Mice Model of Inflammation is Based on Oxidative Stress Modulation. *Pharmacognosy Res.* 2016 Mar; 8(Suppl 1): S42–S49.
- 29 - Peixoto TC, Moura EG, de Oliveira E, Soares PN, Guarda DS, Bernardino DN, et al. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract treatment improves triglyceridemia,

liver cholesterol, liver steatosis, oxidative damage and corticosteronemia in rats rendered obese by high fat diet. *Eur J Nutr.* 2017 May 13; pp 1-16.

30 - Grases F, Prieto RM, Fernandez-Cabot RA, Costa-Bauzá A, Tur F, Torres JJ. Effects of Polyphenols from Grape Seeds on Renal Lithiasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 813737.

31 - McHarg T, Rodgers A, Charlton K. Influence of cranberry juice on the urinary risk factors for calcium oxalate kidney stone formation. *BJU Int.* 2003 Nov; 92(7): 765-8.

32 - Kessler T, Jansen B, Hesse A. Effect of blackcurrant-, cranberry- and plum juice consumption on risk factors associated with kidney stone formation. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Oct; 56(10): 1020-3.

33 - Cunha NB, Kawano PR, Padovani CR, Lima FO, Bernardes S, Magalhães ES, et al. Nephrocalcinosis induced by hyperoxaluria in rats. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(7): 496-501.

34 - Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

35 - Pereira B, Costa-rosa LFBP, Bechara EJH, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidases activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adreno medullated rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 827-833.

36 - Jiang ZY, Woolard ACS, Wolf SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the present of xylenolorange. *Lipids.* 1991 Out; 26(10):853-6.

37 - Nakamura M, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1974 Ago; 358(2): 251-61.

38 - Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem.* 1995 Dez; 232(2):243-8.

39 - Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H.U., editor. *Methods of enzymatic analysis Academic.* New York: Academic Press. 1974; 673-677.

40 - Bertin EP. *Principles end practice of X-ray spectrometric analysis,* Plenum Press. 1975; p 1979.

41 - Santos SB. *Elementos traço em soro Sanguíneo medidos pelos métodos PIXE e ICP-MS [Dissertação de mestrado].* São Paulo: Instituto de Física – USP; 2007.

42 - Pinho AG. *An Acad Brasil Cien.* 1979; 51(3): 365-393.

43 - Tabacniks MH. *Os elementos na Matéria [Tese de Livre Docência].* São Paulo: Instituto de Física – USP; 2005.

- 44 - Santos SB. Viabilidade da medida de elementos-traço em soro sanguíneo para diagnóstico de melanoma [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Física – USP; 2012.
- 45 - Amato M, Lusini ML, Nelli F. Epidemiology of nephrolithiasis today. *Urol Int.* 2004;72 Suppl 1:1-5.
- 46 - Grases F, Costa-Bauza A, Prieto RM. Renal lithiasis and nutrition. *Nutr J.* 2006; 5: 23.
- 47 - Stapenhorst L, Hesse A, Hoppe B: Hyperoxaluria after ethylene glycol poisoning. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23: 2277-2279.
- 48 - Sternlieb P. Cranberry juice in renal disease. *N Engl J Med.* 1963; 268: 57.
- 49 - Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA. Reduction of bacteria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *JAMA* 1994; 271: 751–4.
- 50 - Terris MK, Issa MM, Tacker JR. Dietary supplementation with cranberry concentrate tablets may increase the risk of nephrolithiasis. *Urology.* 2001; 57 : 26–9.
- 51 - Kinney AB, Blout M. Effect of cranberry juice on urinary pH. *Nurs Res.* 1979; 28: 287–90.
- 52 - Copelovitch L. Urolithiasis in Children: Medical Approach. *Pediatric Clin North Am.* 2012;59:881-96.
- 53 - 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.
- 54 - 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
- 55 - Leemann J, Worcester EM, Gray RW. Hypercalciuria and stones. *Am J Kidney Dis.*1991; 17: 386-391.
- 56 - 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.
- 57 - Grases F, Prieto RM, Fernandez-Cabot R, Costa-Bauzá A, Tur F, Torres JJ. Effects of polyphenols from grape seeds on renal lithiasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:813737.
- 58 - 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.

59 - 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.

60 - Dalton RN. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. *J Bras Patol Med Lab.* 2011; 47(1): 8-11.

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

62 - Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-55

## ANEXO 1

	INSTITUIÇÃO ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA			Contrato de Ética no Caso de Análise Cópia através da Portaria DFM nº 011 de 12/12/2012
<h2>CERTIFICADO Nº 1102/2014-CEUA</h2>				
<p><b>CERTIFICAMOS</b> que o Projeto de Pesquisa (<b>Protocolo CEUA 1102/2014 – CEUA</b>) Avaliação dos efeitos da suplementação da dieta com cranberry na nefrolitíase induzida em ratos, a ser conduzida por Isabela Bertanholi Leme da Silva, orientada pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano, com a colaboração de Matheus Augusto Callegari, Nathália Baraldi Cunha, Rafaela Florentina Manoel e Cecília Lime de Carvalho Marciano, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério Convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>				
<p><b>CERTIFICAMOS</b>, ainda que foi autorizada a utilização de "40 ratos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.</p>				
<p><b>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 30/10/2014</b></p>				
 Prof. Adjunto Katashi Okoshi Presidente da CEUA		 Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA		
<small>Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S. P. CEP: 16.618-070 Fone: (14) 3680-1508/3880-1609 e-mail: secretaria.ceb@fmb.unesp.br</small>				

## ANEXO 2 – ARTIGO EM INGLÊS

### EVALUATION OF THE EFFECTS OF CRANBERRY DIET SUPPLEMENTATION IN NEPHROLITHIASIS INDUCED IN RATS

Silva IBL, Callegari MA, Amaro JL, Kawano PR.

Department of Urology, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, Brazil.

#### ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the possible metabolic and histological repercussions resulting from oral supplementation with cranberry, on the morphological and urinary alterations secondary to hyperoxaluria, in an experimental model in rats. **Methods:** It was used 40 Sprague Dawley male rats and were randomized into: Group 1 [clinical control]; Group 2 [Ethylene glycol (EG) 0.5% + Vitamin D3 (VD3): induced]; Group 3 [G3: 0.5% EG + VD3 + *cranberry*], which the animals received the same drugs offered to the G2 plus *cranberry* (800 mg/kg body weight / day); Group 4: animals are supplemented only with *cranberry*. All animals were euthanized after 28 days of intervention and submitted a metabolic study on the urine of 24 hours; bilateral nephrectomy. Right kidneys were prepared for the histological analysis and the quantification of nephrocalcinosis. Left kidneys were reserved for the analysis of the deposition of calcium salts in the renal parenchyma.

**Results:** There was significant reduction in the citrate in all the groups compared to the control group, while the oxalate was significantly increased in G2 and G3 compared to G1. The urinary calcium was significantly lower in the induced groups. Histomorphometric analysis revealed that only the animals of G2 and G3 developed nephrolithiasis without differences from each other. And the quantification of calcium

in the renal parenchyma was significantly higher in G2 and G3 as compared to groups without induction. **Conclusion:** although food supplementation with cranberry had some positive effects, those benefits were not sufficiently relevant to impact the reduction of the deposition of CaOx crystals.

**Keywords:** cranberry, nephrolithiasis, rats, ethylene glycol

## INTRODUCTION

Urinary Tract Lithiasis (UTL) is a common condition in daily clinical practice, being the third most common pathology of the genitourinary system, being overcome only by urinary infections and prostate diseases<sup>1</sup>. According to epidemiological data from the last decades, its incidence and prevalence have increased worldwide, partly due to the improvement in diagnostic techniques and the increase in obesity rates<sup>2</sup>. This has contributed to an overall increase in health costs in a worrisome proportion.

Although the importance of UTL, the actual mechanism involved in kidney stone formation has not yet been fully elucidated. It is a complex process, involving a multifactorial disease resulting from interactions between environmental factors, genetic predisposition and metabolic disorders<sup>3</sup>: such as, race, age, gender, occupation, sedentary lifestyle, dietary hygienic, geographic, climatic and hereditary aspects, among others<sup>4,5</sup>. These characteristics make it difficult to adopt effective therapeutic measures that help the disease control, making the search for preventive measures increasingly important.

The composition of urine is clearly influenced by the diet. This correlation is so significant that changes in dietary factors have been proposed to prevent or minimize the risk of recurrent lithiasis<sup>6</sup>. The low urinary volume, for example, is considered a

determinant factor for the UTL occurrence<sup>7</sup>. According to this theory, increasing the net intake would imply a greater dilution of the urine reducing the ion concentrations and the saturation of the salts that are related to the formation of the urinary calculi. Nevertheless, the ingested liquid should be chosen carefully, since each type of beverage presents particular characteristics in their composition.

Previous studies demonstrated that multiple fluids, such as carbonated beverages, grapefruit juice<sup>8</sup> and cola-based soft drinks<sup>9</sup>, may be responsible for increasing the risk of renal calculi in the urinary tract. In contrast, particular drinks were efficient in preventing recurrences, such as mineral water<sup>10</sup>, fruit and herbal teas<sup>11</sup>, orange and lemon juice<sup>12</sup>. The Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*), also known as red blueberry, is a fruit rich in organic acids (acetylsalicylic acid), vitamin C, magnesium, flavonoids, catechins, and anthocyanidins. Its apparent therapeutic properties make cranberry juice worldwide known to be beneficial to the health, acting to prevent urinary tract infections, catheter clearances, and even aiding the healing of skin around stomata<sup>13,14</sup>. The presence of citric acid in cranberry juice presumes that its regular intake could elevate urinary citrate levels, thus helping in reducing the occurrence of UTL<sup>15</sup>. Another potential advantage of cranberry juice, besides its activity reducing bacterial adhesion to the urothelium<sup>16</sup>, would be the elevation of the levels of quinic acid in the organism, generating an increase in the excretion of hippuric acid in the urine, which is a bacteriostatic agent<sup>17</sup> and has potential to acidify urine<sup>18</sup>.

Although the potential benefits of cranberry consumption are promising, there are few studies evaluating the actual impacts of its intake on metabolism and its effects on the etiology and prevention of urinary tract lithiasis. Among few studies currently available in the literature, the lack of standardization in the doses used as well as the

interference of dietary factors, combined with the great heterogeneity of the populations studied, make the results conflicting and inconclusive. The aim of this study was to evaluate the possible metabolic and histological repercussions resulting from oral supplementation with cranberry, on the morphological and urinary alterations secondary to hyperoxaluria, in an experimental model in rats.

## **METHODS**

Forty Sprague-Dawley adult male rats, weighing between 200 and 300 g, were randomly distributed into four groups, and maintained in metabolic cages under controlled lighting and temperature. This study was previously approved by the ethics committee on animal experiments of our institution.

Group I (n = 7) was considered clinical control, and therefore any intervention was performed. In group II (n=11) animals received 0.5% Ethylene Glycol diluted in water, and offered "ad libitum", and Vitamin D3 (0.5 µM) dissolved in oil and administered via gavage once daily. Rats from group III (n=11), besides the induction with Ethylene Glycol and Vitamin D, they received cranberry syrup (800mg / kg of the animal) via gavage once a day. Group IV (n=11) received only the cranberry syrup at the same dosage via gavage.

On the second day of the experiment, moment M0, 24-hour urine from each animal was collected for urinary volume, pH, calcium, oxalate, citrate, uric acid and calcium analysis. This procedure was repeated at the end of four weeks (moment M1) for analysis of the same parameters.

At the end of study bilateral nephrectomy was performed. The left kidney was identified for later analysis of calcium in the parenchyma. And the right kidney was fixed in formaldehyde and included in paraffin block for histomorphometric study.

### **Histomorphometric quantification of nephrocalcinosis**

The right kidney, previously included in a paraffin block, was sectioned longitudinally at the 5µm thickness and the sections obtained were stained with Hematoxylin and Eosin (HE). For each slide, five random fields were selected and photographed under 40x magnification by a digital camera coupled to a polarized optical microscope. For the evaluation of nephrocalcinosis, the software Image J® was used.

### **Calcium quantification in the renal parenchyma**

After its removal, the left kidney was dried, crushed and sent to the Institute of Physics of the University of São Paulo (IFUSP), where it was pressed in the form of tablets for the measurement of calcium in the renal parenchyma, using X-ray fluorescence by energy dispersion.

### **Statistical analysis**

The comparison of the means between the moments and the groups was done using ANOVA, followed by the Tukey tests adjusted for the variables with symmetrical distribution. In cases of asymmetry, the same design was used, adjusted in a gamma distribution, followed by the Wald tests. To analyze the number of crystals, at M1 was used a Poisson distribution followed by the Wald multiple comparison tests.

In all the tests the significance value of 5%. All analyzes were done in the software SAS for Windows version 9.3.

## **RESULTS**

Comparing with the total period of the experiment, it was observed that only the G1 and G4 animals presented significant weight gain, while the G2 and G3 groups maintained their stable weight, associated with lower feed intake. All microbiological

urine cultures were negative. After 28 days, all animals displayed normal levels of serum creatinine.

### Urinary parameters

The volume of urine samples in the 24-hour period throughout the whole experiment was significantly higher in the G2 and G3 groups when compared to the G1 and G4 groups.

The biochemical analysis of the different urinary parameters at time M0 did not reveal any difference between the groups. However, at the end of the experiment a significant reduction of urinary calcium was observed in the induced groups (G2 and G3) when compared to the G1 control, and this reduction was markedly greater in G2. The urine uric acid dosage at M1 did not show a statistically significant difference between the groups. Urinary citrate analysis showed a significant reduction in all groups when compared to control (G1). The 24-hour urine oxalate dosage was increased in the G2 and G3 groups when compared to the control group (G1). G4 remained statistically equal with G1 control. The results are shown in Table 1.

Urinary parameters	M1			
	G1	G2	G3	G4
24 h Volume (ml)	8.7 <sup>a</sup>	32.8 <sup>b</sup>	27.5 <sup>b</sup>	11.6 <sup>a</sup>
pH	9.0 <sup>b</sup>	8.3 <sup>a</sup>	8.7 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>
Citrate (mg/24h)	1002.71 <sup>b</sup>	350.64 <sup>a</sup>	444.36 <sup>a</sup>	369.00 <sup>a</sup>
Uric Acid (mg/dL)	6.57 <sup>a</sup>	4.45 <sup>a</sup>	3.39 <sup>a</sup>	5.66 <sup>a</sup>
Oxalate (mg/24h)	51.7 <sup>a</sup>	85.8 <sup>b</sup>	93.6 <sup>b</sup>	62.5 <sup>a</sup>
Calcium (mg/dL)	1.76 <sup>c</sup>	0.84 <sup>a</sup>	1.07 <sup>b</sup>	1.82 <sup>c</sup>
Serum creatinine (mg/dL)	0.41 <sup>b</sup>	0.5 <sup>c</sup>	0.4 <sup>b</sup>	0.29 <sup>a</sup>

**Table 1** - Media of seric and 24h urinary parameters dosage according to the group. \*Proportions of the same lowercase letter in a referenced category of response (horizontal lines) do not differ in the comparison of groups ( $p > 0.05$ ). All conclusions were made at 5% significance level. \*\* 24h: 24 horas; mL: milliliters, mg: milligrams; dL: deciliter; L: liter

### Histomorphometric quantification of nephrocalcinosis

As expected, only groups II and III presented precipitation of crystals in the kidney, but without significant difference between them.

### Calcium dosage in the renal parenchyma

Calcium levels in the renal parenchyma determined by X-ray fluorescence by energy dispersion were significantly higher in G2 when compared to the other groups (Table 2).

Group	M1			
	G1	G2	G3	G4
Calcim in renal parenchyma	490.86 <sup>a</sup>	93636.36 <sup>c</sup>	75536.27 <sup>c</sup>	823.33 <sup>b</sup>

**Table 2** - Mean values of calcium (mg/kg) in the renal parenchyma, according to group, at M1. \*Proportions of the same lowercase letter in a referenced category of response (horizontal lines) do not differ in the comparison of groups ( $p > 0.05$ ). All conclusions were made at 5% significance level.

## DISCUSSION

Typically of multifactorial etiology, UTL is the consequence of one or more changes in the normal conditions of urine crystallization. As previously stated, some of its etiological factors can be significantly modified through dietary adjustments in an attempt to prevent and/or to reduce its recurrence, since the composition of the urine is directly related to the type and quantity of food eaten. In fact, the nutritional role is so relevant that, in previous literature, an effective and permanent reorientation in diet patterns known to be inappropriate may be one of the main auxiliary measures in the prevention of renal calculi<sup>19</sup>. Thus, considering the previously described nutritional and therapeutic properties of cranberry, the present study sought to evaluate the possible effects of its supplementation on UTL in an experimental model in rats.

Analysis of this variable in the other groups throughout the experiment shows that only G1 and G4 animals presented significant weight gain. This fact is explained by the lower feed intake, during the period of observation, between the animals belonging to the induced groups (G2 and G3) when compared to the control group. In our opinion, this effect observed in the feeding behavior of the animals submitted to the induction of hyperoxaluria can be justified by the gastrointestinal and metabolic changes produced by the inducing agent itself (ethylene glycol). Since it is rapidly and extensively absorbed by the gastrointestinal tract causing a decrease in the appetite, due to the occurrence of nausea, heartburn, cramps and abdominal pain<sup>20</sup>. Previous studies suggest that cranberry juice would cause a decrease in urinary pH<sup>21,22</sup>, due to the presence of quinic and benzoic acids, precursors of hippuric acid, which are excreted by the kidneys to acidify urine<sup>22</sup>. Although, this supposed capacity of cranberry juice to acidify the urine is still questioned by other authors<sup>23,24</sup>. The present study though the analysis of the pH in the urine did not present a differential statistic between the groups at the initial moment (M0), all the animals showed a significant increase in the urinary pH at the end of the period of observation (M1). An alkalization also observed among the animals of the control group suggests that the observed phenomenon, probably, is related to a possible methodological failure or imprecision of the colorimetric method in the determination of urinary pH. Regardless, due to the homogeneous behavior of this variable in the different groups ( $p > 0.005$ ), we can infer that this apparent alkalization did not interfere with the results. In addition, it is important to note that the solubility and the aggregation of CaOx crystals are known to be unaffected by urinary pH variation<sup>25,26</sup>.

It is proved that the urinary volume plays a fundamental role in the etiopathogenesis of renal lithiasis, since a low diuresis may lead to a higher concentration of lithogenic

solutes, resulting in a greater formation of calculi<sup>27</sup>. Paradoxically, in our study, we observed greater diuresis in the induced groups when compared to the control group (G1). This apparent contradiction can be explained by the greater fluid intake in these groups in relation to the control (G1), with no statistical difference between them. In part, the higher water intake may have been stimulated by the fact that ethylene glycol is a sweet-tasting alcohol, as well as cranberry syrup. Regardless of the actual reason for the increased diuresis, the occurrence was not able to prevent damage caused by deposition of the crystals in the kidney of the animals submitted to the induction of hyperoxaluria.

Increased levels of urinary calcium can be considered factors promoting nucleation and precipitation of CaOx and subsequent crystal aggregation<sup>28</sup>. Nonetheless, our results revealed a significant decrease in urinary calcium in the induced groups, G2 and G3, when compared to the control group (G1). This result can be explained by the formation of CaOx precipitates in the renal parenchyma. This hypothesis is corroborated by both the histomorphometric analysis of the crystals in the renal parenchyma and the X-ray fluorescence technique by energy dispersion. According to both methodologies, the quantification of calcium in the renal parenchyma was significantly higher in the groups submitted to the induction process (G2 and G3) compared to the control group (G1). These facts clearly demonstrate the efficacy of the ethylene glycol as an inducing agent of nephrolithiasis and nephrocalcinosis.

As well as the increase in the urinary volume, citrate also acts in the prevention of UTL and is considered an efficient inhibitor of precipitation of stones. For this reason, citrate is an important substance in preventing nucleation and aggregation of crystals in the urinary tract, where attempts to increase their urine levels through dietary adjustments and/or supplementation are used as a strategy to minimize the

recurrence of kidney stones. The citrate analysis in the 24-hour urine of the studied animals revealed a significant decrease in their levels in groups 2, 3 and 4 compared to the control. By analyzing only the animals submitted to induction, the treated group (G3), in absolute values, presented a smaller reduction of urinary citrate when compared to group 2, suggesting that cranberry supplementation could have minimized the negative impact of ethylene glycol on the excretion of citrate. However, this difference was not statistically significant. Contrary to our expectations, animals supplemented with cranberry (G4) showed no elevation of citrate levels, but a significant reduction of this urinary-parameter. Unfortunately, we cannot find a satisfactory explanation to justify this situation.

The induction of hyperoxaluria with ethylene glycol, as expected, resulted in a significant increase in 24-hour urinary oxalate levels in the G2 and G3 groups. However, as shown in table 1, concomitant administration of cranberry syrup was not able to reduce urinary oxalate (G3) levels.

Several authors showed that there is a correlation between worsening renal function and urolithiasis, in which obstruction of the urinary flow caused by the stones would lead to progressive damage of the renal parenchyma. Although creatinine is not considered an ideal biomarker for assessing glomerular filtration rate, serum changes of this parameter are strongly suggestive of impairment of overall renal function<sup>29</sup>. Serum creatinine analysis of the animals studied revealed a significant increase in their levels in the group submitted to induction (G2) compared to the control, confirming the nephrotoxic effects of ethylene glycol previously reported in the literature. However, creatinine remained stable in animals induced and supplemented with cranberry syrup. Interestingly, animals receiving only supplementation (G4) also showed a reduction in creatinine levels at the end of the experiment. Considering

these last two findings we could assume that cranberry had a protective effect on renal function.

Likewise, the absence of a statistically significant difference in crystal counts in the renal parenchyma demonstrated that cranberry supplementation was not able to prevent crystal precipitation in the kidneys of animals submitted to the induction of hyperoxaluria. Though they cannot justify the behavior of creatinine, the concordance of these findings suggests that the histological changes observed are directly related to the deposition of the crystals in the tubules and the renal parenchyma.

In fact, the same inflammatory and morphological changes that we observed were previously described by Khan (2010), as being responsible for the progressive damage of the renal tissue, which is the result of the displacement of the CaOx crystals, which are initially formed in the lumen of the tubules into the cells or into the interstitial space, characterizing nephrocalcinosis<sup>30</sup>.

As demonstrated by this research, although food supplementation with cranberry had some positive effects, those benefits were not sufficiently relevant to positively impact the reduction of the deposition of CaOx crystals.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to the research funding agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) for the financial support.

We are also grateful to the USP Physics Institute – IFUSP, for the participation.

## **CONFLICT OF INTEREST**

None declared.

## REFERENCES

- 1 - Tostes V, Cardoso LR. Recentes avanços em litíase urinária. *J Bras Nefrol.* 2001 Set; 23(3):166-73.
- 2 - Rendina D, De Filippo G, De Pascale F, Zampa G, Muscariello R, De Palma D, et al. The changing profile of patients with calcium nephrolithiasis: a comparison of two patient series observed 25 years apart. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Apr 17; [Epub ahead of print].
- 3 - Ortiz-Alvarado O, Miyaoka R, Kriedberg C, Leavitt DA, Moeding A, Stessman M, et al. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the management of hypercalciuric stone formers. *Urology.* 2012 Feb;79(2):282-6.
- 4 - Ekane S, Wildschutz T, Simon J, Schulman CC. Urinary lithiasis: epidemiology and physiopathology. *Acta Urol Belg.* 1997 Oct; 65(3):1-8.
- 5 - Pak CY, Resnick MI, Preminger GM. Ethnic and geographic diversity of stone disease. *Urology.* 1997 Oct; 50(4):504-7.
- 6 - Negri AL, Spivacow FR, Del Valle EE. Diet in the treatment of renal lithiasis. Pathophysiological basis. *Medicina (B Aires).* 2013;73(3):267-71.
- 7 - Borghi L, Nouvenne A, Meschi T. Nephrolithiasis and urinary tract infections: 'the chicken or the egg' dilemma? *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Nov;27(11):3982-4.
- 8 - Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Beverage use and risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med.* 1998; 128 : 534–40
- 9 - Rodgers AL. Effect of cola consumption on urinary biochemical and physicochemical risk factors associated with calcium oxalate urolithiasis. *Urol Res.* 1999; 27: 77–81
- 10 - Rodgers AL. The influence of South African mineral water on reduction of risk of calcium oxalate kidney stone formation. *SAMJ.* 1998; 88: 448–51.
- 11 - Vahlensieck W. Review: The importance of diet in urinary stones. *Urol Res.* 1986; 14: 283–8.
- 12 - Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol.* 1996; 156 : 907–9.
- 13 - Harkins KJ. What's the use of cranberry juice? *Age Ageing.* 2000 Jan; 29(1): 9-12.
- 14 - Kuzminski LN. Cranberry juice and urinary tract infections: is there a beneficial relationship? *Nutr Rev.* 1996 Nov; 54(11 Pt 2): S87-90.

- 15 - Pak CY. Citrate and renal calculi: an update. *Miner Electro-lyte Metab.* 1994; 20(6): 371-7.
- 16 - Lee YL, Owens J, Thrupp L, Cesario TC. Does cranberry juice have antibacterial activity? *JAMA.* 2000 Apr; 283(13):1691.
- 17 - Blatherwick NR. The specific role of foods in relation to the composition of the urine. *Arch Intern Med (Chic).* 1914; XIV(3): 409-450.
- 18 - Moen DV. Observations on the effectiveness of cranberry juice in urinary infections. *Wis Med J.* 1962 May; 61:282-3.
- 19 - Grases F, Costa-Bauza A, Prieto RM. Renal lithiasis and nutrition. *Nutr J.* 2006; 5: 23.
- 20 - Stapenhorst L, Hesse A, Hoppe B: Hyperoxaluria after ethylene glycol poisoning. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23: 2277-2279.
- 21 - Sternlieb P. Cranberry juice in renal disease. *N Engl J Med.* 1963; 268: 57.
- 22 - Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA. Reduction of bacteria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *JAMA* 1994; 271: 751–4.
- 23 - Terris MK, Issa MM, Tacker JR. Dietary supplementation with cranberry concentrate tablets may increase the risk of nephrolithiasis. *Urology.* 2001; 57 : 26–9.
- 24 - Kinney AB, Blout M. Effect of cranberry juice on urinary pH. *Nurs Res.* 1979; 28: 287–90.
- 25 - Copelovitch L. Urolithiasis in Children: Medical Approach. *Pediatric Clin North Am.* 2012;59:881-96.
- 26 - 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.
- 27 - 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
- 28 - Leemann J, Worcester EM, Gray RW. Hypercalciuria and stones. *Am J Kidney Dis.* 1991; 17: 386-391.
- 29 - 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.
- 30 - Khan SR. Nephrocalcinosis in animal models with and without Stones. *Urol Res.* 2010;38:429–38.