

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

Natália Baraldi Cunha

**Avaliação do papel da piridoxina na prevenção da
nefrocalcinose induzida pela hiperoxalúria em ratos**

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

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Paulo Roberto Kawano
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Titular João Luiz Amaro

**Botucatu
2016**

**AValiação DO PAPEL DA PIRIDOXINA NA PREVENÇÃO DA
NEFROCALCINOSE INDUZIDA PELA HIPEROXALÚRIA EM
RATOS**

NATÁLIA BARALDI CUNHA

2016

Natália Baraldi Cunha

**Avaliação do papel da piridoxina na prevenção da
nefrocalcinose induzida pela hiperoxalúria em ratos**

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

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Paulo Roberto Kawano
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Titular João Luiz Amaro

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cunha, Natália Baraldi.

Avaliação do papel da Piridoxina na prevenção da nefrocalcinose induzida pela hiperoxalúria em ratos / Natália Baraldi Cunha. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Paulo Roberto Kawano

Coorientador: João Luiz Amaro

Capes: 40102149

1. Vitamina B6. 2. Hiperoxalúria. 3. Nefrocalcinose.
4. Rins - Doenças. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Hiperoxalúria; Nefrocalcinose; Piridoxina (Vitamina B6); Ratos; Rim.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gilberto e Luci, minha base para conquistar vitórias e enfrentar as adversidades. O maior exemplo de amor incondicional que me impulsiona para encarar tudo com positivismo.

À minha irmã Andréa, sempre ao meu lado, me inspirando com sua garra, perseverança e amor em tudo que se propõe a fazer.

Ao meu amor e companheiro, Pedro, sempre me apoiando em minhas escolhas e me incentivando a crescer pessoal e profissionalmente.

À toda minha família: Vó Alzira e avós que já faleceram (vô Tino e Tide, vó Lourdes), meus tios e primos, que sempre estiverem tão presentes em minha formação e crescimento pessoal.

Obrigada por tudo!
Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à **Deus**, pela força e demonstração de amor em minha vida. Espero saber retribuir à vida e à Ele pelas oportunidades através de minhas escolhas e atitudes.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano**, pelo tempo disponibilizado, apoio e confiança. Por todo ensinamento dispensado de forma tão generosa e gentil.

Ao meu coorientador, **Prof. Titular João Luiz Amaro**, por toda sua experiência compartilhada e tempo disponibilizado desde o meu Mestrado.

À minha companheira e amiga **Patrícia Capuzzo**, pela parceria desde o Mestrado e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Ao funcionário do Laboratório Experimental **Lucas**, pela amizade, paciência e parceria, sempre pronto a me ajudar. Foi muito importante para o desenvolvimento deste projeto no momento da coleta.

À **Dra. Carmen Amaro**, por toda dedicação e ensinamento no ambulatório de Litotripsia.

Ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**, pelo auxílio e colaboração de forma tão prestativa na análise estatística deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima**, pela atenção, disposição e ajuda na realização da análise histopatológica, sempre de maneira tão gentil.

À **Equipe do Laboratório LAMFI (Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos), no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IF USP)**, que me recebeu tão bem no período de realização das dosagens de Cálcio no parênquima renal. Em especial, À **Suene Bernardes**, pós graduanda do laboratório pela paciência e ensinamento das técnicas e por colaborar de forma tão generosa para essa realização.

Ao **Prof. Dr. Manfredo Harri Tabacniks**, por abrir a porta de seu laboratório e compartilhar de tecnologias tão importante para este trabalho e para a ciência.

À funcionária **Salete** do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela imensurável ajuda, paciência e generosidade no ensinamento das técnicas de dosagem de oxalato e citrato.

À **Prof. Dra. Regina Kiomi Takahira**, responsável pelo Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (UNESP), pela prontidão e ajuda nas análises do sangue e urina dos ratos.

À enfermeira **Isabel Cristina Capela** e à secretária do Serviço de Litotripsia **Daniela Capela**, sempre prontas a nos ajudar no ambulatório.

À colega de Pós Graduação **Isabela Leme**, pela amizade e prontidão em ajudar. Às iniciações científicas, **Eloá e Matheus**, sempre atentos e prontos a ajudar e trabalhar e pela preciosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À **Prof. Dra. Silvia Papini**, pelos ensinamentos, oportunidades, mas sobretudo pela amizade, sempre trabalhando em conjunto, me mostrando e dando oportunidade dos melhores caminhos nesta jornada.

À minha amiga e irmã de Botucatu **Nara Costa**, pela companhia, parceria e amizade de sempre.

Às **nutricionistas do Núcleo de Nutrição e Dietética**, pela troca profissional e amizade no dia a dia de trabalho neste Serviço. Em especial, às minhas colegas e amigas **Daniela Vulcano** e **Amanda Zamuner** pela experiência compartilhada e amizade especial, à minha chefe e amiga **Marina Berbel**, que sempre de maneira generosa e profissional, soube valorizar meu trabalho.

Aos **ratos** utilizados neste trabalho, que doaram suas vidas por estes resultados.

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

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Acredite que você pode, assim você já está no meio do caminho.”

Theodore Roosevelt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais vias de biossíntese de oxalato.....	33
Figura 2	Fluxograma demonstrando o tempo de estudo e parâmetros analisados em cada grupo.....	40
Figura 3	Procedimento de coleta de urina por punção vesical.....	41
Figura 4	Ilustração da gaiola metabólica.....	45
Figura 5	Ilustração do Programa <i>Image J®</i> versão 1.44 (<i>NIH, Bethesda, USA</i>), com grade de 100 pontos gerada sobre a lâmina.....	47
Figura 6	Triturador de tecidos moles.....	51
Figura 7	Dispositivo utilizado para determinação do Cálcio no parênquima renal: o acelerador de partículas (A) fica acoplado à câmara PIXE (B) e aos detectores de alta energia (C) e de baixa energia (D).....	53
Figura 8	Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 1 (Controle) demonstrando a arquitetura renal preservada, coloração pelo H.E.....	60
Figura 9	Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 3 (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3+ Piridoxina), demonstrando formação de cristais, apontado pelas setas.....	61
Figura 10	Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 4 (Piridoxina), sem alterações histológicas.....	61
Figura 11	Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 2 (Etileno glicol a 0,5% + vitamina D3), coloração pelo H.E, demonstrando a atrofia intensa das células, extravasamento estromal, infiltrado inflamatório linfocitário.....	63
Figura 12	Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 3 (Etileno glicol a 0,5% + Vitamina D3 + Piridoxina), coloração pelo H.E, demonstrando a atrofia intensa das células, extravasamento estromal, infiltrado inflamatório linfocitário e processo inflamatório com célula gigante multinucleada.....	63

LISTA DE TABELAS

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

	momentos (primeira e última semana).....	55
Tabela 2	Comparação da média do pH urinário, segundo o grupo, em diferentes momentos (primeira e última semana).....	56
Tabela 3	Média e desvio padrão do volume urinário em 24 horas, segundo grupo.....	57
Tabela 4	Valores médios e desvio padrão do citrato urinário, segundo grupo.....	57
Tabela 5	Valores médios e desvio padrão do oxalato na urina de 24h, segundo grupo.....	58
Tabela 6	Valores médios e desvio padrão do cálcio na urina de 24h, segundo grupo.....	59
Tabela 7	Valores médios e desvio padrão da creatinina sérica, segundo grupo.....	59
Tabela 8	Valores médios e desvio padrão da atividade das principais enzimas envolvidas no estresse oxidativo do parênquima renal, segundo grupo.....	65
Tabela 9	Valores médios e desvio padrão do cálcio quantificado no parênquima renal segundo grupo.....	65

GRÁFICO

Gráfico 1	Comparação da média de contagem de cristais nos túbulos renais entre os grupos, segundo o método computadorizado utilizando-se o programa Image J.....	60
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau celsio
µm	Micrômetro
µM	Micromol
AGT	Alanina glioxilato aminotransferase
BHT	Butilato hidroxitolueno
Ca	Cálcio
CAT	Catalase
CEMIB	Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Unicamp
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe ²⁺	Sulfato ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G	Grama
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
HE	Hematoxilina e Eosina
HP	Hiperoxalúria Primária
HP1	Subtipo de hiperoxalúria primária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFUSP	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
KeV	kilo elétron-volt
Kg	Quilograma
L	Litro
LAMFI	Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos
LTU	Litíase do trato urinário
M	Mol
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mmol	Milimol
NADH	β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced sodium salt hydrate
NADPH ₂	Di-hidrogenofosfato de adenina dinucleótido nicotinamida
NBT	Nitroblue-tetrazólico
NEC	<i>National Electrostatic Corporation</i>
Nm	Nanômetro
O ₂ ⁻	Oxigênio
OxCa	Oxalato de cálcio
PIXE	Proton Induced X-Ray Emission
ppm	Parte por milhão
Rpm	Rotação por minuto
SNICS	<i>Source of Negative Ions by Cesium Sputtering</i>
SOD	Superóxido dismutase
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VB6	Vitamina B6
Xg	Número de vezes (x) aplicada sobre a gravidade (g)

RESUMO

Introdução: O oxalato de cálcio (OxCa) é o principal componente metabólico envolvido na formação dos cálculos renais. Por esta razão, diferentes abordagens farmacológicas foram ou estão sendo propostas para o tratamento da nefrolitíase por OxCa. Dentre elas, a piridoxina, um componente da vitamina B6, tem sido sugerida como potencial agente terapêutico capaz de atenuar os efeitos da hiperoxalúria, porém com resultados ainda controversos.

Objetivo: Avaliar os efeitos da piridoxina (Vitamina B6) sobre a excreção urinária de oxalato e seu eventual impacto nas alterações renais causadas pela nefrocalcinose induzida a partir de um modelo experimental de hiperoxalúria em ratos.

Métodos: Foram utilizados 60 ratos machos da raça Sprague-Dawley, randomicamente distribuídos em quatro grupos: GRUPO 1 (G1: n=15) controle clínico; GRUPO 2 [G2: Etilenoglicol (EG) a 0,5%+vitamina D3 (VD3), n=15] 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 μ M; GRUPO 3 [G3: EG 0,5%+VD3+Piridoxina(VB6); n=15] onde os animais receberam as mesmas drogas ofertadas ao G2 acrescido da VB6 na dose de 180mg/kg peso/dia; GRUPO 4 (G4, n=15) animais suplementados apenas com a VB6 na mesma dose do G3. Todos os animais foram eutanasiados após 28 dias de intervenção e submetidos a estudo metabólico na urina de 24 horas; análise histopatológica/morfométrica, análise do estresse oxidativo no parênquima renal, bem como dosagem espectroscópica do cálcio.

Resultados: Dentre os parâmetros urinários avaliados, observou-se significativa redução do citrato no G2 em relação ao controle (781,9, e 2414,4mg/L, respectivamente), enquanto que o oxalato mostrou-se significativamente aumentado nos G2 e G3 quando comparado ao G1 (7,79; 8,94 e 2,96mg/L, respectivamente). O cálcio urinário foi significativamente menor nos grupos induzidos (G3:0,9, G2:1,5 e G1:

2,25mg/dL). A análise histomorfométrica revelou que apenas os animais dos G2 e G3 desenvolveram nefrocalcinose 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. Com relação à análise do estresse oxidativo, houve aumento dos níveis do hidropéroxido de lipídeo associado à redução da atividade da superóxido dismutase e glutathione peroxidase no G2. Nos demais grupos, o padrão enzimático manteve-se relativamente estável em relação ao controle, com exceção da atividade da catalase, cuja atividade revelou-se aumentada em todos os grupos estudados. Como esperado, a quantificação do cálcio no parênquima renal foi significativamente maior em G2 e G3 quando comparado aos grupos sem indução.

Conclusão: A piridoxina não foi capaz de produzir um efeito significativo no tratamento e/ou na prevenção das alterações urinárias, bem como morfológicas, inflamatórias e funcionais do parênquima renal de ratos com hiperoxalúria secundária obtida a partir da administração de agentes indutores.

Palavras-chave: Piridoxina, Nefrocalcinose, Ratos, Etileno glicol

ABSTRACT

Introduction: The calcium oxalate is the major metabolic component involved in the formation of renal calculus. Therefore, different pharmacological approaches have been or are being proposed for the treatment of nephrolithiasis by calcium oxalate. Among them, the pyridoxine, a component of vitamin B6, has been suggested as a potential therapeutic agent that can minimize the effects of hyperoxaluria. However, the results are controversial. **Objective:** To evaluate the effects of pyridoxine (vitamin B6) on the urinary excretion of oxalate and its possible impact on renal disorders caused by nephrocalcinosis induced from an experimental model of hyperoxaluria in rats. **Methods:** It was used 60 Sprague Dawley male rats and were randomized into four groups: Group 1 [(G1: n = 15) clinical control]; Group 2 [G2: Ethylene glycol (EG) 0.5% + Vitamin D3 (VD3), n = 15], 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 µM; Group 3 [G3: 0.5% EG + VD3 + pyridoxine (VB6); n = 15], which the animals received the same drugs offered to the G2 plus VB6 at a dose of 180mg / kg body weight / day; Group 4 (G4, n = 15) which the animals are supplemented only with the same dose of VB6 in G3. All animals were euthanized after 28 days of intervention and submitted a metabolic study on the urine of 24 hours; histopathological / morphometric analysis of oxidative stress in renal parenchymal and spectroscopic measurement of calcium. **Results:** Among the urinary parameters evaluated, there was significant reduction in the citrate in G2 compared to the control group- G1 (781.9 and 2414.4mg / L, respectively), while the oxalate was significantly increased in G2 and G3 compared to G1 (7.79, 8.94 and 2.96mg / L, respectively). The urinary calcium was significantly lower in the induced groups (G3: 0.9, G2: 1.5 and G1: 2.25mg / dL). Histomorphometric analysis revealed that only the animals of G2 and G3 developed nephrocalcinosis 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 associated with reduced superoxide dismutase activity and glutathione peroxidase in the G2. In the other groups, the enzyme pattern remained relatively stable compared to the control, except for catalase activity, which activity proved to be increased in all groups. In the other groups, the enzyme pattern remained relatively stable compared to the control (G1), except for the catalase activity, in which activity increased in all groups. As expected, the quantification of calcium in the renal parenchyma was significantly higher in G2 and G3 as compared to groups without induction. **Conclusion:** Pyridoxine was not able to produce a significant effect in the treatment and / or prevention of urinary disorders, as well as morphological, inflammatory and functional renal tissue in rats with secondary hyperoxaluria obtained from the administration of inducing agents.

Key-words: Pyridoxine, Nephrocalcinosis, Rats, Ethylene glycol

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Gráfico

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	28
2. Objetivo.....	36
3. Materiais e Métodos.....	38
3.1. Animais de experimentação.....	38
3.2. Grupos experimentais.....	38
3.3. Delineamento do estudo.....	39
3.4. Exames laboratoriais.....	40
3.4.1. Urina.....	40
3.4.2. Sangue.....	42
3.4.3. Urina de 24 horas.....	43
3.5. Coleta dos rins.....	45
3.6. Quantificação histomorfométrica da nefrocalcinose.....	46
3.7. Análise do estresse oxidativo.....	48
3.7.1. Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo.....	48
3.7.2. Determinação das atividades das enzimas antioxidantes.....	49
3.7.2.1. Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px – EC 1.11.1.9).....	49
3.7.2.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1).....	

	49
3.7.2.3. Determinação da atividade da catalase (EC – 1.11.1.16).....	50
3.8. Quantificação do cálcio no parênquima renal.....	50
3.8.1. Preparação das amostras.....	50
3.8.2. Sistema PIXE (Proton Induced X-Ray Emission).....	51
3.9. Análise estatística.....	53
4. Resultados.....	55
4.1. Avaliação do ganho de peso e da ingestão de ração e líquidos.....	55
4.2. Exames laboratoriais.....	56
4.2.1. Urocultura.....	56
4.2.2. Avaliação dos parâmetros urinários.....	56
4.2.3. Avaliação da creatinina.....	59
4.3. Avaliação histomorfométrica.....	59
4.4. Avaliação histopatológica.....	61
4.5. Análise do estresse oxidativo.....	64
4.6. Quantificação do cálcio no parênquima renal.....	65
5. Discussão.....	67
6. Conclusão.....	76
7. Referências Bibliográficas.....	78
Anexos.....	85

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A litíase urinária constitui a terceira causa mais comum de afecção do trato urinário, sendo superada apenas pelas infecções urinárias e doenças da próstata. Ocorre em cerca de 1 a 20% da população mundial (RAMELLO et al., 2000) com taxas de recorrência da ordem de 50 a 70% em 10 anos (JOUAL et al., 1997; TRINCHIERI et al., 1999; HEILBERG et al., 2003), acometendo homens e mulheres na sua fase produtiva entre a terceira e quarta décadas de vida. Embora tenha sido descrita como uma doença que, classicamente, predomina no sexo masculino em uma proporção de 2:1 (TOSTES & CARDOSO, 2001), novos estudos tem sugerido que esta relação está diminuindo progressivamente (AMARO et al, 2005).

O aparente aumento na incidência da litíase do trato urinário (LTU) observado nos últimos anos (ROMERO et al., 2010; TURNEY et al., 2012) pode ser explicado, em grande parte, pela melhora nos métodos de diagnóstico. No entanto, as crescentes taxas de obesidade e as alterações na dieta, associadas à baixa ingestão de líquidos, são fatores que devem ser também considerados (BORGHI et al., 1996; TAYLOR et al., 2009; ASPLIN, 2009).

Embora a taxa de mortalidade decorrente das complicações do tratamento intervencionista da LTU possa ser considerada baixa em países desenvolvidos, sua recorrência está freqüentemente associada a

um elevado índice de morbidade e absenteísmo, assim como problemas sociais (HEILBERG et al., 2002). De acordo com os dados do “Projeto de Epidemiologia Rochester”, realizado entre 1984 e 2003 em Minnesota nos Estados Unidos, observou-se que a taxa de recorrência dos sintomas após um evento inicial desencadeado pela formação de um cálculo urinário, segue a seguinte proporção ao longo do tempo: 11% em 2 anos, 20% em 5 anos, 31% em 10 anos e 39% em 15 anos (RULE et al, 2014).

A prevalência da nefrolitíase continua a crescer em todo o mundo e quase duplicou nos Estados Unidos ao longo das últimas décadas, onde os custos com a saúde têm aumentado em um ritmo alarmante. Estima-se que sejam gastos mais de US\$ 5 bilhões anuais apenas com o tratamento da LTU naquele país, considerando-se os custos diretos, relacionados à prestação de serviços médicos e fatores indiretos, tais como perda de produtividade no trabalho (HYAMS & MATLAG, 2014).

Em um país com dimensões continentais como o Brasil, onde a população excede os duzentos milhões de habitantes (204,5 milhões de acordo com o último censo realizado pelo IBGE em 2015), traçar um perfil epidemiológico da LTU é especialmente complexo, principalmente se considerarmos as variações climáticas, os diferentes hábitos alimentares e a ausência quase que completa de estudos epidemiológicos acerca da LTU. Contudo, trata-se de uma afecção altamente prevalente que acomete cerca de 11% da população em algum momento da vida

(WORCESTER & COE, 2011). No Brasil, apenas no ano de 2010, mais de 60% do total de pacientes internados devido a problemas relacionados à LTU tinham entre 20 e 49 anos de idade, ou seja, encontravam-se dentro de sua faixa etária mais produtiva (KORKES et al., 2011). De acordo com os dados do DATASUS de 2011, foram computadas 69.039 admissões hospitalares diretamente associadas à litíase urinária. Esses números corresponderam a 0,61% das internações hospitalares no SUS naquele período, no qual o custo médio dessas internações hospitalares foi de R\$ 423,42, gerando um gasto anual de R\$ 29.232.682,56.

Os primeiros estudos sobre etiopatogenia da LTU iniciaram-se há quase quatro décadas. Foi a partir deles que surgiu o conceito de que a litogênese é resultante da complexa interação de vários fenômenos como a supersaturação urinária, nucleação, agregação, retenção e o crescimento dos cristais. Geralmente, a cristalização ocorre devido à presença de anormalidades na composição da urina, seja pela maior excreção dos agentes promotores da litogênese (cálcio, oxalato, ácido úrico, etc); ou pela menor excreção dos fatores inibidores (citrato, magnésio, glicosaminoglicanos, nefrocalcina, proteína de Tamm-Horsfall), ou ambos (COE et al, 1991; HEILBERG & SCHOR, 1994; HEILBERG et al., 2006). A investigação das alterações metabólicas, que freqüentemente acompanham a litíase urinária, passou por grandes avanços com a melhora das técnicas e dos testes laboratoriais. Seu papel é fundamental no manejo do paciente litiásico, seja no acompanhamento, ou na

prevenção dos cálculos renais (LARANJA et al., 1995; AMARO et al., 2005). As alterações metabólicas estão presentes em cerca de 95% dos pacientes litíasicos (LEVY et al., 1995). No Brasil, a sua prevalência varia de 93 a 97%, onde a hipercalcúria e a hipocitratúria figuram entre os principais distúrbios identificados, ocorrendo em 75% e 37% dos casos, respectivamente (AMARO et al., 2005).

Na maioria das vezes, o oxalato de cálcio (OxCa) é o principal componente metabólico envolvido na gênese da LTU, sendo resultante tanto da absorção dietética quanto da síntese endógena (COE et al., 2005). Em determinadas situações, o OxCa pode estar presente em até dois terços dos cálculos, sendo decorrente de fatores genéticos (hiperoxalúria primária) ou ambientais (hiperoxalúria secundária). Em nosso meio, observamos uma incidência de hipercalcúria idiopática em 73% dos pacientes (AMARO et al., 2005).

Em algumas situações, litíase e nefrocalcinose podem coexistir, no qual a deposição de cristais no lúmen do sistema coletor como cálices, pelve renal, ureteres e bexiga resultaria na litíase urinária (EVAN, 2010), enquanto que a deposição de sais de cálcio radiologicamente demonstrável no parênquima renal, seria classificada como nefrocalcinose. (SERRA & CORREIA, 2004). A nefrocalcinose, por sua vez, pode ser ainda dividida em intratubular e intersticial. Estudos utilizando modelos em ratos indicam que a deposição renal de cristais de OxCa nesses animais ocorre principalmente na região intratubular,

podendo estar relacionado com o processo de lesão, inflamação e regeneração celular (KHAN, 2010; TOBLLI et al., 2002; TOBLLI et al., 2002).

A hiperoxalúria pode estar presente como causa ou fator contributivo na gênese da LTU em diferentes situações. A Hiperoxalúria Primária (HP), por exemplo, é considerada uma desordem genética responsável pela forma mais intensa de aumento da síntese endógena de oxalato, resultando na formação de cálculos urinários, nefrocalcinose e, não raramente, insuficiência renal (SCHEINMAN et al., 2005). Nestes casos, existe uma sistemática deposição de OxCa em quase todos os tecidos do corpo, incluindo coração, ossos, cartilagem, dentes, vasos sanguíneos, cérebro e rins (DANPURE & PURDUE, 1995). O aumento do oxalato urinário e a conseqüente deposição de cristais no parênquima renal estão associados à peroxidação lipídica e a um dano progressivo ao epitélio renal destes pacientes (HUANG et al., 2002; KHAN et al., 1989) que, não raramente, desenvolvem um estágio final de insuficiência renal ainda na infância (KHAN et al., 2006). No caso da HP1, um dos tipos de hiperoxalúria primária, a oxalúria ocorre devido a um defeito genético da enzima hepática peroxissomal alanina glioxilato aminotransferase (AGT), que resulta na diminuição da conversão de glioxilato a glicina e, conseqüentemente, em um aumento da via do glioxilato a oxalato (CHETYRKIN et al., 2004) (Figura 1). Já a hiperoxalúria idiopática (HI) é considerada um distúrbio nutricional derivado do consumo excessivo de

oxalato e outros nutrientes ou de uma produção excessiva de oxalato endógeno via alta ingestão de hidroxiprolina e triptofano oriundos da proteína da carne. (ALINEI et al., 1984).

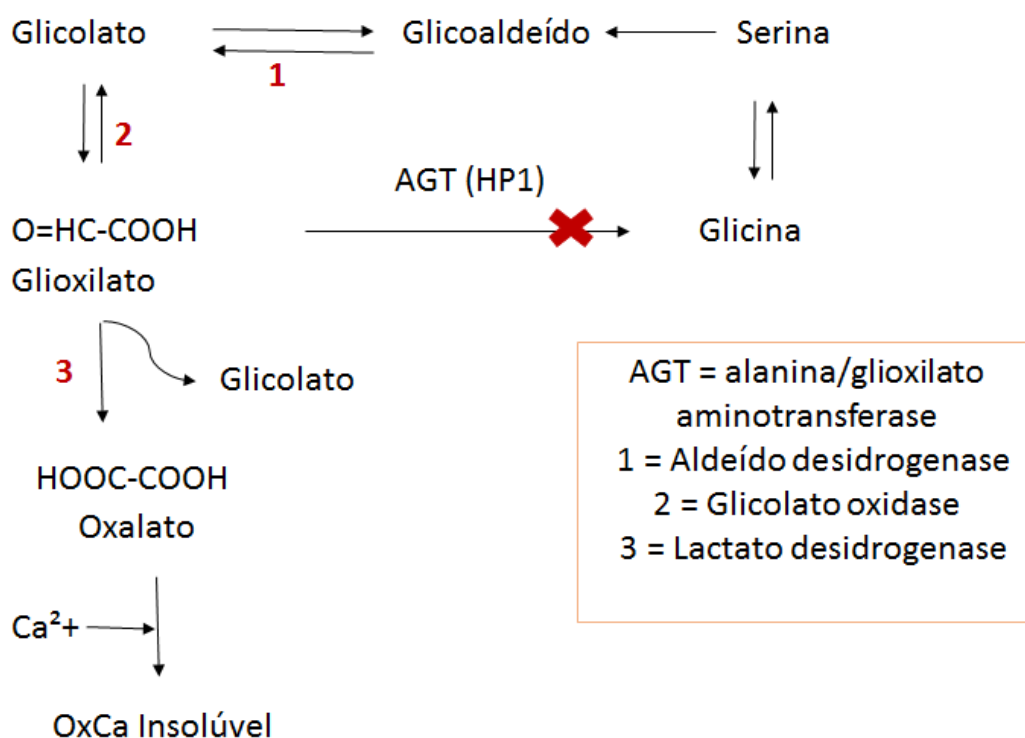


Figura 1: Principais vias de biossíntese de oxalato no fígado.

Sendo assim, considerando-se a via metabólica da biossíntese do oxalato no fígado, é possível supor que a piridoxina, uma das formas químicas da vitamina B6 (VB6), poderia ser utilizada como um potencial agente terapêutico no tratamento da hiperoxalúria. Estudos prévios demonstraram que a VB6 pode atuar como um cofator para a enzima

AGT, reduzindo assim o substrato da via metabólica para a lactato desidrogenase e, conseqüentemente, formação do oxalato (ORTIZ-ALVARADO, 2011). Esta forma química da VB6 tem sido estudada em modelos animais de hiperoxalúria induzida por etileno glicol resultando na redução dos níveis de oxalato urinário e na formação de cristais de oxalato em áreas papilares e medulares de rins dos animais tratados (SCHEINMAN et al., 2005; KAE LIN et al., 2004)

Nesse sentido, os modelos animais têm contribuído significativamente para compreensão dos mecanismos envolvidos na nefrolitíase por OxCa, bem como na avaliação da eficácia dos diferentes processos terapêuticos propostos envolvendo esta patologia (KHAN & GLENTON, 2010).

Com o objetivo de aprofundar esta discussão, o presente estudo pretende avaliar o eventual impacto da piridoxina na excreção urinária de oxalato utilizando-se um modelo animal de indução de hiperoxalúria previamente estabelecido em nosso serviço.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação oral da piridoxina (Vitamina B6) sobre a excreção urinária de oxalato, bem como seu impacto sobre a intensidade das alterações morfológicas e funcionais causadas pela nefrocalcinose no parênquima renal de ratos hiperoxalúricos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 60 ratos machos adultos da raça *Sprague-Dawley*, com peso entre 200 e 300 gramas, fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Unicamp (CEMIB).

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais no biotério do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, com uma semana de antecedência ao início do experimento, para adaptação ao novo ambiente onde tiveram livre acesso à água e ração específica para ratos, com monitorização diária da ingestão. A temperatura foi mantida em torno de 20°C, com ciclos de iluminação naturais.

Este trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da UNESP (ANEXO 1).

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos, assim constituídos:

- GRUPO 1 (G1 - Controle clínico), n=15:

Neste grupo, os animais não foram submetidos a nenhum tipo de intervenção, sendo utilizados apenas como controle clínico.

- GRUPO 2 (G2 – Etileno glicol a 0,5% + Vitamina D3), n=15:

Neste grupo, a hiperoxalúria foi induzida utilizando-se o etileno glicol a 0,5% (Fabricado pela *SIGMA ALDRICH*®, Brasil) diluído na água e fornecido “*ad libitum*” aos animais, em associação com a vitamina D3 (Colecalciferol – Farmácia Cruz Vermelha Fórmulas e Cosméticos®, Botucatu, São Paulo, Brasil), na concentração de 0,5 µM, dissolvida em 1 ml de óleo vegetal, administrada via gavagem, uma vez ao dia.

Este modelo foi padronizado segundo Cunha et al. (2013).

- GRUPO 3 (G3 – Etileno glicol a 0,5% + vitamina D3 + piridoxina), n=15:

Após serem submetidos ao mesmo processo de indução de hiperoxalúria destinado ao grupo dois, estes animais receberam ainda a piridoxina (Fabricada pela All Chemistry®, Brasil) na dose de 180 mg/kg peso do animal/dia, via gavagem, dissolvida em 1 ml de água.

- GRUPO 4 (G4 - Piridoxina), n=15:

Neste grupo, os animais receberam apenas uma dose diária de 180 mg/kg peso do animal de piridoxina (Fabricado por All Chemistry®, Brasil), administrada via gavagem, dissolvida em 1 ml de água.

3.3. DELINEAMENTO DO ESTUDO

No momento inicial do trabalho, foi colhida uma urina de 24 horas

de cada animal para análise do volume, pH, cálcio, oxalate e citrato urinários.

No momento M2, procedeu-se a analgesia dos animais com cetoprofeno intramuscular na dose de 1 mg/kg de peso (Biofen 10%® - Biofarm, Brasil). Em seguida, os mesmos foram anestesiados com quetamina (Cloridrato de Cetamina – Ketamina Agener 10%® - Agener União, Brasil) e xilazina (cloridrato de xilazina 2% - Anasedan® - Ceva, Brasil) na dosagem de 0,3ml/kg peso, por via intramuscular, para coleta de sangue e urina estéreis destinados à análise da creatinina e avaliação microbiológica da urina, respectivamente.

Os animais foram então eutanasiados utilizando-se dose letal de pentobarbital sódico a 3% (Hypnol 3%® - Syntec, Brasil) na dose de 2,5 vezes o peso do animal, por via intraperitoneal. Os rins foram coletados e destinados à análise histopatológica, histomorfométrica e determinação dos níveis de cálcio, conforme descrito na metodologia a seguir.

A figura 2 ilustra o tempo e as intervenções realizados no estudo.

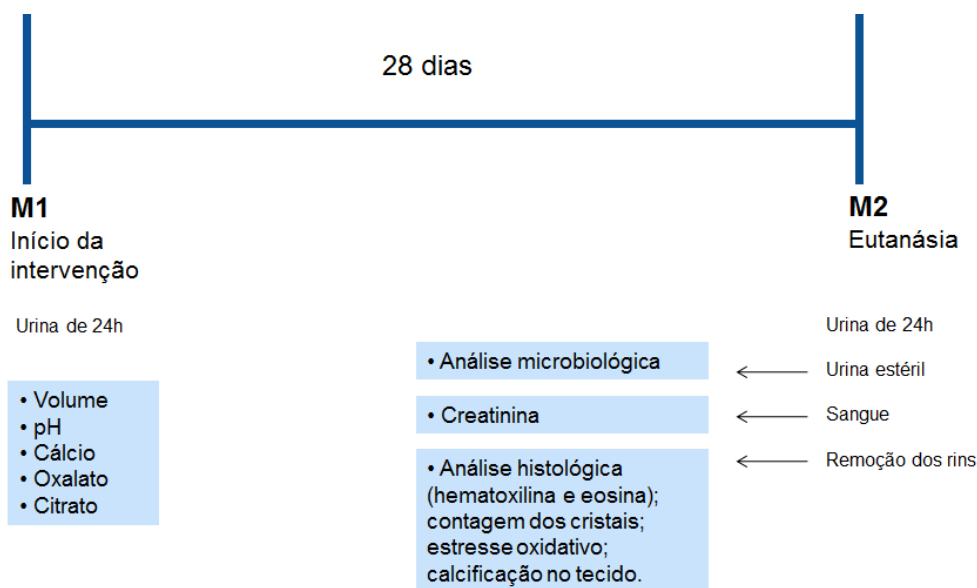


Figura 2. Fluxograma demonstrando o tempo de estudo e parâmetros analisados em cada grupo.

3.4. EXAMES LABORATORIAIS

3.4.1. Urina

O animal, uma vez anestesiado, foi posicionado em goteira de Claude Bernard e adequadamente imobilizado. Realizada antissepsiada da região ventral com iodopovidine tópico (Riodeine® - Rioquímica, Brasil) e colocação do campo oftálmico estéril, seguida pela de incisão xifo-púbica e abertura da parede abdominal por planos com bisturi frio lâmina 15. A bexiga foi exposta e puncionada utilizando-se seringa de 1 ml e agulha 13x45, estéreis (BD® *ultrafine*, Brasil), para coleta de material destinado à análise microbiológica (Figura 3). A urina, coletada em tubo estéril e mantida sob refrigeração a 4°C, foi enviada para cultura no Serviço de Diagnóstico Microbiológico e Micológico do Hospital Veterinário

do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Campus de Botucatu.

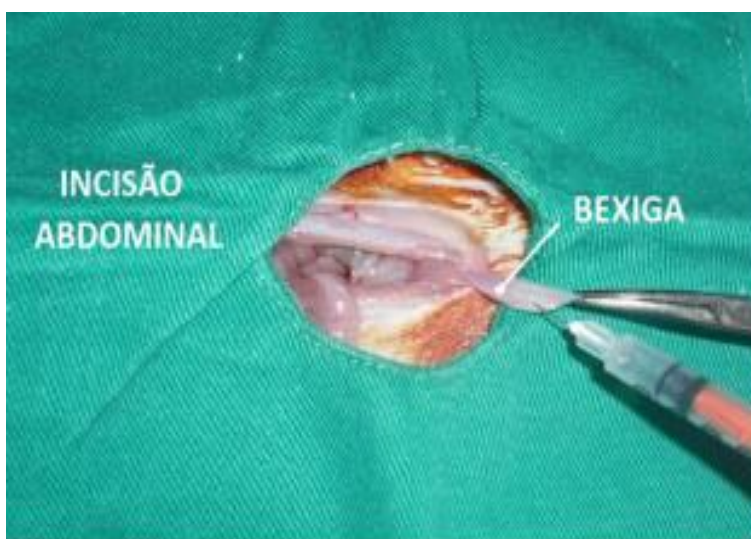


Figura 3. Procedimento de coleta de urina por punção vesical.

3.4.2. Sangue

Foi realizada punção cardíaca com seringa de 10ml e agulha 25x7 (BD® plastipak, Brasil) para obtenção de cerca de três mililitros de sangue para dosagem da creatinina (Figura 4). A amostra obtida foi acondicionada em tubo de vidro seco e mantida em repouso por 15 minutos, aguardando-se a formação do coágulo. Em seguida o soro foi separado, utilizando-se a centrífuga IEKE® modelo LC, em 2500 rotações por minutos, por 10 minutos. O soro, identificado e congelado a -18°C em freezer (Cônsul® Practice 240L, Brasil), foi posteriormente enviado ao Laboratório de

Análises Bioquímicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Campus de Botucatu, para dosagem de creatinina sérica utilizando-se o método automatizado Cobas®.

3.4.3. Urina de 24h

Conforme descrito anteriormente, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas (Figura 4) individuais para coleta da urina de 24 horas. Antes do congelamento das amostras, o pH foi determinado por meio de tiras reagentes utilizando-se o método colorimétrico comparativo (papel indicador de pH com escala variando de 0 a 14, da marca Macherey-Nage/®, Alemanha) e seu valor expresso em duas casas decimais. Os valores de pH foram determinados em dois momentos distintos, no início e ao final do experimento. As amostras foram congeladas e armazenadas a -10°C para posterior leitura dos seguintes parâmetros bioquímicos: oxalato, citrato e cálcio. A análise do cálcio foi realizada utilizando-se *kit* bioquímico da marca KATAL®, Intertec, Brasil. As amostras foram aferidas utilizando-se o método automatizado Cobas Mira Plus da marca Roche®, Suíça.

As alíquotas de urina para análise do oxalato e citrato foram respectivamente de 2 ml e 1 ml, sendo armazenadas separadamente e conservadas em ácido clorídrico na concentração de 16µl de ácido

clorídrico para cada mililitro de urina coletada. Para a dosagem de oxalato foi utilizado o *kit* bioquímico da marca *Trinity Biotech®*, Brasil. Para análise do citrato utilizou-se o método enzimático automatizado com os reagentes preparados no momento da dosagem de acordo com as orientações do fabricante. Nesta análise foram utilizadas as seguintes substâncias: citrato liase (citrate lyase fabricado pela *Sigma Aldrich®*, Brasil), NADH (*β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced sodium salt hydrate* fabricado pela *Sigma Aldrich®*, Brasil), ácido málico (malic dehydrogenase from porcine heart fabricado pela *Sigma Aldrich®*, Brasil), lactato (l-lactic dehydrogenase solution from porcine heart fabricado pela *Sigma Aldrich®*, Brasil), tampão *triz* (pH 8,2) e sulfato de zinco (30 mmol/L). Para ambas as aferições, utilizou-se o Aparelho de automação *Cobas Mira S* da marca *Roche®*, Suíça.



Figura 4. Ilustração da gaiola metabólica.

3.5. COLETA DOS RINS

Imediatamente após a parada cardiorrespiratória do animal, induzida pela dose letal de pentobarbital sódico, procedeu-se a coleta de ambos os rins, seguindo-se os princípios básicos da nefrectomia clássica.

Ambos os rins foram pesados em balança analítica com pesagem máxima de 210g e mínima de 100mg (Bel Engineering®, Itália), identificados e adequadamente preparados para armazenagem a -20°C.

O rim direito foi seccionado longitudinalmente em duas metades iguais, com auxílio de uma lâmina de bisturi número 20 (Martin Skalpellsäge®, Alemanha). A primeira metade destinou-se ao processamento para estudo histológico e histomorfométrico, enquanto que, a segunda, para determinação do estresse oxidativo, conforme metodologias descritas a seguir.

O rim esquerdo foi congelado e posteriormente destinado a análise do cálcio no parênquima renal.

3.6. QUANTIFICAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA NEFROCALCINOSE

Uma das metades do rim direito foi incluída em blocos de parafina e seccionada longitudinalmente com espessura de 5µm. Os cortes obtidos foram então corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE),

conforme técnica padronizada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

As lâminas foram fotografadas em um aumento final de 40 vezes utilizando-se uma câmera de captação de imagem (Leica®, modelo DFC 280, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (Leica®, modelo DMLS, Alemanha) instalado em microcomputador (Itautec®, processador AMD Athlon X2, Windows Vista®, Brasil). Foram escolhidas cinco regiões aleatórias em cada lâmina, as quais após serem fotografadas, passaram por criteriosa análise. Para avaliação da nefrocalcinose foram contados os cristais presentes no parênquima e nos túbulos renais, utilizando-se o programa *Image J*® versão 1.44 (NIH, Bethesda, EUA). O número de cristais foi determinado utilizando-se o *plug-in grid* do *Image J*®, o qual gerou uma grade com 100 pontos por campo. O resultado final foi expresso em número absoluto, sendo computados os cristais presentes em cada ponto de intersecção das linhas da grade gerada pelo referido programa (Figura 5).

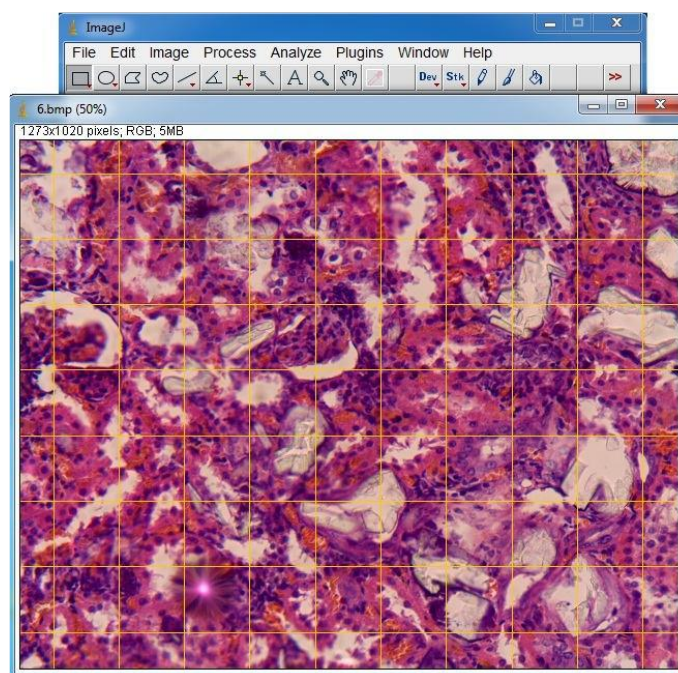


Figura 5. Ilustração do Programa *Image J*® versão 1.44 (NIH, Bethesda, USA), com grade de 100 pontos gerada sobre a lâmina.

A análise histopatológica por microscopia óptica foi realizada utilizando-se o software *Pannoramic Viewer*®, considerando-se os seguintes critérios classificatórios:

- Atrofia: Classificado como "AN" quando ausente, "AL" quando leve (um a dois focos de atrofia num campo de aumento de 40x) e "AI" quando intensa (três ou mais focos de atrofia num campo de aumento de 40x).
- Extravasamento estromal dos cristais: Utilizou-se "EN" para caracterizá-lo como ausente, "EF" quando focal (na presença de apenas um foco de extravasamento num campo de aumento de 40x); "EI" para extravasamento intermediário (dois a três num

campo de aumento de 40x) e "ED" para difuso (quatro ou mais nesse mesmo campo de aumento).

- Infiltrado inflamatório: Categorizado como ausente (IN), leve (IL) apresentando um tipo de infiltrado, moderado (IM) com dois ou três tipos de infiltrados ou intenso (Int) apresentando quatro ou mais tipos, sempre num campo de aumento de 40x.

3.7. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

As amostras de aproximadamente 200mg de tecido renal foram inicialmente armazenadas em freezer a -80°C . Posteriormente, para análise do estresse oxidativo, foram homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, na presença de tampão fosfato de sódio (0,01M) pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 12000 $\times g$, durante 15 minutos a -4°C (PEREIRA et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para as determinações da concentração de hidroperóxido de lipídeo, atividade das enzimas antioxidantes.

3.7.1. Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo

A concentração de hidroperóxido de lipídeo foi determinada através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em

metanol à temperatura ambiente. O Fe^{3+} reage com alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (JIANG et al., 1991).

3.7.2. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

3.7.2.1. Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px – EC 1.11.1.9)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo método de NAKAMURA et al. (1974) na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH_2 , azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH_2 a 340nm na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), determinou a atividade da GSH-Px.

3.7.2.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de EWING & JANERO (1995), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gerou fluxo de O_2^- do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a

amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra.

3.7.2.3. Determinação da atividade da catalase(E.C.1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras foram realizadas à 240nm (AEBI, 1974).

3.8. QUANTIFICAÇÃO DO CÁLCIO NO PARÊNQUIMA RENAL

3.8.1. Preparação das amostras

Uma vez removido, o rim esquerdo foi mantido em estufa de secagem (Fanem®, modelo Orion 515, Brasil) a 60°C por 48 horas para a completa extração de umidade do órgão. A amostra resultante foi triturada por cinco minutos a 1070 rpm com triturador *SPEX® SamplePrep* (Geno/Grinder, EUA, 2010) (Figura 6) localizado no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.



Figura 6. Triturador de tecidos moles.

A dosagem do cálcio no parênquima renal foi realizada no tecido já seco e triturado, nas dependências do laboratório LAMFI (Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos), no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP), utilizando-se a técnica PIXE (Proton Induced X-Ray Emission).

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

3.8.2. Sistema PIXE (Proton Induced X-Ray Emission).

Os alvos pipetados foram colocados na câmara PIXE e irradiados durante dez minutos para a obtenção da concentração de cálcio (Figura 7). Este sistema é composto por um acelerador eletrostático tipo Pelletron-tandem, modelo 5SDH fornecido pela NEC® (*National Electrostatic Corporation; EUA*), que pode alcançar até 1,7MV de tensão no terminal. Tal equipamento é constituído por uma fonte de íons SNICS (*Source of Negative Ions by Cesium Sputtering*), uma câmara de análise de alto vácuo (construída no IFUSP) e dois detectores de raio-X do tipo Si (Li) (Figura 8) (SANTOS, 2007).

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

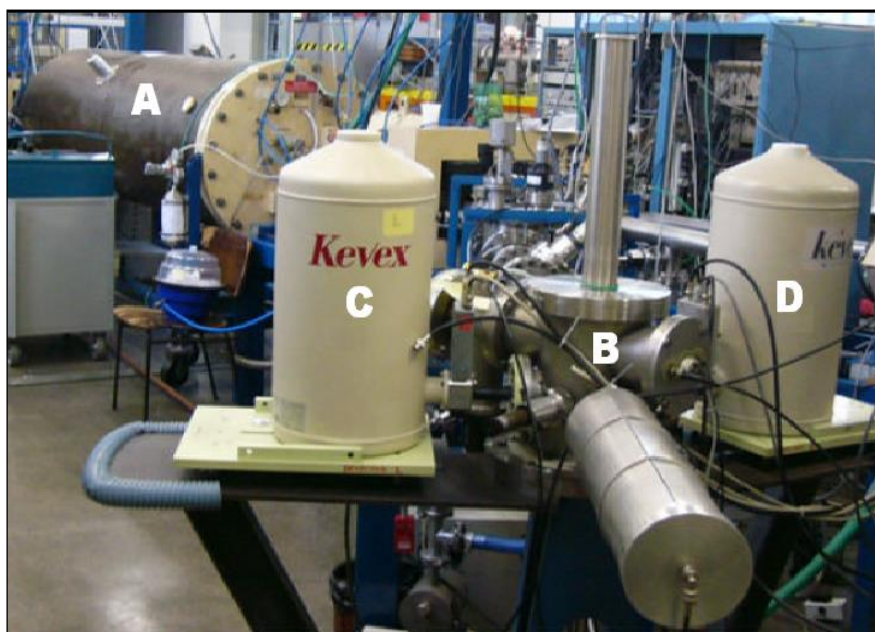


Figura 7. Dispositivo utilizado para determinação do Cálcio no parênquima renal: o acelerador de partículas (A) fica acoplado à câmara PIXE (B) e aos detectores de alta energia (C) e de baixa energia (D).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre os grupos quando variáveis contínuas apresentaram distribuição paramétrica foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

Nos grupos que apresentaram distribuição não paramétrica foram feitos ajustes de um modelo linear generalizado com distribuição gama seguido de teste de comparação múltipla de Wald.

Quando se comparou uma análise inicial com uma final foi utilizado modelo linear generalizado com distribuição gama em medidas repetidas seguido de teste de comparação múltipla de Wald.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DA INGESTÃO DE RAÇÃO E LÍQUIDOS

No momento inicial, como era esperado, os animais não apresentaram diferença estatística com relação ao peso (gramas), considerando-se os diferentes grupos. No entanto, quando se comparou a primeira com a última semana do estudo, observou-se que apenas os animais dos G1 e G4 obtiveram ganho de peso significativo, enquanto que os G2 e G3 mantiveram seu peso estável, associado à significativa redução na ingestão de ração e líquidos ao final do experimento.

Os dados estão apresentados 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 (primeira e última semana)*.

Média dos Parâmetros	Inicial				Final			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Peso (g)	242,8 ^a	235,1 ^a	241,1 ^a	261,4 ^a	402,1 ^b	256,8 ^a	259,3 ^a	392,2 ^b
Ingestão de ração (g)	26,0 ^a	20,5 ^b	21,2 ^b	26,2 ^a	30,2 ^a	14,1 ^a	14,9 ^a	20,5 ^a
Ingestão de líquidos (ml)	33,8 ^a	40,4 ^b	36,7 ^b	36,2 ^a	39,6 ^b	32,3 ^a	35,6 ^a	37,7 ^b

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p>0,05$). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.

** g= gramas; ml= mililitros

G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piridoxina.

4.2. EXAMES LABORATORIAIS

4.2.1. Urocultura

O exame microbiológico da urina não revelou crescimento bacteriano em nenhuma das amostras enviadas para análise.

4.2.2. Avaliação dos parâmetros urinários

A análise do pH da urina não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se os diferentes momentos (Tabela 2). Da mesma forma, considerando-se os animais de um mesmo grupo, o pH manteve-se estável, sem apresentar variações significativas ao longo do experimento ($p>0,05$).

Tabela 2. Comparação da média do pH urinário, segundo o grupo, em diferentes momentos (primeira e última semana)*.

Média do pH urinário	Inicial				Final			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
pH	8,0 ^a	7,6 ^a	7,4 ^a	8,1 ^a	8,4 ^a	8,0 ^a	7,4 ^a	8,0 ^a

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação entre grupos ($p>0,05$). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.
G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piridoxina.

Considerando-se o período total do estudo, o cálculo da média do volume urinário dos animais (VU) no período de 24 horas foi

significativamente menor nos grupos G1 e G4 quando comparado aos grupos G2 e G3 (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão do volume urinário final em 24 horas, segundo grupo.

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Volume (mL)	35,7 (12,3) ^a	71,9 (11,1) ^b	78,0 (21,3) ^b	41,8 (9,9) ^a

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p > 0,05$). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.
mL: mililitros
G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piridoxina.

A análise bioquímica da urina colhida ao final do experimento revelou uma redução significativa do citrato no grupo G2 quando comparada ao controle. Embora haja uma clara tendência de elevação dos níveis do citrato urinário entre os animais induzidos e tratados com a vitamina B6 (G3) em relação ao grupo indução (G2), esta diferença não foi estatisticamente significativa. O mesmo comportamento dos dados pôde ser observado entre os animais que receberam apenas a vitamina B6 (G4) em relação ao controle (G1) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão do citrato urinário final, segundo grupo.

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Citrato (mg/L)	2414,4(1480,8) ^{bc}	781,9(1149,6) ^a	1331,0(797,5) ^{ab}	3416,6(444,9) ^c

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos

($p > 0,05$). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.
mg: miligrama; L: litro
G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piriridoxina.

A dosagem do oxalato na urina de 24 horas mostrou-se significativamente aumentada nos G2 e G3 quando comparada ao grupo controle (G1). Entretanto, quando considerados apenas os animais que receberam a indução, independentemente da administração concomitante da vitamina B6, não se observou diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Já o G4 exibiu uma significativa diminuição do oxalato urinário em relação ao grupo controle (G1).

Os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores médios e desvio padrão do oxalato na urina de 24h, segundo grupo*.

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Oxalato (mg/L)	2,9 (0,03) ^c	7,8 (0,01) ^b	8,9 (0,01) ^b	2,0 (0,04) ^a

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p > 0,05$). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.
**mg: miligrama; L:Litro
G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piriridoxina.

O cálcio urinário apresentou redução significativa entre os animais induzidos (G2 e G3) quando comparado ao controle (G1), sendo ainda mais pronunciada entre os animais tratados com a vitamina B6 (G3) (Tabela 6).

Tabela 6.Valores médios e desvio padrão do cálcio na urina de 24h, segundo grupo*.

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Cálcio (mg/dL)	2,2 (0,05) ^c	1,5 (0,08) ^b	0,9 (0,12) ^a	2,5 (0,04) ^c

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos (p> 0,05). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.
**mg: miligrama; dL: decilitro
G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piridoxina.

4.2.3. Avaliação da creatinina

Os valores obtidos a partir da creatinina sérica foram significativamente maiores nos animais que receberam indução com etileno glicol (G2 e G3), independentemente do tratamento instituído. A administração da vitamina B6 isolada (G4) não revelou diferença significativa neste parâmetro em relação ao controle (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão da creatinina sérica, segundo grupo*.

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Creatinina (mg/dL)	0,6 (0,07) ^a	0,7 (0,06) ^b	0,7 (0,05) ^b	0,5 (0,08) ^a

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos (p> 0,05). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.
**mg: miligrama; dL: decilitro
G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piridoxina.

4.3. AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

Como esperado, os grupos G2 e G3 foram os únicos a apresentarem precipitação de cristais no rim, sem, no entanto, apresentar diferença significativa entre eles (Gráfico 1 e Figuras 8-10).

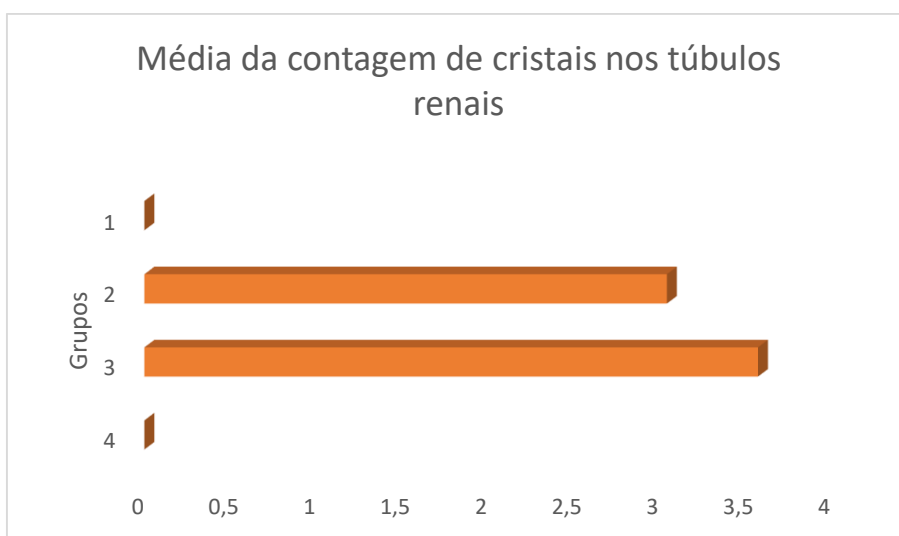


Gráfico 1. Comparação da média de cristais nos túbulos renais entre os grupos, segundo o método computadorizado utilizando-se o programa Image J.

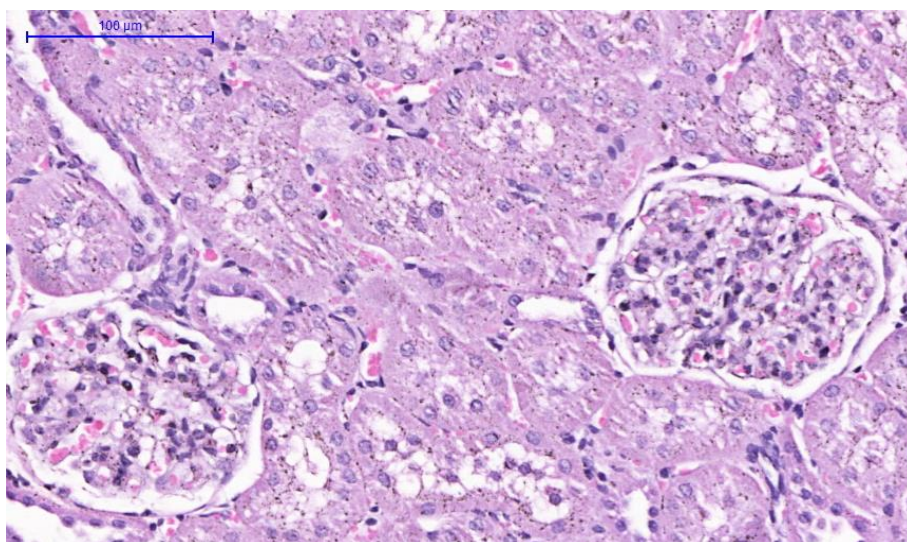


Figura 8. Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 1 (Controle) demonstrando a arquitetura renal preservada, coloração pelo H.E.

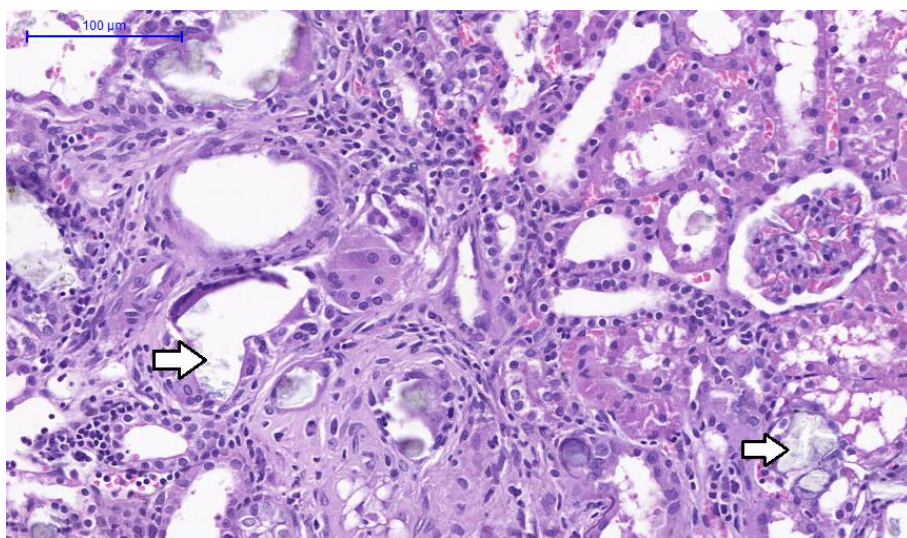


Figura 9. Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 3 (Etileno Glicol a 0,5% + Vitamina D3+ Piridoxina), demonstrando formação de cristais, apontado pelas setas.

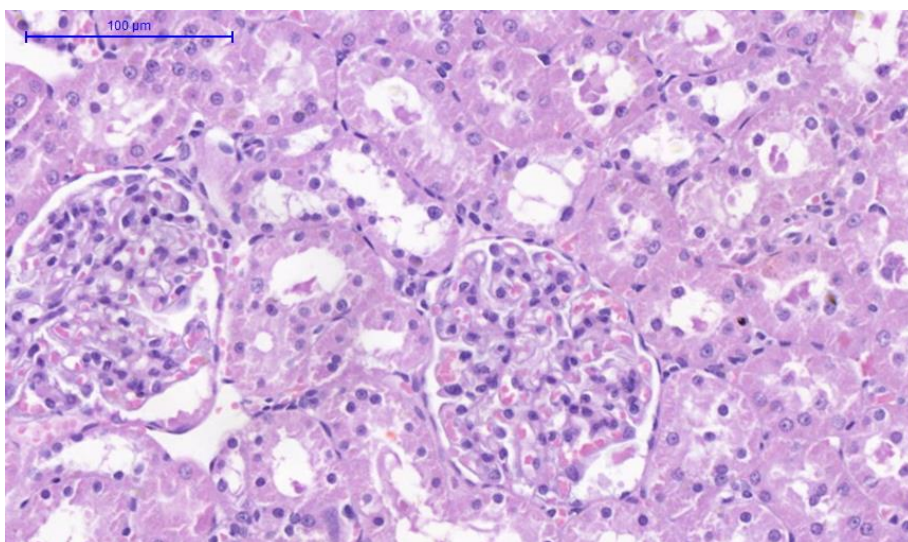


Figura 10: Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 4 (Piridoxina), demonstrando ausência de alterações histológicas significativas.

4.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Todos os animais submetidos à indução (G2 e G3) apresentaram atrofia das células renais, classificada como leve em 7% dos animais e intensa (I) em 93%. Não foi observada atrofia nos demais grupos.

Cerca de 93% dos animais do grupo G2 apresentaram extravasamento estromal, sendo este classificado como focal (EF) em 39% dos casos, 15% como intermediário (EI) e 46% difuso (ED). No G3, o extravasamento foi observado em 100% dos animais, sendo 13% EF, 47% EI e 40% ED. Não foi observado extravasamento estromal nos demais grupos.

O infiltrado inflamatório (IF) foi identificado em 93% dos animais do grupo G2, sendo classificado como leve (IL) em 40% dos casos, 30%

como moderado (IM) e 30% intenso (IInt). No grupo G3, o IF esteve presente em 100% dos animais, sendo 7% classificado como IL, 66% IM e 27% IInt. Os demais grupos não apresentaram infiltrado inflamatório.

A análise histopatológica segue critérios padronizados por Cunha et al (2013).

As alterações histológicas presentes nos animais pertencentes aos grupos 2 e 3 estão ilustradas nas figuras 11 e 12.

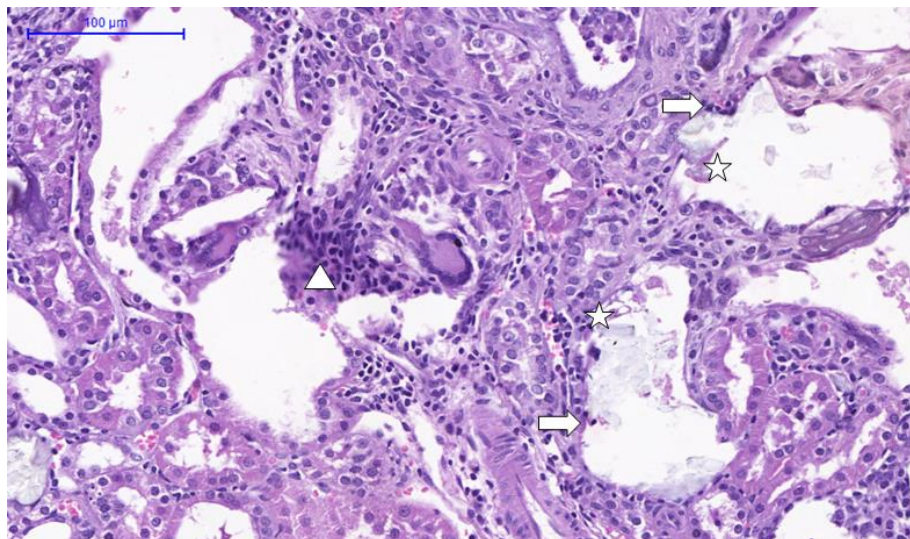


Figura 11: Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 2 (Etilenoglicol a 0,5% + vitamina D3), coloração pelo H.E, demonstrando a atrofia intensa das células (⇔), extravasamento estromal (☆), infiltrado inflamatório linfocitário (△).

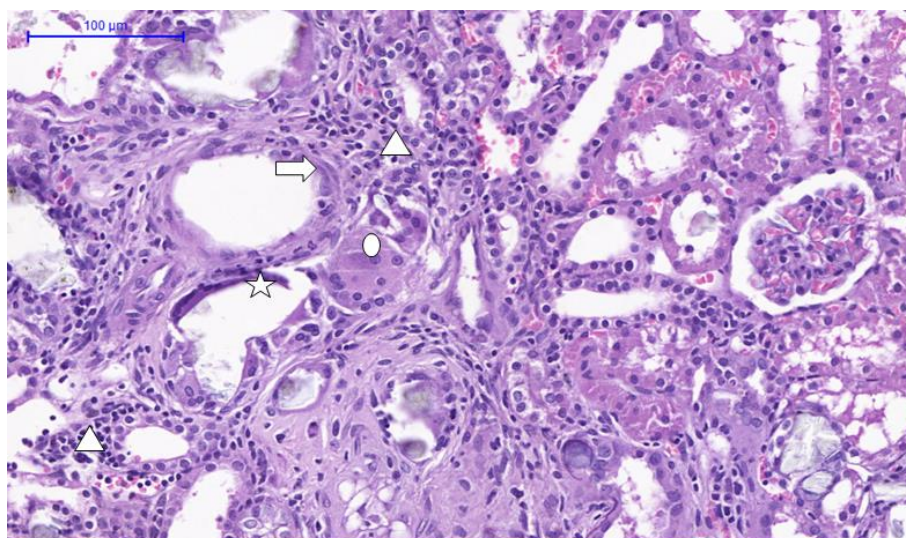


Figura 12: Corte histológico do rim direito de um animal do Grupo 3 (Etileno glicol a 0,5% + Vitamina D3 + Piridoxina), coloração pelo H.E, demonstrando a atrofia intensa das células ($\Rightarrow$), extravasamento estromal ($\star$), infiltrado inflamatório linfocitário ($\triangle$) e processo inflamatório com célula gigante multinucleada ($\circ$).

4.5. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

Considerando-se o hidroperóxido de lipídeo (HL), apenas os animais pertencentes ao grupo G2 apresentaram elevação significativa deste parâmetro quando comparados ao grupo controle. Embora esta mesma tendência à elevação tenha sido observada entre os animais que receberam apenas a piridoxina como intervenção (G4), esta não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). As enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx) revelaram comportamentos semelhantes entre os animais que receberam apenas a indução (G2) com etileno glicol (EG), apresentando redução significativa de suas atividades quando comparadas ao grupo controle. Analisando-se os demais grupos,

tais parâmetros mantiveram-se estáveis, com exceção do expressivo aumento da atividade da SOD observado entre os animais do grupo tratado apenas com piridoxina sem indução (G4). A atividade da Catalase (CAT) mostrou-se significativamente aumentada em todos os grupos estudados, quando comparada ao controle. Entretanto, este aumento foi mais importante entre os animais que receberam apenas indução com EG (G2), seguido pelo grupo induzido e tratado com piridoxina (G3). Dentre os grupos que sofreram algum tipo de intervenção, o menor aumento da atividade da CAT ocorreu entre os animais que receberam apenas a piridoxina (G4). Os dados estão ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da atividade das principais enzimas envolvidas no estresse oxidativo do parênquima renal, segundo grupo.

Grupos	Hidroperóxido nmol/g de tecido	SOD nmol/mg de proteína	GPx nmol/mg de proteína	CAT micromol/g de tecido
G1	127,2 (12,5) ^{bc}	12,6 (0,8) ^b	61,4 (6,7) ^a	11,6 (3,9) ^a
G2	161,7 (13,2) ^a	10,3 (1,0) ^a	41,4 (10,7) ^b	53,2 (7,2) ^b
G3	107,7 (20,5) ^c	12,6 (2,1) ^b	53,1 (7,6) ^a	38,9 (9,4) ^c
G4	138,5 (17,1) ^b	29,2 (6,6) ^c	52,7 (6,1) ^a	23,3 (6,3) ^d

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p > 0,05$). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.

Desvio padrão: valores referenciados entre parênteses.

G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piridoxina.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DO CÁLCIO NO PARÊNQUIMA RENAL

A quantificação de cálcio no parênquima renal foi significativamente maior nos animais pertencentes aos grupos G2 e G3 quando comparada ao restante, sem, no entanto, apresentar diferença significativa entre eles (Tabela 9).

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão do cálcio quantificado no parênquima renal segundo grupo.

Grupos	Quantificação do Cálcio no parênquima renal (ppm - mg/kg)	Desvio - Padrão
G1	428,0 ^a	61,2
G2	60198,6 ^b	14799,0
G3	65956,4 ^b	14537,9
G4	447,3 ^a	64,1

*Proporções da mesma letra minúscula em uma categoria não diferem na comparação de grupos ($p > 0,05$). Todas as conclusões foram feitas a 5% no nível de significância.
ppm:parte por milhão; mg: miligramas; kg: quilograma;
G1 = Grupo Controle; G2 = EG 0,5% + Vit D3; G3 = EG 0,5% + Vit D3 + Piridoxina; G4 = Piriridoxina.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Diferentes abordagens farmacológicas, como o uso de drogas inibidoras das enzimas aldeído desidrogenase ou oxidase glicolato, por exemplo, já foram testadas em animais e em seres humanos, na tentativa de desenvolver uma terapêutica eficaz para o tratamento da hiperoxalúria, tendo como alvo a biossíntese do oxalato (CHETYRKIN et al., 2005). Infelizmente, a maioria delas, com resultados bastante controversos (SOLOMONS et al., 1967; ROONEY et al., 1983).

A relação entre a vitamina B6 e o metabolismo de oxalato foi sugerida há muitos anos e pode ser demonstrada claramente em diferentes situações. A hiperoxalúria primária do tipo 1, por exemplo, na qual ocorre uma deposição sistemática de oxalato em vários tecidos e órgãos além do rim, pode ter seus efeitos atenuados com a administração farmacológica de vitamina B6 (ALINEI et al., 1984, YENDT & COHANIM, 1985). Da mesma forma, estudos experimentais demonstraram que a depleção de vitamina B6 pode resultar em hiperoxalúria e nefrocalcinose em gatos e ratos (GERSHOFF et al., 1959; KAE LIN et al., 2004). Ambas as observações estão relacionadas ao fato de que a piridoxina age como um cofator da enzima hepática alanina glioxilato aminotransferase, que converte glioxilato em glicina, reduzindo, assim, a via de conversão de glioxilato a oxalato, conforme demonstrado anteriormente (Figura 1). Baseado nesses achados, nosso estudo procurou estabelecer os potenciais efeitos da suplementação oral com vitamina B6 nos parâmetros

urinários e histológicos em um modelo experimental de hiperoxalúria não endógena.

Conforme caracterizada nos resultados apresentados, a ausência de diferença no peso entre os animais no momento inicial demonstra a homogeneidade dos grupos estudados. No entanto, quando se compara a primeira com a última semana de estudo, observamos um ganho de peso significativo apenas entre os animais pertencentes aos grupos G1 e G4, enquanto que os demais permaneceram com seus pesos praticamente estáveis (G2 e G3). Tal achado pode ser explicado, pelo menos em parte, pelas alterações gastrointestinais e metabólicas produzidas pelo próprio agente indutor da hiperoxalúria (etilenoglicol), resultando assim em diminuição do apetite e da disposição desses animais em se alimentar. Essa hipótese é corroborada pelos achados referentes ao consumo de água e ração por estes animais ao término do experimento conforme demonstrado na Tabela 1, os quais se mantiveram abaixo daquelas observadas no grupo controle (G1).

A análise do pH urinário (pHu), não revelou variação estatisticamente significativa dentro de um mesmo grupo, considerando-se os momentos inicial e final do experimento. Da mesma forma, nenhuma diferença foi observada entre os grupos. Esta aparente estabilidade, associado ao fato de que diferentes trabalhos afirmam que a solubilidade e a agregação de cristais de OxCa não é afetada pela variação do pHu (COPELOVITCH et al, 2012; OTOCKA et al, 2012), demonstra que tal

variável não interferiu nos resultados por nós obtidos.

O volume urinário (VU) é sabidamente um fator importante na etiopatogenia da litíase renal, pois uma baixa diurese pode resultar em maior concentração de solutos litogênicos, contribuindo assim com a maior formação dos cálculos renais (HONG et al., 2012). Em nosso estudo observamos, paradoxalmente, um maior VU nos grupos induzidos (G2 e G3), apesar destes animais terem ingerido menos líquidos quando comparados ao grupo controle. Esta possível contradição poderia ser explicada pelo dano renal causado pelo etileno glicol, resultando em uma progressiva desestruturação da arquitetura renal, conforme demonstrado pela análise histológica dos rins avaliados. De acordo com alguns autores, essa fase poliúrica que antecede a insuficiência renal terminal pode ter início cerca de 48 a 72 horas após a exposição ao agente indutor, na dependência da gravidade da intoxicação (BRENT et al., 1999). Seja qual for o real motivo responsável pelo aumento do VU observado nesses animais, tal fato não foi capaz de prevenir os danos causados pela deposição maciça dos cristais no rim.

Assim como o aumento do VU, o citrato desempenha papel importante na prevenção da LTU, sendo considerado um importante inibidor da precipitação de cálculos, atuando na prevenção da nucleação e agregação dos cristais (CHOW et al., 2004; GRASES et al., 2015). A análise da urina de 24 horas (U24h) dos animais submetidos ao processo de indução de hiperoxalúria revelou significativa redução do citrato urinário

quando comparado ao controle. Tal evidência sugere que o agente indutor, de alguma forma, é capaz de reduzir a excreção de citrato a cerca de um terço do normal, contribuindo assim para agravar os efeitos da nefrocalcinose. Curiosamente, este mesmo desfecho que seria esperado também entre os animais do G3 não foi observado, sugerindo que a piridoxina possa ter minimizado o impacto negativo do etileno glicol sobre a excreção do citrato. Infelizmente, conforme demonstrado pela análise histomorfométrica e pela quantificação do cálcio no parênquima renal, este fato isoladamente, não foi capaz de prevenir os danos renais a ponto de repercutir positivamente na melhora da função renal desses animais.

Conforme era esperado, o processo de indução da hiperoxalúria com etileno glicol resultou em um significativo aumento dos níveis de oxalato na U24h dos animais induzidos (G2 e G3). A administração concomitante da piridoxina não foi capaz de atenuar a oxalúria no grupo tratado (G3). Avaliando os animais que receberam apenas a piridoxina como intervenção (G4), estes apresentaram uma discreta, porém significativa redução dos níveis de oxalato urinário. Embora não se possa afirmar, tal fato sugere um provável efeito benéfico da piridoxina auxiliando na redução dos níveis da oxalúria em pacientes onde este fator possa estar contribuindo para a formação da LTU. Considerando-se ainda os parâmetros avaliados na urina de 24 horas, observou-se uma diminuição significativa do cálcio nos grupos induzidos (G2 e G3). Com isso, a cristalização e consequente deposição do complexo OxCa no

parênquima renal, pode ser o fator responsável pela diminuição da concentração deste íon na urina, conforme sugerido por Khandrika e colaboradores (KHANDRIKA et al., 2012).

Para a maioria dos autores é nítida a correlação entre a piora da função renal e a urolitíase, onde a obstrução do sistema urinário pelos cálculos resultaria em um dano progressivo ao parênquima renal com conseqüente perda da função (ALEXANDER et al., 2012; JAGANNATH et al., 2012). Neste trabalho, observou-se que a creatinina sérica foi significativamente maior nos grupos formadores de cristais (G2 e G3) em relação ao controle onde, mais uma vez, a administração concomitante da piridoxina não foi capaz de impedir a elevação dos níveis de creatinina. Infelizmente, não podemos quantificar o real comprometimento da função renal nos animais submetidos ao processo de indução, uma vez que a creatinina sérica não se caracteriza como um marcador suficientemente sensível para este fim.

A exemplo dos demais parâmetros avaliados, na comparação entre os grupos induzidos (G2 e G3), a contagem dos cristais no parênquima renal foi semelhante, não sendo observada diferença significativa entre eles, demonstrando que a piridoxina não foi capaz de auxiliar na prevenção da formação dos cristais. Da mesma forma, a análise histopatológica mostra que as alterações inflamatórias e estruturais (processo inflamatório agudo, atrofia epitelial e extravasamento estromal) só estiveram presentes nos grupos que desenvolveram a nefrocalcinose

(G2 e G3), em uma proporção muito semelhante, sugerindo que a deposição dos cristais nos túbulos e no parênquima renal está diretamente envolvida na gênese das alterações observadas. Considerando-se que na nefrocalcinose os cristais de OxCa são formados inicialmente na luz dos túbulos e se deslocam progressivamente para dentro da célula ou para o espaço intersticial, resultando em lesão progressiva do tecido renal, os efeitos diretos e indiretos deste processo poderiam ocasionar as alterações inflamatórias e morfológicas por nós observadas e que foram previamente descritas por Khan (2010), explicando assim os achados histopatológicos do nosso estudo.

Embora os reais mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda não estejam totalmente esclarecidos, há evidências crescentes de que são produzidas espécies reativas de oxigênio e que o estresse oxidativo (EO) se desenvolve na nefrolitíase idiopática por OxCa. Acredita-se ainda que o EO, a lesão renal epitelial e a inflamação estejam presentes também na formação do cálculo idiopático, sendo identificados pela excreção urinária de espécies reativas de oxigênio, produtos de peroxidação lipídica e enzimas indicativas de lesão epitelial renal, bem como marcadores de doença renal crônica. Esse processo crônico de agressão envolvido na formação dos cálculos renais pode contribuir para o desenvolvimento de fatores agravantes como a hipertensão, diabetes, doença renal crônica e enfarte do miocárdio (KHAN et al, 2013).

Analisando-se o hidroperóxido de lipídeo (HL), um produto

resultante da peroxidação lipídica, observa-se que os ratos induzidos e não tratados (G2) apresentaram elevação significativa deste produto, refletindo o maior dano celular causado pelo EO nesses animais. Já o grupo tratado (G3), manteve-se estável comparado ao controle. Este fato sugere que a piridoxina possa apresentar um aparente efeito antioxidante protetor frente ao processo de indução, o que, mais uma vez, poderia vir a beneficiar indivíduos formadores de nefrolitíase secundária à hiperoxalúria.

A Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx), enzimas com conhecida atividade antioxidante, revelaram comportamentos semelhantes entre si, exibindo significativa redução de sua atividade entre os animais induzidos (G2) quando comparados ao controle. Entretanto, este mesmo padrão de comportamento não foi observado entre os animais hiperoxalúricos tratados com a piridoxina (G3), no qual a atividade de ambas manteve-se estável. No que se refere à GPx, a piridoxina poderia ter exercido um efeito na manutenção do *status* da atividade enzimática, atuando como cofator na síntese de cisteína (precursor da síntese de glutathione) (GRIMBLE et al, 1997; ZEMBRON-LACNY et al, 2007). Curiosamente, a SOD demonstrou um significativo aumento de sua atividade entre os animais que receberam apenas a piridoxina (G4) quando comparado aos demais grupos. Não encontramos entre os nossos resultados, ou mesmo na literatura, uma explicação para justificar o ocorrido.

Dentre as enzimas antioxidantes avaliadas, apenas a Catalase (CAT) apresentou comportamento diferente das demais (HONG et al., 2013; NAGHII et al, 2014; GRASES et al., 2015). Conforme demonstrado, a CAT exibiu um significativo aumento de sua atividade em todos os grupos em relação ao controle, sendo mais expressivo nos animais que receberam apenas a indução (G2). De acordo com Afyianti e colaboradores (AFYIANTI & CHEN; 2014), a atividade da catalase é modulada diretamente pelo íon cálcio, elemento este que se mostrou particularmente abundante no parênquima renal dos animais induzidos (G2 e G3), no qual o processo de nefrocalcinose foi bastante evidente. Conforme sugerido pela análise histomorfométrica dos cristais no parênquima renal, a técnica de PIXE revelou que a quantificação do cálcio nos animais submetidos ao processo de indução (G2 e G3) foi cerca de 140 a 150 vezes maior quando comparada ao controle, demonstrando claramente a eficácia do papel do etileno glicol como agente indutor da nefrocalcinose. No entanto, mais uma vez, quando se analisa sob o ponto de vista de tratamento, a piridoxina não apresentou efeito protetor com relação também a este parâmetro.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que a suplementação oral com piridoxina não foi capaz de reduzir os níveis de oxalúria nos animais submetidos ao processo de indução. Embora tenha demonstrado uma tendência a alterar favoravelmente alguns parâmetros anti-litogênicos, a vitamina B6 não produziu um efeito significativo no tratamento e/ou na prevenção das alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais do parênquima renal de ratos com hiperoxalúria induzida a partir da associação de etileno glicol e vitamina D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H.U., editor. Methods of enzymatic analysis Academic. New York: Academic Press. 1974; 673-7.

Afiyanti M, Chen HJ. Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato. J Plant Physiol. 2014;171(2):35-47.

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.

Alinei P, Guignard J, Jaeder P. Pyridoxine treatment of type 1 hyperoxaluria. N Engl J Med. 1984; 311:798-9.

Asplin J. Obesity and urolithiasis. AdvChronicKidneyDis. 2009;16(1):11–20.

Amaro CRPR, Goldberg J, Amaro JL, Padovani CR. Metabolic assessment in patients with urinary lithiasis. Int Braz J Urol Vol. 2005; 31(1): 29-33.

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;155(3):839–43.

Brent J, McMartin K, Phillips S, et al. Fomepizole for the treatment of ethylene glycol poisoning. Methylpyrazole for Toxic Alcohols Study Group. N Engl J Med 1999;340: 832–8

Chetyrkin SV, Kim D, Belmont JM, Scheinman JI, Hudson BG, Voziyan PA. Pyridoxamine lowers kidney crystals in experimental hyperoxaluria: a potential therapy for primary hyperoxaluria. Kidney Int. 2004; 67: 53-60.

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

Coe FL, Nakagawa Y, Parks JH. Inhibitors within the nephron. Am J

Kidney Dis. 1991; 17: 407-13.

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

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

Danpure CJ, Purdue PE. Primary hyperoxaluria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 2385–424.

Departamento de Informática do SUS (DATASUS) [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.

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

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

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.

Grimble RF. Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *Int J Vitam Nutr Res.* 1997; 67(5): 312-20.

Heilberg IP, Boim MA, Schor N. Biochemical differences between stone formers and normal subjects. In: Segura J, Conort P, Khoury S, Pak C, Preminger GM, Tolley D, editors. *Stone disease. Proceeding of the 1st International Consultation on Stone Disease*. France: Health Publications; 2003. 61-4.

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

Heilberg IP, Weisinger JR. Bone disease in idiopathic hypercalciuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15: 394-402.

Heilberg IP, Schor N. Litíase renal: fisiopatogenia e tratamento. J Bras Nefrol. 1994; 16: 125-33.

Hyams ES, Matlaga BR. Economic impact of urinary stones. Transl Androl Urol 2014;3:278-83.

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.

Hong JK, Kang SR , Kim YH , Yoon DJ, Kim DH , Kim HJ , Sung CH, Kang HS , Choi CW , Kim SH, Kim YS. Hydrogen Peroxide- and Nitric Oxide-mediated Disease Control of Bacterial Wilt in Tomato Plants. Plant Pathol J. 2013;29(4):386-96.

Gershoff S, Faragalla F, Nelson D, Andrus S. Vitamin B6 deficiency and oxalate nephrocalcinosis in the cat. Am J Med. 1959;72-80.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Governo Federal do Brasil [Internet]. 2015. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2015/estimativa_dou_2015_20150915.pdf.

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.

Jiang ZY, Woolard ACS, Wolf SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the present of xylenol orange. Lipids. 1991;v.24, p.861-9.

Joual A, Rais H, Rabii R. Epidemiology of urinary lithiasis. Ann Urol. 1997; 31: 80-3.

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

Kaelin A, Casez JP, Jaeger P. Vitamin B6 metabolites in idiopathic calcium stone formers: no evidence for a link to hyperoxaluria. Urol Res. 2004;

32:61-8.

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

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

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

Khan SR, Glenton PA. Experimental induction of Calcium Oxalate Nephrolithiasis in Mice. J Urol 2010; 184:1189-96.

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

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

Khan SR. Reactive Oxygen Species as the Molecular Modulators of Calcium Oxalate Kidney Stone Formation: Evidence from Clinical and Experimental Investigations. J Urol. 2013; 189(3): 803-11.

Korkes F, Silva JL, Heilberg IP. Custo do tratamento hospitalar da litíase urinária para o Sistema Único de Saúde brasileiro. Gestão e economia da Saúde Einstein. 2011; 9(4):518-22

Laranja SMR, Heilberg IP, Coelho STSN, Novoa CG, Schor N. Estudo multicêntrico de litíase renal no Brasil (MULTILIT). In: Schor N, Heilberg IP. Calculose renal: fisiopatologia, diagnóstico, tratamento. São Paulo: Sarvier; 1995. p. 295-8.

Levy FL, Adams-Huet B, Pak CYC. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. Am J Med. 1995; 98: 50-9.

Naghii MR, Eskandari E, Mofid M, Jafari M, Asadi MH. Antioxidant therapy prevents ethylene glycol-induced renal calcium oxalate Crystal deposition in Wistar rats. Int Urol Nephrol. 2014;46:1231-8.

Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. Biochim Biophys Acta. 1974;358: 251-61.

Ortiz-Alvarado O, Miyaoka R, Kriedberg C, Moeding A, Stessman M,

Monga M. Pyridoxine and Dietary Counseling for the Management of Idiopathic Hyperoxaluria in Stone-forming Patients. *Urol.* 2011; 77: 1054-8.

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

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(6).

Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol.* 2000;13(3):45-50.

Romero V, Akpınar H, Assimos D. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol.* 2010;12(2–3):e86–96.

Romero V, Hakpınar H, Assimos DG. Kidney Stones: A Global Picture of Prevalence, Incidence, and Associated Risk Factor. *Rev Urol.* 2010; 12:86–96.

Rooney CS, Randall WC, Streeter KB, *et al*: Inhibitors of glycolic acid oxidase 4–Substituted 3-hydroxy-1H-pyrrole-2,5-dione derivatives. *J Med Chem.* 1983;26:700–14.

Rule AD, Lieske JC, Li X, Melton LJ 3rd, Krambeck AE, Bergstralh EJ. The ROKS nomogram for predicting a second symptomatic stone episode. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(12):2878-86.

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

Scheinman JI, Voziyan PA, Belmont JM, Chetyrkin SV, Kim D, Hudson BG. Pyridoxamine lowers oxalate excretion and kidney crystals in experimental hyperoxaluria: a potential therapy for primary hyperoxaluria. *Urol Res.* 2005; 33: 368-71.

Serra A, Correia M. Nefrocalcinose medular humana. *Rev Port Nefrol Hipert.* 2004;18:15-32.

Solomons CC, Goodman S., Riley CM: Calcium carbimide in the treatment of primary hyperoxaluria. *N Engl J Med.* 1967;276:207–10.

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

Taylor E, Fung T, Curhan G. DASH-style diet associates with reduced risk for kidney stones. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(10):2253–9.

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

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

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

Trinchieri A, Ostini F, Nespoli R, Rovera F, Montanari E, Zanetti G. A prospective study of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. *J Urol*. 1999; 162: 27-30.

Turney BW, Reynard JM, Noble JG, Keoghane SR. Trends in urological stone disease. *BJU Int*. 2012;109(7):1082–7.

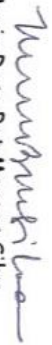
Worcester EM, Coe FL. Clinical practice. Calcium kidney stones. *N Engl J Med*. 2011;363(10):954-63.

Yendt E, Cohanin M. Response to a physiologic dose of pyridoxine in type 1 primary hyperoxaluria. *N Engl J Med*. 1985;312:953-7.

Zembron-Lacny A, Szyszka K, Szyqula Z. Effect of cysteine derivatives administration in healthy men exposed to intense resistance exercise by evaluation of pro-antioxidant ratio. *J Physiol Sci*. 2007; 57(6): 343-8.

ANEXOS

ANEXO 1

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA 	 Comitê de Ética em Experimentação Animal  Criado através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99
Certificado	
Certificamos que o (Protocolo CEEA 958-2012) "Avaliação do papel da Piridoxamina na prevenção da nefrolitíase induzida pela hiperoxalúria em ratos", a ser conduzido por Natália Baraldi Cunha, orientada pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano, Co-orientada pelo Prof. Titular João Luiz Amaro, com a colaboração de Elói Siqueira Magalhães, Isabela Berranholi Leme da Silva, Patrícia Capuzzo Garcia Damásio, Thayse Motebello Tapias e apoio técnico de José Lucas de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.	
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 02/08/2012. Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA 	 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 16.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail: secretaria_capelluppi@fmb.unesp.br	

ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA

Objetivo Acadêmico:

- () Pós Doutorado
(x) Tese Doutorado
() Dissertação de Mestrado
() Trabalho científico
() Outros: Especificar

Título Inicial:

Avaliação do papel da piridoxamina na prevenção da nefrolitíase induzida pela hiperoxalúria em ratos

Título Final:

Avaliação do papel da piridoxina na prevenção da nefrocalcinose induzida pela hiperoxalúria em ratos

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 02/08/12

Declaro que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

Nome e Assinatura do Orientador(a)

Nome e Assinatura do Orientado(a)

- **Projetos submetidos via Plataforma Brasil:** Preencher o formulário, digitalizar, protocolar no CEP e postar no sistema Plataforma Brasil.
- **Projetos submetidos anteriormente à Plataforma Brasil:** Preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o parecer inicial de aprovação.