Carolina Martinez Romão

**Evolução da injúria renal aguda causada pela sobrecarga
de sódio na dieta: tratamento com N-acetilcisteína e os
efeitos no metabolismo ósseo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa

São Paulo

2018

Carolina Martinez Romão

**Evolução da injúria renal aguda causada pela sobrecarga
de sódio na dieta: tratamento com N-acetilcisteína e os
efeitos no metabolismo ósseo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Romão, Carolina Martinez

Evolução da injúria renal aguda causada pela
sobrecarga de sódio na dieta : tratamento com N-
acetilcisteína e os efeitos no metabolismo ósseo /
Carolina Martinez Romão. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Luzia Naoko Shinohara Furukawa.

Descritores: 1.Lesão renal aguda 2.Isquemia
3.Reperusão 4.Acetilcisteína 5.Distúrbio mineral e
ósseo na doença renal crônica

USP/FM/DBD-133/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica – LIM 16 da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Todos os experimentos realizados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de Pesquisa nº 174-15).

Este trabalho integra o projeto regular (FAPESP 2013/25909-1) intitulado *“Avaliação da influência da sobrecarga de sódio e do tratamento com N-acetilcisteína ou células-tronco mesenquimais em ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal”*.

Para meus pais.

Agradecimentos

Á Dra. Luzia minha orientadora, professora e amiga por toda amorosidade, paciência e acolhimento que sempre me deu, pelo exemplo de superação e otimismo, que muito me ajuda nos momentos que mais preciso.

Ao Rafael, o irmão que ganhei ao longo dessa jornada, o gêmeo que o destino me deu, tem sido um privilégio caminhar ao seu lado nas batalhas e risos diários que vivemos nessa fase. Levarei nossa amizade para vida.

Á Viviane e Karol pela amizade de quase 10 anos. Por serem minhas melhores amigas. Por me ouvirem, por participarem de cada sorriso e cada lágrima derramada ao longo de todos esses anos. Obrigada por serem as pessoas maravilhosas que são. Amo vocês, Flô e Maria.

Á Ivone pessoa mais legal que conheço! A sua alegria pela vida é tão contagiante que revigora a energia de todos ao seu redor. Obrigada pelos ensinamentos, amizade, risos gratuitos e por ser luz.

Á Dra. Fabi, um grande exemplo de força feminina! Eterna capitã do meu time do coração (MED Rugby femino) foi uma honra jogar e trabalhar com você.

Ao Dr Joel, por todo aprendizado e apoio que me transmitiu desde a iniciação científica, pelas conversas e risos nos momentos de abstração.

Ao grupo do osso Dra. Vanda, Dra. Luciene, querido Wagner, Dra Rosa que tanto nos apoiaram ao longo deste estudo com ensinamentos, não só acadêmicos, mas também sobre a vida.

Aos meus queridos amigos da DRC que aprendi a gostar e admirar Fernanda, Neto, Amanda, Simone, Lisienny, Victor, pela companhia no

bandeijão, na sala dos alunos, pelas risadas, brincadeiras, amizade e vivências que ajudaram a tornar o dia a dia mais leve.

Aos meus queridos amigos do grupo da hipertensão Karen, Isis, Sônia, Priscila, Ellen, Guilherme por todo aprendizado em conjunto, pela convivência, pelos risos, pelo incentivo e companheirismo que continuam mesmo de longe.

Aos companheiros do LIM-16 Ana Paula, Prof. Roberto, Dra. Clarice, Solange, Denise, Walter, Janice, Meire, Claudia, Seu Newton pelas conversas e sempre pronta ajuda.

Aos parceiros do LIM-12 Dra. Heloísa, Dr. Rildo e Mirela; LIM-10 Dra. Valéria e Kely; LIM-18 Dra. Rosa, que gentilmente nos auxiliaram nas técnicas deste estudo.

Aos anônimos que mudaram minha história um dia de cada vez, só por hoje.

Aos animais que viabilizaram este estudo.

À Faculdade de Medicina e ao programa de Pós-graduação da Nefrologia por terem me aceitado. À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto e à CAPES, pela concessão da Bolsa de estudos.

Aos meus pais Angela e Vanildo os maiores presentes que Deus me deu, os amores da minha vida, o que tenho de mais precioso e melhor, sou grata todos os dias pela dádiva que são vocês para mim.

Ao meu Deus, pois até aqui Ele tem me ajudado.

Ostra feliz não faz pérola.

Rubem Alves

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Animais	13
3.2 Protocolo experimental	13
3.2.1 Cirurgias	16
3.2.2 Evolução ponderal	17
3.2.3 Pressão arterial caudal	17
3.2.4 Coleta de sangue	18
3.2.5 Gaiola metabólica	18
3.3 Dosagens bioquímicas	18
3.4 Ensaios de ELISA	19
3.5 Quantificação da 1,25 dihidroxivitamina D	20
3.6 Histologia renal	20
3.7 Histomorfometria óssea	21
3.8 Análise estatística	23
4. RESULTADOS	
4.1 Creatinina sérica na fase inicial pós isquemia e reperfusão	24
4.2 Consumo hídrico e alimentar	25
4.3 Pressão arterial, função renal, massa e histologia renal	27
4.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e estado de antioxidante total (TAS)	30
4.5 Metabolismo mineral ósseo	31
4.6 Parâmetros de histomorfometria óssea	37
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS	61
8. ANEXOS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

1, 25(OH)2D	1,25-Dihidroxivitamina D
ADQI	<i>Acute Disease Quality Initiative</i>
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AQ2	Aquaporina tipo 2
AQP2	Aquaporina 2
AT1	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina II tipo 2
ATPases	Adenosinatrifosfatases
BAX	Proteína X associada à BCL-2
BFR/BS	Taxa de formação óssea/Superfície óssea
BMP	Proteína morfogênica óssea
BV/TV	Volume ósseo/Volume trabecular
Ca	Cálcio
CICr	<i>Clearance</i> de creatinina
CSR	Receptor cálcio sensível
DMO	Distúrbio mineral ósseo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRA	Doença renal aguda
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EP	Erro padrão
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ES/BS	Superfície de erosão/Superfície óssea

EUA	Estados Unidos da América
Fe	Fração de excreção
FGF-23	Fator de crescimento fibroblástico-23
FGFs	Fatores de crescimento fibroblástico
h	Hora
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HR	Dieta hipersódica
HS	Dieta hipersódica (8% NaCl)
IGF	Fator de crescimento tipo insulina
IL	Interleucina
IR	Isquemia e reperfusão renal
IRA	Insuficiência renal aguda
K	Potássio
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
LPS	Lipopolissacarídeos bacterianos
MAR	Taxa de aposição mineral
MLT	Tempo de mineralização tardia
MS/BS	Superfície de mineralização/Superfície óssea
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NAPT	Co-transportador sódio-fósforo
NF-κB	factor nuclear kappa B
NKCC2	Na-K-Cl cotransportador 2
NO	Óxido nítrico
NR	Dieta normossódica
NS	Dieta normossódica (1,3% NaCl)
NTA	Necrose tubular aguda

O.Th	Espessura osteoide
Ob.S/BS	Superfície de osteoblastos/Superfície óssea
Oc.S/BS	Superfície de osteoclastos/Superfície óssea
OS/BS	Superfície osteoide/Superfície óssea
P	Fósforo
PAc	Pressão arterial caudal
PAc	pressão arterial caudal
pH	Potencial hidrogeniônico
PTH	Paratormônio
RANKL	Receptor ativador nuclear kB ligante
rpm	Rotação por minuto
Sham	Cirurgia fictícia
SOD	Superóxido desmutase
SOST	Gene referente à esclerostina
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TAS	Status antioxidante
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.Th	Espessura trabecular
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNFα	Fator de necrose tumoral alpha
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Volume urinário
Vs.	<i>Versus</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde
Wnt	Via de sinalização intracelular Wnt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do protocolo experimental	14
Figura 2	Esquema da administração de tetraciclina	15
Figura 3	Níveis séricos de creatinina nos momentos pré-cirurgia, 1 ^a , 2 ^a e 4 ^a semanas pós-cirurgia.....	24
Figura 4	Consumo hídrico e alimentar.....	26
Figura 5	Pressão arterial caudal.....	27
Figura 6	Marcadores de função renal na 10 ^a semana.....	28
Figura 7	Avaliação da massa renal e porcentagem de fibrose intersticial	29
Figura 8	Parâmetros urinários.....	30
Figura 9	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e estado de antioxidante total.....	31
Figura 10	Moduladores séricos do metabolismo mineral ósseo.....	32
Figura 11	Moduladores séricos do metabolismo mineral ósseo.....	33
Figura 12	Níveis séricos e urinários do cálcio e fósforo.....	35
Figura 13	Espessura trabecular.....	37
Figura 14	Superfície de osteoblastos e correlação.....	38
Figura 15	Tecido osteoide e correlação.....	39
Figura 16	Taxa de aposição mineral e correlação.....	40
Figura 17	Taxa de formação óssea e correlação.....	41
Figura 18	Esquema dos resultados do grupo IR/HS	56
Figura 19	Esquema dos resultados do grupo IR+NAC/HS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estágios e definição da doença renal aguda (DRA)	4
Tabela 2	Composição das dietas Harlan.....	16
Tabela 3	Parâmetros histomorfométricos estruturais, estáticos e dinâmicos.	22
Tabela 4	Parâmetros de histomorfometria óssea	36

RESUMO

Romão CM. *Evolução da injúria renal aguda causada pela sobrecarga de sódio na dieta: tratamento com N-acetilcisteína e os efeitos no metabolismo ósseo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;

Estudos tem demonstrado que a injúria renal aguda (IRA) pode evoluir para doença renal aguda ou crônica, principalmente quando associada à comorbidades como a hipertensão sal-dependente. Além disso, o desenvolvimento da perda de função renal é comumente associado a distúrbios mineral e ósseo. O uso de antioxidantes como a N-acetilcisteína (NAC) tem sido utilizado para prevenir a lesão da IRA, no entanto pouco se sabe sobre o uso deste medicamento em um período prolongado e os seus efeitos no metabolismo mineral e ósseo. Sendo assim os objetivos do presente estudo foram avaliar a repercussão da sobrecarga de sódio na dieta em modelo de IRA com ou sem tratamento com NAC, e observar a influência da IRA, dieta hipersódica e tratamento no metabolismo mineral e ósseo após 10 semanas de protocolo. Para isto foram utilizados ratos machos Wistar alimentados com dieta normossódica (0,5% Na - NS) ou hipersódica (3,2% Na - HS), tratados com ou sem NAC (IR NAC) (600mg/L) e submetidos à cirurgia de isquemia (45 minutos) e reperfusão renal bilateral (IR) ou Sham. Os animais foram acompanhados por 10 semanas após a cirurgia. Foram avaliadas pressão arterial caudal, função renal, metabolismo mineral e histomorfometria óssea. Os animais que sofreram IR e foram alimentados com dieta HS apresentaram maior excreção de sódio, cálcio e fósforo e albuminúria. A albuminúria correlacionou-se com o aumento do PTH induzindo a um maior tecido osteoide e superfície de osteoblastos nestes animais. A NAC diminuiu excreção de sódio, cálcio, fósforo, albuminúria e PTH, mas causou a diminuição do volume ósseo e aumento da separação trabecular. A ingestão do sódio influenciou nos níveis séricos altos de 1-25(OH)₂D e baixos de FGF-23. Estes resultados sugerem que a sobrecarga de sal na dieta causou evolução da IRA após 10 semanas. Essa perda de função renal aumentou o PTH, volume osteoide e osteoblastos. Em contrapartida, o tratamento com a NAC preveniu a progressão da disfunção renal, mas levou à perda de massa óssea.

Descritores: lesão renal aguda; isquemia; reperfusão; acetilcisteína; distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica

SUMMARY

Romão CM. *Acute kidney injury induced by diet sodium overload: N-acetylcysteine treatment and its effects on bone metabolism* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Studies have shown that acute kidney injury (AKI) can progress to acute or chronic kidney disease especially when associated with co-morbidities such as salt-dependent hypertension. In addition to impairment of renal function there is association with mineral and bone disorders. The antioxidants such as N-acetylcysteine (NAC) has been used to prevent the AKI; however; the prolonged use and its effects in mineral and bone metabolism is not well studied. The aim of the study was to evaluate dietary sodium overload repercussion on the AKI associated to NAC treatment and to observe its effects on bone metabolism after 10 weeks. Were used Wistar rats were fed with normal sodium (0.5% NaCl - NS) or high sodium (3.2% NaCl - HS) diet and treated or not with NAC (600 mg/L) and submitted to renal ischemia (45 minutes) and reperfusion (IR) or Sham surgery. The animals were followed up for 10 weeks after surgery. We evaluated caudal blood pressure, renal function, mineral metabolism and bone histomorphometry. In our results urinary sodium, calcium, phosphorus excretion and albuminuria were higher in HS IR animals. There was a positive correlation between albuminuria and PTH leading to osteoid tissue and surface of osteoblasts augmentation in these animals. In other hand, NAC decreased sodium, calcium, phosphorus excretion, albuminuria and PTH; however, it was observed lower bone volume and higher trabecular separation. Sodium intake had an isolated effect on 1-25(OH)₂D and FGF-23. These results suggest that overload salt diet caused AKI development. Loss of renal function increased PTH, osteoid volume and osteoblasts Treatment with NAC prevented renal function impairment, however it induced to bone mass loss.

Descriptors: acute kidney injury; ischemia; reperfusion; acetylcysteine; chronic kidney disease-mineral and bone disorder

Estudos epidemiológicos dos últimos 20 anos, desenvolvidos no Brasil e no mundo, demonstraram que a injúria renal aguda (IRA) acomete entre 20-200 pacientes hospitalizados por milhão de população a cada ano (Lombardi et al., 2008; Chawla et al., 2017). Esses pacientes, em geral, têm taxa de mortalidade de 20%, mas quando se analisa os indivíduos admitidos nas unidades de terapia intensivas (UTI) essa porcentagem cresce para 45% (Chawla et al., 2017). De maneira abrangente, estima-se que no mundo aproximadamente 2 milhões de pessoas venham a óbito, todos os anos, em decorrência da IRA (Murugan and Kellum 2011).

O guia internacional *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO 2012) define a IRA como a redução abrupta da função renal, por um curto período de tempo, de 7 dias ou menos, com critério diagnóstico baseado no aumento da creatinina sérica para $\geq 0,3$ mg/dL ou $\geq 1,5$ vezes em relação a creatinina basal do paciente, bem como, volume urinário $< 0,5$ mL/Kg/h por 6h. Esta definição é utilizada rotineiramente na prática clínica atual. (KDIGO 2012; Kellum et al., 2013).

De etiologia multifatorial a IRA é decorrente de várias complicações exclusivamente renais ou sistêmicas, dentre as quais está a injúria renal isquêmica, que pode ocorrer em consequência de hipotensão local ou generalizada, septicemia, procedimentos cirúrgicos como a nefrectomia parcial, cirurgia de bypass cardíaco ou transplante renal (Zuk & Bonventre., 2016; Dare et al., 2015).

Em outras palavras, a IRA isquêmica é causada pelo prejuízo generalizado ou localizado no fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células dos rins. Sob a perspectiva metabólica, esse evento resulta no

desequilíbrio da eliminação de metabólitos, homeostase da água e eletrólitos como o sódio, e a nível tecidual ocorre lesão do epitélio tubular e em casos graves há morte celular por apoptose e necrose (Bonventre & Yang, 2011).

Do ponto de vista celular, no período pós-isquêmico ocorre uma compensação do metabolismo anaeróbico, com o reestabelecimento do suprimento de oxigênio na reperfusão renal. Essa compensação aumenta de maneira considerável a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres, provenientes das mitocôndrias remanescentes e acúmulo de metabólitos. Em contrapartida, ocorre a diminuição do sistema de enzimas antioxidantes como catalases, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Este cenário favorece o estresse oxidativo que atinge moléculas importantes como lipídeos da membrana celular, proteínas e DNA, além de organelas como as próprias mitocôndrias que passam a expressar mais ligantes pró-apoptóticos como BAX, facilitando a apoptose pela via mitocondrial (Dare et al., 2015; Plotnikov et al., 2007; Malek & Nematbakhsh, 2015).

A resposta inflamatória, subsequente da injúria isquêmica, favorece a produção de endotelinas, resultantes dos mecanismos de recrutamento e adesão leucocitária e plaquetária, além de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12. Em conjunto, a transmigração e o infiltrado de células inflamatórias, associado à obstrução dos capilares e contínua produção de citocinas, favorecem a lesão local do endotélio de maneira prolongada facilitando a hipóxia continuada (Bonventre & Yang, 2011).

A área mais acometida pela isquemia renal é a medular. A região peritubular subsiste com baixas tensões de oxigênio, portanto, no advento de hipóxia é o primeiro seguimento a ser destituído de O₂, e conseqüentemente o

mais lesado. Na fase inicial da lesão tubular ocorre perda da borda em escova e o rompimento da polaridade do citoesqueleto do epitélio tubular. Caso a injúria seja revertida neste estágio pode haver uma recuperação completa, no entanto, se a lesão se intensifica ocorre um quadro de necrose tubular aguda (NTA) (Devarajan, 2006; Bonventre & Zuk, 2004).

Após a injúria causada pela hipóxia e reoxigenação, a resposta adaptativa é ativada para restaurar a homeostase tecidual. Esse processo envolve reposição do epitélio perdido por proliferação das células que sobreviveram ao insulto. Em contrapartida, quando a injúria é severa, ou é sustentada, a balança pende para a resposta mal adaptada como a inflamação e fibrose que podem levar as células e tecido defeituosos, ambas atreladas à progressão da IRA (Zuk & Bonventre, 2016).

Dados apontam uma relação entre o estabelecimento da IRA e maior risco de desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) e/ou doença renal em estágio final. Conforme verificado por Horne et al (2017), em estudo piloto prospectivo realizado no Reino Unido, dentre 125 pacientes com diagnóstico inicial de IRA, 26,4% progrediram para a DRC em apenas 3 anos, sendo que quase a metade já apresentava sinais evidentes da doença 3 meses após sofrerem IRA, segundo avaliação da taxa de filtração glomerular e albuminúria. Enquanto no grupo controle, apenas 7,5% desenvolveram DRC (Horne et al., 2017).

Enquanto a IRA e a DRC são distúrbios bem estabelecidos na literatura, os processos patofisiológicos que as interligam ainda não foram sistematicamente estudados. Tendo em vista isto, o *Acute Disease Quality Initiative* de 2017 (ADQI) usa o termo doença renal aguda (DRA) para definir o

curso da doença após a IRA em pacientes que continuam com processo patológico em andamento. Enquanto a IRA consiste na diminuição abrupta da função renal por até 7 dias, e a DRC é a persistência da doença renal por um período maior que 90 dias, o consenso ADQI caracteriza a DRA como danos agudos e/ou perda de função renal entre 7 a 90 dias após um evento de IRA, além de definir dados basais de recuperação ou evolução da doença nos seus estágios crescentes (**Tabela 1**) (Chawla et al., 2017).

Sawhney et al (2017) sugerem como vias importantes para a evolução da IRA, a recuperação incompleta observada em curto prazo, ou a progressão subsequente, vinculada ao declínio da função renal após episódio de IRA, com início gradual, incerto, e presença de comorbidades, como fator agravante (Sawhney et al., 2017). Em quadros graves, observa-se pacientes acometidos por fatores de risco que incluem diabetes mellitus, síndrome metabólica, idade avançada fatores genéticos ou hipertensão (Ronco, 2013).

Tabela 1. Estágios e definição da doença renal aguda (DRA)

Estágio	Definição
Estágio 0*	A: ausência dos critérios B ou C B: evidência contínua de injúria em andamento, indicadores de reparo e/ou regeneração ou perda glomerular ou tubular C: creatinina sérica <1,5 vezes o basal, mas não acima do recomendado B/C: creatinina sérica <1,5 vezes o basal, mas não acima do recomendado e evidência contínua de injúria, reparo e/ou regeneração
Estágio 1	Creatinina sérica 1,5 - 1,9 vezes o basal
Estágio 2	Creatinina sérica 2,0 - 2,9 vezes o basal
Estágio 3	Creatinina sérica 3 vezes o basal ou $\geq 353,6 \mu\text{mol/L}$ ($\geq 4,0 \text{ mg/dL}$) ou há necessidade de terapia de reposição renal*

Definição da doença renal aguda (DRA) proposta pela *Acute Dialysis Quality Initiative*, no ano de 2017. Nota-se que independente de injúria evidente, o tecido renal pode estar susceptível a outro episódio de injúria renal aguda (IRA).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) encontra-se intimamente relacionada aos processos fisiopatológicos e hemodinâmicos dos rins, como o aumento do fluxo renal, a hiperfiltração e a hipertensão glomerular, condições essas vinculadas a progressão da lesão e/ou perda de função renal. Picken e colaboradores (2016) avaliaram esses processos em ratos Sprague-Dawley, submetidos à nefrectomia unilateral seguida de isquemia e reperfusão do rim remanescente (IR). Após 16 semanas de protocolo, os autores verificaram uma importante lesão do tecido renal dos animais uninefrectomizados, acompanhada pelo aumento da pressão arterial, em comparação ao grupo controle normotensos (Picken et al., 2016).

Definida como uma doença crônica, a hipertensão assume alta prevalência no cenário da saúde pública mundial (WHO, 2003). Achados clínicos ressaltam que dependendo do indivíduo, a pressão arterial pode aumentar ou não frente a grandes quantidades consumida de sódio. Esse fenômeno, descrito como sensibilidade ao sal, onde o sal sensível apresenta um aumento da pressão arterial enquanto que o sal resistente não provoca alteração nos níveis pressóricos, tem sido associado, tanto em humanos quanto em distintos modelos experimentais, a danos renais progressivos. Esse sistema pode conduzir ao estágio final da doença renal amplamente utilizada para descrevê-lo (Wei et al., 2017).

Dentre esses achados, Sterzel et al (1988), em estudo com ratos sal-sensíveis, observaram aumento progressivo das taxas de albuminúria mediante sobrecarga de sódio na dieta (8% de NaCl), em apenas 6 semanas. Os autores

apontaram que a predisposição genética, ou a existência de hipertensão prévia contribuem como agravantes na progressão do quadro renal.

Segundo Wei e colaboradores (2017), a hipertensão, por si, induz injúria renal, conforme resultados obtidos a partir de em modelo de ratos hipertensos sal-sensíveis. No estudo, observou-se o desenvolvimento da fibrose intersticial, injúria do epitélio tubular e dano glomerular após administração de dieta com sobrecarga de sal (8% de NaCl), durante 12 semanas, o que foi atenuado pelo tratamento com anti-hipertensivo hidroclorotiazida (Wei et al., 2017).

Autores sugerem que associação da IRA e hipertensão sal-sensível pode causar continuação da injúria da IRA. Além disso, apontam que a combinação de ambas subsidia a diminuição da densidade microvascular, com consequente baixo fluxo sanguíneo para o tecido renal. Isso facilita novos episódios de hipóxia tecidual e predisposição à progressão da IRA (Spurgeon-Peachman et al., 2007).

Peachman et al (2007; 2009) reforçam essa hipótese por meio de modelo de IRA por isquemia e reperfusão renal bilateral, seguida de 1 mês de alimentação com dieta normossódica. Mesmo depois deste período de recuperação, quando os mesmos animais passaram a receber dieta hipersódica, desenvolveram hipertensão sódio-sensível e considerável lesão do tecido renal (Peachman et al., 2009).

Os rins, a partir de vias e hormônios interligam-se, fisiológica e patologicamente, a outros órgãos e sistemas do organismo como intestino, coração, fígado, pulmões e os ossos (Bernuy & Gonzales, 2015).

Nos processos fisiológicos, os rins participam de vias ativadoras da reabsorção óssea, assim como o hormônio da paratireoide ou paratormônio

(PTH). Predominantemente a secreção do PTH é regulada por receptores cálcio-sensíveis (CSR - *calcium-sensing receptor*) localizados na glândula paratireoide e nos rins. Esse hormônio atua na manutenção do nível sérico de cálcio, sendo que para tal, além de estimular a reabsorção óssea, aumenta a reabsorção de cálcio pelos rins e intestino (Boron & Boulpaep, 2012).

No intestino, a absorção do cálcio é mediada pela 1,25 hidroxivitamina D, que por sua vez é convertida em sua forma ativa pela enzima 1- α -hidroxilase nos rins, processo também aumentado pelo PTH. Outro hormônio que regula o metabolismo da 1,25(OH) D é o FGF-23. O FGF-23, produzido pelos osteoblastos e osteócitos, age nos rins e regula o metabolismo do fosfato, com resultado no bloqueio da conversão da 25(OH) D para a forma ativa, e sob a paratireoide, quando passa a regular a liberação do PTH, afim de evitar consequências de uma hipervitaminose D (Martin et al., 2012).

A ativação da reabsorção óssea pode ser consequência de danos estruturais ou pela ação de hormônios. De maneira simplificada o que ocorre nesta fase é a expressão do RANKL (*Receptor Activator of Nuclear κ B Ligand*) por osteoblastos quiescentes, as *lining cells*, que estimula a diferenciação dos osteoclastos, cuja função é a dissolução da matriz calcificada do tecido ósseo. Após esse processo, os osteoclastos entram em apoptose e dão lugar à fase de formação óssea. Nesta fase, há recrutamento de osteoblastos para a região absorvida, onde depositam matriz osteoide, inicialmente não calcificada, e depois promovem a mineralização (Rucci, 2008; Boyle et al., 2003; Zaidi, 2007).

É conhecido que a doença renal crônica pode levar ao desenvolvimento da doença mineral óssea (DMO) ou osteodistrofia renal, definida por

comorbidade associada a esta patologia. Desse modo, a DMO ocorre com a redução da taxa de filtração glomerular, que acarreta a também diminuição da excreção do fosfato (Martin & González, 2012; Martin et al., 2012). O acúmulo de fosfato, por sua vez, aumenta FGF-23 e inibe a função da enzima 1- α -hidroxilase e, conseqüentemente, diminui a forma ativa da vitamina D. Este processo leva o organismo a um estado de hipocalcemia, que estimula a liberação do PTH. A resposta adaptativa a esse estímulo contínuo é um hiperparatireoidismo secundário e conseqüente alto *turnover* ósseo para reestabelecer cálcio sérico (Silver & Naveh-Many, 2013; Quarles, 2011).

Estudos experimentais também têm associado a IRA com a injúria suave-moderada em órgãos distantes dos rins, desfecho caracterizado como “efeito remoto ou distante da IRA” (Gardner et al., 2015).

A influência da IRA sob o metabolismo ósseo foi demonstrada por Leaf e colaboradores (2012) a partir do aumento do FGF-23 em pacientes diagnosticados com IRA, acompanhado por baixos níveis de 1,25(OH) $_2$ D. Embora transitórias, ambas características são vinculadas à necessidade de terapias de reposição renal, como diálise ou transplante e, em última instância, à mortalidade (Leaf et al., 2012).

Além disso, a IRA contribui para a rápida modificação do metabolismo mineral como hiperfosfatemia, hipercalcemia, e dos níveis de PTH, calcitriol, além do FGF-23 (Bonventre & Yang, 2011; Hong et al., 2012; Leaf et al., 2013; Christov, 2014). Entretanto, pouco se sabe sobre a manutenção do metabolismo ósseo em um período de DRA.

A progressão da doença renal pode levar a um desajuste no metabolismo do sódio. Autores sugerem que lesões no túbulo renal estão

associadas a distúrbios do citoesqueleto, assim como perda da polaridade das células do epitélio tubular e redistribuição das bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$, o que diminui a absorção e aumenta a excreção do sódio (Blackwood et al., 2001; Wu et al., 2000). Ainda nesse contexto, os rins também são responsáveis pela reabsorção/excreção do cálcio de maneira semelhante e proporcional ao sódio, ambos mediados pelo transporte passivo e trocadores sódio-cálcio nas células tubulares (Cohen & Roe, 2000).

Frings-Meuten e colaboradores (2011) reiteram essa associação, e vão além, pois demonstraram que o aumento na ingestão de NaCl é um fator de risco para osteoporose, uma vez que se observa um aumento na excreção de cálcio, o que favorece a mobilização da reserva óssea desse mineral por meio da reabsorção da matriz mineralizada, afim de restabelecer seus níveis séricos (Frings-Meuthen et al., 2011).

Acredita-se que o excesso de estresse oxidativo, como o gerado na fase aguda da IRA, pode também diminuir a formação óssea por meio da diminuição da diferenciação e viabilidade dos osteoblastos. Além disso, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio pode estimular a reabsorção óssea pela ativação da diferenciação dos osteoclastos (Lee & Jang, 2015).

O tratamento com antioxidantes tem sido utilizado tanto na prática clínica quanto em estudos inovadores em busca de procedimentos terapêuticos alternativos aos atuais. Em ambos os casos, os resultados encontrados são interessantes e passíveis de discussão.

Um antioxidante que já é utilizado na prática clínica é a N-acetilcisteína (NAC). A NAC é uma forma modificada da L-cisteína, aminoácido precursor da glutathione. Além de ter propriedades vasodilatadoras, derivadas da melhora da

disponibilidade do óxido nítrico, a NAC apresenta potencial anti-inflamatório, ao inibir a proliferação e recrutamento de infiltrado celular e a liberação de citocinas inflamatórias (Fraga et al., 2016).

A N-acetilcisteína é utilizada na prática clínica na prevenção da IRA induzida por contraste (KDIGO, 2012). Em protocolos experimentais tem se demonstrado melhora e prevenção da injúria renal em ratos (de Araújo et al., 2005; Shimizu et al. 2005). Entretanto, a NAC ainda não é recomendada para outros procedimentos causadores da IRA como a isquêmica, por exemplo, pela ausência de dados conclusivos na literatura que embasem sua eficácia nessas condições (KDIGO, 2012).

Tendo em vista não somente a atuação no âmbito renal, a administração de compostos antioxidantes como a NAC também pode influenciar no metabolismo ósseo, como demonstrado em estudo com células ósseas tratadas com NAC (Lee & Jang, 2015). Os autores observaram os efeitos protetores da NAC frente aos danos oxidativos e contribuiu para a inibição da diferenciação dos osteoclastos (Lee & Jang, 2015).

Tendo em vista a existência e progressão da IRA para uma doença crônica, embora este processo não seja a causa mais recorrente de DRC na clínica, verifica-se um aumento no número de casos devido à falta de acompanhamento e pouca compreensão dessa evolução. Sendo assim, o estudo do desenvolvimento dessa transição pode ser de grande importância para que novas abordagens preventivas possam ser adotadas para evitar ou retardar essa transição.

O excesso de sódio pode ser utilizado como um determinante da IRA. Em estudos experimentais com animais busca-se determinar, a curto prazo, o

que demoraria anos a ocorrer em humanos. Assim, os resultados obtidos contribuem para o estabelecimento de um possível modelo de DRA e base para estudos mais detalhados.

Pouco se sabe sobre a influência dos mecanismos que levam a IRA para a cronicidade no metabolismo ósseo, como fatores iniciadores das anormalidades séricas e morfológicas do osso, e se estes processos podem ser retardados por meio de um tratamento preventivo.

A NAC é um tratamento apontado como promissor em diversos estudos na prevenção de processos patológicos relacionados com estresse oxidativo e inflamação. Devido aos seus efeitos benéficos contra a IRA, o uso da NAC já foi extrapolado para algumas práticas clínicas. Não obstante, sua repercussão no metabolismo ósseo ainda necessita ser melhor documentada.

Assim, o presente estudo propõe avaliar o metabolismo ósseo sobre influência do advento da evolução da IRA, mediada pela hipertensão sal-sensível. Para tal, o protocolo experimental baseou-se no modelo de IRA causada por isquemia e reperfusão renal concomitante com sobrecarga de 8% NaCl na dieta, pelo período de 10 semanas após a cirurgia.

Além disso, este trabalho analisou os efeitos da N-acetilcisteína de modo preventivo à evolução da IRA e a distúrbios do metabolismo ósseo. A NAC foi administrada na água de beber, em concentração (600mg/L) estabelecida na literatura, previamente à cirurgia de isquemia e reperfusão renal até a 10ª semana depois, e oferecida aos animais que receberam, ou não, a sobrecarga de sódio na dieta.

1. Avaliar a repercussão da sobrecarga de 8% de sódio na dieta em modelo de isquemia e reperfusão renal bilateral com ou sem tratamento com N-acetilcisteína durante 10 semanas.

2. Observar a influência da isquemia e reperfusão renal bilateral, dieta hipersódica e tratamento com a N-acetilcisteína no metabolismo mineral e ósseo

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de Pesquisa nº 174-15) e atendeu as exigências da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (espécie *Rattus norvegicus*) com 6 semanas de idade e peso de aproximadamente 200g, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado a 22°C, ciclo de luz de 12 horas (claro e escuro), alimentados com ração comercial (CR-1, QUIMTIA – Colombo PR- Brasil) e água filtrada à vontade, do desmame até a 7ª semana de vida, período considerado basal.

3.2 Protocolo experimental

A partir da 8ª semana de vida, os animais foram divididos em grupos experimentais que passaram a ser alimentados com dieta hipersódica (8% NaCl, 25,0% proteína – HS) ou normossódica (1,3% NaCl, 25,0% proteína – NS; Harlan Laboratories, Madison, WI 53744-4220, USA), conforme informações na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das dietas normossódica (0,5% Na ou 1,3% NaCl) e hipersódica (3,12% de Na ou 8,0% de NaCl) provenientes da Harlan

Composição da dieta	Normossódica	Hipersódica
	(0,5% Na) (g/Kg)	(3,12% Na) (g/Kg)
Caseína, Proteína Rica	287,0	287,0
Sacarose	313,388	313,388
Amido de milho	200,00	200,00
Óleo de soja	60,0	60,0
Celulose	86,6	20,0
Mistura de vitamina	10,0	10,0
Etoxyquina (antioxidante)	0,012	0,012
Mistura de mineral, Ca-P deficiente	13,37	13,37
Fosfato de cálcio dibásico (CaHPO ₄)	13,4	13,4
Carbonato de cálcio (CaCO ₃)	6,23	6,23
Cloreto de sódio (NaCl)	10,0	76,6

Animais alimentados com ambas as dietas foram novamente subdivididos em grupos que receberam água filtrada ou tratamento com N-acetilcisteína (NAC), na concentração de 600 mg/L na água de beber, ambos *ad libitum* até o final do estudo. Na 10^a semana os animais que receberam água, foram submetidos à procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão renal bilateral (IR) ou cirurgia Sham, e os animais que receberam NAC foram todos submetidos à cirurgia de isquemia e reperfusão renal bilateral (Figura 1).

Figura 1. Esquema do protocolo experimental. Grupos experimentais: **Sham NS:** Ratos alimentados com dieta normossódica submetidos à cirurgia Sham; **Sham HS:** Ratos alimentados com dieta hipersódica submetidos à cirurgia Sham; **IR/NS:** Ratos alimentados com dieta normossódica submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral; **IR/HS:** Ratos alimentados com dieta hipersódica submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral; **IR+NAC/NS:** Ratos alimentados com dieta normossódica N-acetilcisteína (600mg/L) na água de beber submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral; **IR+NAC/HS:** Ratos alimentados com dieta hipersódica e N-acetilcisteína (600mg/L) na água de beber submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral.

Grupos experimentais I

Sham NS: Ratos alimentados com dieta normossódica submetidos à cirurgia Sham;

Sham HS: Ratos alimentados com dieta hipersódica submetidos à cirurgia Sham;

IR/NS: Ratos alimentados com dieta normossódica submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral;

IR/HS: Ratos alimentados com dieta hipersódica submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral;

IR+NAC/NS: Ratos alimentados com dieta normossódica e N-acetilcisteína (600mg/L) na água de beber submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral;

IR+NAC/HS: Ratos alimentados com dieta hipersódica e N-acetilcisteína (600mg/L) na água de beber submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral;

A creatinina sérica dos animais foi mensurada nos períodos pré-cirurgia e na 1ª, 2ª e 4ª semanas pós-cirurgia a fim de avaliar o estabelecimento da IRA. Os demais parâmetros foram avaliados apenas na 10ª semana pós-cirurgia.

Ao final do protocolo experimental e previamente ao sacrifício, todos os animais receberam injeção via intraperitoneal de tetraciclina (25mg/Kg) no 12º, 11º, 5º e 4º dias antes do sacrifício. A tetraciclina é um composto fluorescente que, além de atuar como antibiótico, possui afinidade pela matriz óssea recém-formada. Sendo assim, optou-se por utilizá-la para avaliar os parâmetros dinâmicos da formação óssea (Figura 2).

Figura 2. Esquema da administração de tetraciclina (25mg/Kg) via intraperitoneal no 12º, 11º, 5º e 4º dias antes do sacrifício para marcação fluorescente da matriz recém mineralizada. A análise histomorfométrica dos locais marcados com fluorescência relacionada aos diferentes períodos de administração da tetraciclina indicará de forma dinâmica as características de mineralização óssea de cada animal.

Foram coletadas amostras de plasma, soro e tecidos como rins, coração, tíbias e fêmures para análises posteriores. Para isso, na 20ª semana de vida (10ª semana após a cirurgia), todos os animais foram anestesiados com 0,20mL/100g de peso corpóreo da mistura de 20mg/mL xilazina e 50mg/mL ketamina (2:5 vol/vol) e submetidos à punção da aorta abdominal para a exsanguinação total.

O comprimento do fêmur foi medido por meio de paquímetro universal (Vonder Grupo OVD, Brasil). As massas renais (esquerda e direita) e cardíaca foram pesadas em balança analítica (Marte Científica, São Paulo, SP, Brasil, modelo: AS200) e corrigidas pelo comprimento do fêmur de cada animal. Tíbia direita e fêmures foram processados para análises histomorfométricas; tíbia esquerda foi armazenada em freezer -80°C para análises de biologia molecular. O rim esquerdo foi incluído em parafina para análises histológicas.

3.2.1 Cirurgias

A IRA foi induzida por meio da cirurgia de isquemia e reperfusão renal bilateral realizada na 10ª semana de vida em todos os grupos experimentais, exceto os grupos Sham. Os animais foram anestesiados com 0,15 mL/100g de peso corpóreo da mistura de 20 mg/mL xilazina e 50 mg/mL ketamina (2:5 vol/vol). Em seguida, por meio de incisão abdominal, as artérias renais foram isoladas e clampeadas, o que levou à isquemia renal, mantida por 45 minutos. Após esse período, os clamps foram retirados e a perfusão sanguínea reestabelecida foi observada por meio da mudança de cor do tecido renal. Os

animais foram suturados e receberam tratamento analgésico com Tramadol (5mg), de acordo com Peachman et al., 2009.

O grupo Sham foi submetido a uma cirurgia com incisão abdominal seguida de suave manipulação dos rins. Após 45 minutos, os animais foram suturados e receberam os mesmos cuidados que o grupo experimental IR. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com materiais esterilizados.

3.2.2 Evolução ponderal

Durante todo o protocolo experimental, a massa corpórea dos animais foi medida semanalmente em balança eletrônica específica para animais (AS 5500, Marte Científica, São Paulo, SP, Brasil).

3.2.3 Pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal (PAC) dos animais foi aferida por método oscilométrico utilizando cuff de oclusão e sensor de pulso (Kent Scientific Corporation, USA, modelo RTBP 2045), ambos colocados suavemente sobre a cauda de cada animal. O princípio deste método é baseado na detecção da distensão do vaso arterial causada pelo pulso do sangue que flui através da cauda e captado por um sensor pizoelétrico altamente sensível, sendo que os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica.

As medidas foram realizadas com os animais acordados e pré-aquecidos durante 10 a 15 minutos a 40°C. Foram consideradas as médias de

5 aferições consecutivas, apenas das medidas obtidas na ausência de movimentação do animal.

3.2.4 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da veia caudal dos animais pré-aquecidos durante 10 a 15 minutos a 40°C. Para a obtenção do plasma e soro utilizou-se tubo com EDTA pH 5,0 a 3,8% e tubo seco, respectivamente. Logo após, as amostras foram mantidas em gelo e centrifugadas a 4°C, 3000 rpm por 15 minutos. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

3.2.5 Gaiola metabólica

Amostras de urina, dados de ingestão hídrica, dieta e volume de excreção urinária de 24h foram coletados por meio de acondicionamento individual dos animais em gaiola metabólica de acrílico (Tecniplast, Itália).

Em um primeiro momento, os animais foram submetidos à adaptação por um período de 24 h, seguido de mais 24 h para a coleta das amostras. Os ratos foram mantidos com quantidades determinadas de ração e água. Ao término deste período, os animais foram retirados das gaiolas e o consumo de ração, água e volume urinário foram mensurados. As amostras de urina foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

3.3 Dosagens bioquímicas

As dosagens de ureia, creatinina, cálcio, fósforo sérico e urinário foram realizadas com kits (Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa, Minas Gerais – Brasil), em equipamento automatizado Cobas Mira Plus (Roche Diagnóstica, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O sódio e potássio tanto sérico quanto urinário foram determinados por meio de espectrofotômetro de chama (modelo FC 280, CELM – São Paulo, Brasil). A osmolaridade urinária foi medida através de osmômetro (Advanced Osmometer, modelo 3D3).

A partir das dosagens séricas e urinárias foram calculados o *Clearance de creatinina* (ClCr) $[(UV/P, \text{ sendo } U = \text{creatinina urinária (mg/dl); } V = \text{volume urinário (ml/min); e } P = \text{creatinina sérica (mg/dl)}]$ e a *Fração de excreção iônica* $[(U_i/P_i)/(U_{Cr}/P_{Cr}) \times 100 (\%)]$, uma vez que, U_i = concentração urinária do íon (mEq/L); P_i = concentração plasmática do íon (mEq/L); U_{Cr} = concentração urinária de creatinina (mg/dL); P_{Cr} = concentração plasmática da creatinina (mg/dL)].

Frações de excreção do sódio, potássio, cálcio e fósforo também foram determinadas.

3.4 Imunoensaio enzimático

Albuminúria (*Rat Albumin ELISA kit*; Bethyl Laboratories, Inc.), Esclerostina [(SOST): *Rat SOST (Sclerostin) ELISA kit* (Elabscience®)], PTH e

FGF-23 (*Rat Intact PTH ELISA kit*, Immutopcs, Inc.) foram determinados em amostras de (soro ou plasma) por meio de imunoensaio enzimático (ELISA).

3.5 Quantificação da 1,25 dihidroxivitamina D

Para a análise do metabólito da vitamina D, 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D], utilizou-se kit comercial LIAISON[®] XL 1,25 *Dihydroxyvitamin D* (DiaSorin, USA), acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Histologia renal

Para fins de análises histológicas, imediatamente após a cirurgia, os rins foram removidos e mantidos em solução de formol 10% e tampão fosfato durante 24 h. Em seguida, os espécimes foram incluídos em parafina no processador automático de tecidos Histokinette 2000 (Leica – Nussloch, Alemanha), por um período de 14 horas, e inclusos em blocos.

Os blocos foram submetidos a cortes por micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica – Nussloch, Alemanha), na espessura de 4 a 5 µm, e aderidos em lâminas revestidas com silano 2%.

A partir do preparo das lâminas, as mesmas foram desparafinizadas e coradas com tricrômio Masson a fim de determinar a porcentagem de fibrose no interstício renal.

As imagens foram obtidas com o aumento de 400 vezes e utilizados 30 campos para contagem pela técnica de pontos, que consiste na sobreposição de um gride de 160 pontos, uniformemente distribuídos, na imagem dos cortes.

Foram contados os pontos sobrepostos à área ocupada pela fibrose (coloração azul). Os resultados foram apresentados em porcentagem de área ocupada pela fibrose.

3.7 Histomorfometria óssea

Logo após a coleta, os fêmures foram mantidos durante 6 dias em etanol 70% para fixação. Após este período, foram desidratados em etanol 100% por 7-8 dias. Em seguida, o material foi imerso em tolueno por 1 dia e então mantido durante 21 dias embebido no monômero metilmetacrilato sem a descalcificação prévia (Gouveia et al., 1997).

Seguido de ciclos de 7 dias imerso em cada solução: A) metilmetacrilato 75% + dibutilftalato 25%); B) solução A + peróxido de benzoíla 1%; C) solução A + peróxido de benzoíla 2%. Após estes ciclos, o material foi transferido para um frasco molde com metacrilato a 2% e mantido por 24h em estufa à 37°C até a polimerização (Ferrari et al. 2014).

Utilizou-se um micrótomo (Polycut S - Leika, Alemanha) para obter cortes de 5 µm e 10 µm de espessura da porção distal dos fêmures. As secções foram coradas com azul de toluidina a 0,1% (pH = 6,4), para avaliação dos parâmetros estáticos ou mantidas sem coloração para os parâmetros dinâmicos, sendo utilizados no mínimo 2 cortes não-consecutivos para cada amostra. Para análise qualitativa foi utilizado microscópio óptico acoplado ao monitor de vídeo (Nikon).

Os parâmetros estáticos, estruturais e dinâmicos de formação e reabsorção óssea foram avaliados na metáfise distal dos cortes das tíbias, dois

campos abaixo da cartilagem de crescimento. Foram quantificados 30 campos utilizando o *software* semi-automático de análise de imagens *Osteomeasure* (Osteometrics, Inc., Atlanta EUA). Os índices histomorfométricos foram apresentados segundo a nomenclatura recomendada pela *American Society of Bone and Mineral Research* – ASBMR (Tabela 2).

Tabela 3. Parâmetros histomorfométricos estruturais, estáticos e dinâmicos de acordo com *American Society of Bone and Mineral Research* – ASBMR

Índices histomorfométricos	
<i>Parâmetros estruturais 3D</i>	
BV/TV (%)	Bone volume/Trabecular volume
Tb.Th (µm)	Trabecular thickness
Tb.N (no./mm)	Trabecular number
Tb.Sp (µm)	Trabecular separation
<i>Parâmetros de mineralização</i>	
OS/BS (%)	Osteoid surface/Bone surface
O.Th (µm)	Osteoid Thickness
Ob.S/BS (%)	Osteoblast surface/Bone surface
<i>Parâmetro de reabsorção</i>	
Oc.S/BS (%)	Osteoclast surface/Bone surface
ES/BS (%)	Errored surface/Bone surface
<i>Parâmetros Dinâmicos</i>	
MAR (µm/day)	Mineral Aposition Rate
MLT (day)	Mineralization Lag Time
MS/BS (%)	Mineralization surface/ Bone surface
BFR/BS (µm ³ / µm ² per day)	Bone Formation Rate

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa *GraphPad Prism 5.0*. Análise de variância de dois fatores (ANOVA) com pós-teste Bonferroni foi aplicado para comparação dos grupos experimentais. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EP). Foi adotado nível de significância inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Creatinina sérica na fase inicial pós isquemia e reperfusão

Não houve diferença estatística na creatinina sérica dos grupos Sham, tanto NS quanto HS (**Figura 3A**). No entanto, a creatinina sérica aumentou nos animais dos grupos IR/NS e IR+NAC/NS, na 1^a e 2^a semanas após a isquemia e reperfusão renal, e nenhuma diferença foi encontrada na 4^a semana pós-cirurgia, em comparação à semana pré-cirurgia dos mesmos grupos (**Figura 3B e 3C**). Estes dados ilustram efeitos típicos da IRA, como diminuição da função renal em curto prazo seguida de melhora dos parâmetros avaliados.

Em contrapartida, os animais que sofreram isquemia e reperfusão e foram alimentados com dieta hipersódica, tanto IR HS quanto IR+NAC HS, não tiveram diferença significativa nos níveis séricos de creatinina (**Figura 3B e 3C**).

Figura 3. Níveis séricos de creatinina nos momentos pré-cirurgia, 1^a, 2^a e 4^a semanas pós-cirurgia. Creatinina sérica (mg/dL) dos grupos A) Sham (n = 8), NS; n=7 HS); B) isquemia/Reperfusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e C) isquemia/Reperfusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni. • p < 0,05 Pré vs Pós-cirurgia.

4.2 Consumo hídrico e alimentar

O consumo médio de líquido avaliado no período pós-cirurgia dos animais que receberam dieta HS foi maior em comparação aos animais que receberam dieta NS, tanto de água filtrada quanto água acrescida de NAC, e além disso o consumo hídrico do grupo IR/HS foi maior quando comparado aos grupos Sham/HS e IR+NAC/HS (**Figura 4A**). A ingestão média de sódio destes animais, dos grupos HS, foi significativamente maior do que os NS (**Figura 4C**).

O consumo médio de dieta foi maior nos animais alimentados com dieta HS em comparação a dieta NS. Entre os animais alimentados com dieta NS, o grupo IR+NAC teve menor ingestão alimentar em relação ao grupo IR (**Figura 4B**). Apesar disto, não houve diferença estatística na massa corpórea entre os grupos de animais submetidos aos distintos protocolos experimentais (**Anexo 1**).

Tendo em vista a composição das dietas, que diferem apenas na quantidade de NaCl (**Tabela 1**), a ingestão de nutrientes como o cálcio acompanhou de maneira proporcional a quantidade de ingestão de ração (**Figura 4D**).

Figura 4. Consumo hídrico e alimentar. A) consumo médio de líquidos (mL/24h); B) consumo médio de dieta (g/24h); C) ingestão média de sódio (g/24h); D) ingestão média de cálcio (g/24h); média dos momentos pré-cirurgia, 1^a, 2^a e 4^a semanas pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni (p < 0,05) * NS vs. HS, ° Sham vs. IR, # IR vs. IR+NAC.

A pressão arterial caudal (PAC) na 10ª semana pós isquemia e reperfusão foi maior nos animais alimentados com dieta HS em comparação aos animais tratados com dieta NS. Dentre o grupo NS, animais IR+NAC apresentaram menor PAC em comparação aos animais IR (**Figura 5**). Não houve diferença estatística na comparação dos batimentos cardíacos dos animais (**Anexo 2**).

Figura 5. Pressão arterial caudal. Pressão arterial caudal (mmHg) na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperfusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperfusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni (p < 0,05) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

4.3 Pressão arterial, função renal, massa e histologia renal

Não houve diferença estatística nos níveis séricos de creatinina (**Figura 6A**) e clearance de creatinina (**Figura 6B**) entre os grupos quando avaliados na

10ª semana pós isquemia e reperfusão. Em contrapartida, os níveis de albuminúria foram maiores no grupo IR/HS em comparação a IR/NS, Sham/HS e IR+NAC/HS (**Figura 6C**).

Figura 6. Marcadores de função renal na 10ª semana. A) creatinina sérica (mg/dL); B) clearance de creatinina (mL/min/100g peso corpóreo); C) albuminúria; na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperfusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperfusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni (p < 0,05) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, # IR+NAC vs. IR.

A massa renal foi maior no grupo IR/HS em comparação a IR/NS e Sham HS (**Figura 7A**). De maneira semelhante, a fibrose intersticial foi maior no grupo IR/HS em relação ao grupo Sham/HS (**Figura 7B**).

Figura 7. Avaliação da massa renal e porcentagem de fibrose intersticial. A) massa dos rins (g/cm de fêmur); B) fibrose intersticial (%); na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

O volume urinário e a fração de excreção de sódio foram maiores em todos os animais alimentados com dieta HS em comparação aos animais do grupo NS. No entanto, estas variáveis foram maiores no grupo IR/HS em comparação aos grupos Sham/HS e IR+NAC/HS (**Figura 8A e 8C**).

Inversamente, a osmolaridade da urina foi menor nos grupos que receberam dieta HS, Sham/HS e IR+NAC/HS em comparação aos animais do grupo NS. Entretanto, dentre os animais alimentados com dieta NS, a osmolaridade foi menor no grupo IR/NS quando comparado aos grupos Sham/NS e IR+NAC/NS (**Figura 8B**).

A fração de excreção de potássio urinário foi menor no grupo IR+NAC/NS quando comparado com os grupos IR/NS e IR+NAC/ HS (**Figura 8D**).

O sódio e potássio séricos não foram diferentes entre os grupos (**Anexo 2**).

Figura 8. Parâmetros urinários. A) volume urinário (mL/24h); B) osmolaridade urinária (mOsm/Kg); C) fração de excreção urinária de sódio (%); D) fração de excreção urinária de potássio (%); na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni (p < 0,05) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

4.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e estado de antioxidante total (TAS)

Os níveis de estresse oxidativo, determinado pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foram menores em ambos os grupos tratados com NAC, tanto o que recebeu dieta NS quanto HS (**Figura 9A**). Contudo, o estado antioxidante total (TAS) foi maior apenas no grupo IR+NAC/HS em comparação ao IR+NAC/NS (**Figura 9B**).

Figura 9. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e estado de antioxidante total A) *thiobarbituric Acid Reactive Substances*-TBARS (mmol/mL); B) *total antioxidant status*-TAS (mmol/mL); na 10^a semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni (p < 0,05) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

4.5 Metabolismo mineral ósseo

Os níveis séricos de PTH e esclerotina foram maiores no grupo IR/HS quando comparado aos grupos IR/NS, Sham/HS e IR+NAC/HS (**Figura 10A** e

10B). Dentre os grupos que receberam dieta NS, a esclerostina foi maior no grupo IR+NAC/NS em comparação ao grupo IR/NS (**Figura 10B**).

Houve uma correlação positiva entre os níveis de PTH e esclerostina (**Figura 10C**). Além disso, os níveis séricos de PTH também apresentou uma correlação positiva com albuminúria (**Figura 10D**).

Figura 10. Moduladores séricos do metabolismo mineral ósseo. A) paratormônio-PTH (pg/mL); B) esclerostina (pg/mL); C) correlação PTH vs. esclerostina; D) correlação PTH vs. albuminúria; na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, ^oSham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

Os níveis séricos de 1,25 (OH)2D foram maiores nos animais alimentados com dieta HS quando comparados aqueles que receberam dieta NS (**Figura 11A**). Além disso, 1,25(OH)2D correlacionou-se negativamente com FGF-23 e positivamente com a ingestão de dieta (Figura 11. C. D).

Os níveis séricos do fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF-23) foram menores no grupo IR+NAC/HS em comparação ao IR+NAC/NS (**Figura 11B**).

Figura 11. Moduladores séricos do metabolismo mineral ósseo. A) 1,25 dihidroxivitamina D (pg/mL); B) Fator de Crescimento do Fibroblasto – 23 (pg/mL); C) correlação 1,25(OH)2D vs. consumo médio de dieta; D) correlação 1,25(OH)2D vs. FGF-23; na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

A fração de excreção urinária de fósforo foi maior apenas do grupo IR/HS quando comparado ao grupo IR/NS (**Figura 12A**). Os animais alimentados com dieta HS apresentaram maior fração de excreção urinária de cálcio em relação aos que receberam dieta NS. Quando comparados apenas os grupos HS, a fração de excreção urinária de cálcio foi maior nos animais IR/HS em relação aos demais Sham/HS e IR+NAC/HS (**Figura 12B**).

Os níveis séricos de fósforo foram maiores apenas no grupo IR+NAC/HS em comparação ao IR+NAC/NS (**Figura 12C**). Por outro lado, os níveis séricos de cálcio foram maiores nos animais tratados com NAC, tanto nos alimentados com dieta NS quanto HS, quando comparados com os grupos IR/NS e HS (**Figura 12D**). Ainda, os níveis séricos de Ca correlacionaram-se positivamente com os de 1,25 (OH)₂D (**Figura 12E**) e com o TBARS (**Figura. 12F**).

Figura 12. Níveis séricos e urinários do cálcio e fósforo. A) fração de excreção urinária de cálcio (%); B) fração de excreção urinária de fosforo (%); C) fósforo sérico (mg/dL); D) cálcio sérico (mg/dL); E) correlação cálcio sérico vs. 1,25 Dihidroxitamina D; F) correlação cálcio sérico vs. substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS; na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, ^oSham vs. IR, #IR vs. IR+NAC.

Tabela 4. Parâmetros de histomorfometria óssea

	Sham		IR		IR+NAC	
	NS	HS	NS	HS	NS	HS
<i>Parâmetros estruturais</i>						
BV/TV (%)	29,81 ± 1,02	28,41 ± 2,54	28,90 ± 3,3	26,79 ± 2,86	30,58 ± 2,04	21,32 ± 3,36*
Tb.Th (µm)	56,50 ± 1,78	62,69 ± 2,04	59,94 ± 1,98	63,58 ± 3,29	64,32 ± 3,12	57,37 ± 4,13
Tb.Sp (µm)	135,2 ± 10,31	163,6 ± 20,27	189,1 ± 34,03	161,5 ± 16,55	149,3 ± 11,87	236,6 ± 32,31*
Tb.N (/mm)	5,341 ± 0,33	4,581 ± 0,32	4,435 ± 0,55	4,233 ± 0,39	4,765 ± 0,24	3,616 ± 0,36
<i>Parâmetros estáticos de formação óssea</i>						
OV/BV (%)	0,161 ± 0,029	0,358 ± 0,113	0,291 ± 0,10	0,892 ± 0,304 * ⁰	0,233 ± 0,08	0,377 ± 0,130 [#]
O.Th (µm)	1,011 ± 0,06	1,104 ± 0,07	1,180 ± 0,19	1,809 ± 0,17 * ⁰	1,391 ± 0,15	1,188 ± 0,13 [#]
OS/BS (%)	10,19 ± 0,84	18,68 ± 4,94	13,04 ± 2,84	25,71 ± 7,44	10,11 ± 2,67	15,16 ± 3,72
Obs/BS (%)	3,188 ± 0,54	8,229 ± 1,50*	5,060 ± 1,16	8,016 ± 1,92	3,236 ± 0,65	4,555 ± 0,91
<i>Parâmetros estáticos de reabsorção óssea</i>						
Oc.S/BS (%)	2,086 ± 0,32	2,320 ± 0,44	2,589 ± 0,67	4,18 ± 1,14	2,195 ± 0,38	2,624 ± 0,62
ES/BS (%)	2,823 ± 0,51	3,594 ± 0,56	3,023 ± 0,79	5,522 ± 1,47	2,778 ± 0,52	3,268 ± 0,71
<i>Parâmetros dinâmicos de mineralização óssea</i>						
MS/BS (%)	2,16 ± 0,95	6,82 ± 1,63	8,55 ± 1,73 ⁰	8,37 ± 2,66	4,23 ± 1,10	9,47 ± 1,29
MAR (µm/dia)	1,32 ± 0,18	1,56 ± 0,28	1,21 ± 0,23	1,06 ± 0,23	0,699 ± 0,09	0,654 ± 0,07
BFR/BS (µm³/µm²/dia)	0,028 ± 0,006	0,111 ± 0,029	0,123 ± 0,027 ⁰	0,106 ± 0,046	0,0314 ± 0,0009 [#]	0,064 ± 0,015
Mlt (dias)	6,95 ± 2,75	15,14 ± 1,90*	1,23 ± 0,29 ⁰	5,05 ± 1,44 ⁰	5,64 ± 1,05	3,27 ± 0,74

(BV/TV) volume ósseo/volume trabecular; (Tb.Th) espessura trabecular; (Tb.Sp) separação trabecular; (Tb.N) número trabecular; (OV/BV) volume osteoide/volume ósseo; (O.Th) espessura osteoide; (OS/BS) superfície osteoide/superfície óssea; (Obs/BS) superfície de osteoblastos/superfície óssea; (ES/BS) superfície de erosão/superfície óssea; (OcS/BS) superfície de osteoclastos/superfície óssea; (MS/BS) superfície mineralizada/superfície óssea; (MAR) taxa de aposição mineral; (BFR/BS) taxa de formação óssea/superfície óssea; (Mlt) tempo tardio de mineralização

4.6 Parâmetros de histomorfometria óssea

Nos parâmetros estruturais, o volume ósseo (BV/TV) foi menor no grupo IR+NAC/HS quando comparado ao IR+NAC/NS (**Tabela 4**). E de maneira inversa, a separação trabecular (Tb.Sp) foi maior no grupo IR+NAC/HS em comparação ao IR+NAC/NS (**Tabela 4**). Os demais parâmetros estruturais como número (Tb.N) e espessura trabecular (Tb.Th) não apresentaram diferença estatística (**Tabela 4**), no entanto, observou-se uma correlação negativa entre a espessura trabecular (Tb.Th) e TAS (**Figura 13B**).

Figura 13. Espessura trabecular. A) espessura trabecular (μm); B) correlação da espessura trabecular vs. estado antioxidante total – (TAS); na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham ($n = 8$ NS; $n=7$ HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR ($n=9$ NS; $n=8$ HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC ($n=10$ NS; $n=10$ HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média $\pm$ EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

O volume (OV/BV) e a espessura osteoide (O.Th) foram maiores no grupo IR/HS quando comparados aos grupos IR/NS, Sham/HS e IR+NAC/HS. A superfície osteoide (OS/BS) não diferiu entre os grupos, porém a superfície de osteoblastos foi maior apenas no grupo Sham/HS em comparação ao Sham/NS (**Tabela 3**).

O PTH correlacionou-se positivamente com o volume osteoide (OV/BV), superfície osteoide (OS/BS), espessura osteoide (O.Th) (**Figura 15**) e superfície de osteoblastos (ObS.BS) (**Figura 14B**).

Figura 14. Superfície de osteoblastos e correlação. A) superfície de osteoblastos/superfície óssea – ObS/BS (%); B) correlação da superfície de osteoblastos vs. PTH; na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperfusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperfusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

Figura 15. Tecido osteoide e correlação. A) volume osteoide/volume ósseo - OV/BV (%); B) correlação do volume osteoide vs. PTH; C) superfície osteoide/superfície óssea - OS/BS (%); D) correlação da superfície osteoide vs. PTH; E) espessura osteoide - O.Th (μm); F) correlação da espessura osteoide vs. PTH; na 10^a semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral - IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, ^oSham vs. IR, [#]IR vs. IR+NAC

Quanto os parâmetros de mineralização, a superfície mineralizada (MS/BS) foi estatisticamente maior no grupo IR/NS em comparação ao grupo Sham NS. (**Tabela 3**). A taxa de aposição mineral (MAR) não foi diferente entre os grupos.

A taxa de formação óssea (BFR/BS) também foi maior nos animais do grupo IR/NS em comparação aos grupos Sham NS e IR+NAC/NS (**Tabela 3**). O tempo de mineralização (Mlt) foi maior no grupo Sham HS em comparação aos animais Sham NS e IR/HS, e o grupo Sham NS foi maior quando comparado aos animais IR/NS (**Tabela 3**).

A taxa de aposição mineral (MAR) correlacionou-se positivamente com o TBARS (**Tabela 3**; **Figura 16**). A taxa de formação óssea (BFR/BS) foi correlacionada positivamente com TBARS e negativamente com os níveis de cálcio sérico (**Figura 17**).

Figura 16. Taxa de aposição mineral e correlação. A) taxa de aposição mineral – MAR ($\mu\text{m/d}$); B) correlação da taxa de aposição mineral vs. TBARS; na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham ($n = 8$ NS; $n=7$ HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR ($n=9$ NS; $n=8$ HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC ($n=10$ NS; $n=10$ HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média $\pm$ EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$)

Figura 17. Taxa de formação óssea e correlação. A) taxa de formação óssea – BFR/BS (um3/um2/d); B) correlação da taxa de formação óssea vs. cálcio sérico; C) correlação da taxa de formação óssea vs. TBARS; na 10ª semana pós-cirurgia dos grupos Sham (n = 8 NS; n=7 HS); Isquemia/Reperusão renal bilateral – IR (n=9 NS; n=8 HS) e Isquemia/Reperusão renal bilateral e tratamento com N-acetilcisteína (600 mg/L) - IR + NAC (n=10 NS; n=10 HS). Todos os grupos foram alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Resultados expressos em média±EP avaliados por ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni ($p < 0,05$) *NS vs. HS, °Sham vs. IR, #IR vs. IR+NAC

No presente estudo foi utilizado modelo animal de injúria renal por isquemia e reperfusão renal bilateral, submetidos ou não à sobrecarga de sódio na dieta, com o objetivo de avaliar a IRA e sua evolução mediante ao estímulo do sal. Concomitantemente, foi administrado ou não o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) como um possível tratamento preventivo ao desenvolvimento da injúria da IRA. Ao final do protocolo foram observados os efeitos tanto da evolução inicial da doença renal quanto do tratamento proposto no metabolismo mineral e ósseo dos animais.

Segundo KDIGO (2012) a IRA é caracterizada pela alteração dos níveis séricos de creatinina, igual ou superior a 0,3 mg/dL, no período de 48h. Ainda, esses valores podem ser considerados anormais quando se apresentam iguais ou acima de 1,5 vezes em relação ao valor basal, tais parâmetros coincidem com o grau 1 na escala de severidade ou estágio 1 da IRA (KDIGO, 2012).

A IRA também é caracterizada segundo tempo de duração. De acordo com *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI), os sintomas podem se estender de horas até 7 dias, ou persistirem entre 7 e 90 dias, o que já coincide com a doença renal aguda (DRA). Após 90 dias dos primeiros sintomas, observa-se a doença renal crônica (DRC) (Chawla et al. 2017).

Após a cirurgia de isquemia e reperfusão a IRA foi confirmada com o aumento nos níveis de creatinina sérica nos animais alimentados com dieta normossódica (NS), independentemente do tratamento com NAC. Essa condição persistiu por 2 semanas após a cirurgia o que configurou um breve período de DRA.

Em contrapartida, nas primeiras semanas pós-isquemia os animais alimentados com dieta hipersódica (HS) não apresentaram quaisquer alterações nos níveis séricos de creatinina, independente do tratamento com NAC.

A maior ingestão de sódio associa-se à maiores taxas de excreção urinária. Isso se deve ao aumento do ritmo de filtração glomerular, caracterizado como hiperfiltração, comumente associada ao início dos danos glomerulares em portadores de diabetes mellitus, hiperaldosteronismo, obesidade/síndrome metabólica e hipertensão (Palatini et al., 2012; Kuo et al., 2011).

A nível tecidual observam-se alterações do túbulo glomerular, ativação de mediadores vasoativos tais como óxido nítrico, ciclooxigenase-2, sistema renina angiotensina, proteína quinase C e endotelinas. Em consequência desse cenário, há elevação da pressão capilar do glomérulo e aumento secundário a taxa de filtração glomerular (Cachat et al., 2015). A hiperfiltração decorrente do maior consumo de sal pode ter evitado o acúmulo de creatinina sérica dos animais que receberam dieta HS.

Mesmo na 10ª semana do protocolo, a sobrecarga de sódio ainda causou efeitos relacionados ao aumento da filtração, como maior excreção de volume urinário, fração de excreção de sódio, ingestão hídrica e pressão arterial em todos os animais que receberam dieta HS.

Estudo de 1996 em pacientes que ingeriram diferentes quantidades de sal na dieta observou que o alto consumo habitual de sal causou o aumento da pressão arterial, supressão da atividade plasmática de renina e da aldosterona

e maior taxa de filtração glomerular. A excreção urinária de sódio foi relacionada à taxa de filtração que também se mostrou aumentada em 24 h de observação (Mallamaci et al. 1996).

Morizane et al (2012) apontam que a diminuição da aldosterona contribui, tanto em nível tubular no ducto coletor quanto nos túbulos contornados distais, para a menor reabsorção ativa de sódio. A água passa a ser reabsorvida passivamente e com velocidade diminuída de modo a seguir o sódio. Esse cenário contribui para ambos, aumento do volume de excreção urinária e necessidade de ingestão hídrica (Morizane et al., 2012).

Além dos efeitos do sal, a IRA também influenciou no balanço hídrico e do sódio no grupo IR/HS que chama atenção com maiores valores de excreção e ingestão de líquidos, que por sua vez, foram atenuados pela NAC no grupo IR+NAC/HS.

O aumento do fluxo urinário e diminuição da capacidade máxima de concentração da urina é uma consequência da IRA isquêmica de suave a moderada (Kwon et al. 2013).

Estudo em ratos submetidos à uninefrectomia direita e isquemia renal esquerda, por 45 min, demonstrou importante diminuição dos canais de transporte de água (aquaporinas 2 e 3), assim como dos co-transportadores de Na, K e Cl (NKCC2) no ducto coletor em até 72h após a cirurgia. Os resultados sugerem que o aumento do volume urinário se encontra associado à perda destes transportadores (Fernández-Llama et al., 1999).

De Araújo e colaboradores (2005) observaram alterações na reabsorção de água e sódio após 48 h de IR assim como diminuição dos transportadores

AQP2 e NKCC2 em modelo animal. No entanto, mediante tratamento com NAC, observou-se a prevenção na perda destes transportadores. Os autores atribuem esse fato a capacidade antioxidante da NAC, que contribui para a redução da peroxidação lipídica na membrana das células tubulares e proteção da medula renal diante da IR (de Araújo et al. 2005).

A peroxidação lipídica vincula-se à injúria celular, processos agudos e/ou crônicos, com o decaimento de antioxidantes celulares, a exemplo do superóxido desmutase (SOD) e catalase. Frente à esta situação, a NAC age de modo a aumentar a concentração intracelular de cisteína ou glutatona, restaura os antioxidantes que, por sua vez, neutralizam as espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente inibem ativação de neutrófilos e produção de TNF (Elbini Dhouib et al., 2016).

Neste estudo a diminuição da capacidade de concentração urinária causada pela IRA também pode ser observada na osmolaridade da urina dos animais IR/NS que foi menor em comparação aos demais animais dos grupos NS.

Na 10ª semana pós-isquemia, a creatinina sérica bem como *clearance* de creatinina não apresentaram diferenças. Em contrapartida, houve albuminúria considerável nos animais do grupo IR/HS, resultado que veio acompanhado de fibrose intersticial, e que foram atenuadas pelo tratamento com a NAC no grupo IR+NAC/HS.

Em estados fisiopatológicos, a fibrose, alterações no controle da hemodinâmica, processo acentuado pela hipertensão sal-sensível, inflamação estresse oxidativo, podem levar os glomérulos a tornar-se altamente

permeáveis à albumina circulante. Isso se deve às anormalidades na membrana basal ou nos podócitos, e no caso da IRA, principalmente a alterações na função do túbulo proximal e distúrbios nas células endoteliais (Glassock, 2010; Basile & Yoder, 2014).

O estresse oxidativo na IR é gerado principalmente no período da reperfusão renal seguida da hipóxia, que é caracterizada por aumento de radicais livres e espécies reativas de oxigênio acumulados durante o período de isquemia. Esse cenário corrobora com a disfunção endotelial, diminuição de óxido nítrico. O ânion superóxido, um dos radicais livres, pode interagir com NO remanescente e gerar peroxinitrito, considerado potente e citotóxico oxidante. O mesmo associa-se com a vasoconstrição renal e isquemia medular, o que contribui para a redução persistente da perfusão medular associada à injúria renal aguda, e geração da hipóxia continuada que é um estímulo importante para a fibrose e manutenção da lesão renal (de Araújo et al., 2005).

A ingestão de sódio, por si, associa-se aos distúrbios endoteliais e a albuminúria (de Cavanagh et al., 2010). Em ratos SHR submetidos ao tratamento com NaCl 1,5% na água de beber, durante 5 meses, foi observado o agravamento da hipertensão, excreção urinária de proteínas, fibrose intraparenquimal e perivascular na artéria renal. Além disso, os animais ainda apresentaram significativo aumento do estresse oxidativo na aorta e artéria renal e perda de células endoteliais (de Cavanagh et al., 2010).

A sobrecarga de sódio, somada à IRA, pode contribuir para o estabelecimento da inflamação, conforme estudo realizado por Peachman e colaboradores (2008). Os autores demonstram que ratos pós-isquemia

apresentam pressão arterial e níveis de creatinina plasmática normais, além de modificações histológicas mínimas que permitem a recuperação do quadro mediante 5 semanas de tratamento com dieta com 0,4% de NaCl. Em contrapartida, nesse mesmo modelo animal, o aumento da ingesta de sal para 4,0% NaCl contribuiu ao desenvolvimento de hipertensão sal-sensível, acompanhada por substancial lesão renal, hipertrofia caracterizada pela deposição de células no interstício, dilatação tubular e aumento da excreção de albumina, o que corrobora com a DRC. Essas condições, assim como a redução no infiltrado de células inflamatórias, foram restauradas mediante presença de agente imunossupressor micofenolato (MMF) (Spurgeon-Pechman 2007; Peachman et al. 2008).

A NAC pode prevenir, não somente os efeitos oxidativos, mas também inflamatórios da IR e hipertensão sal-sensível locais e sistêmicos (Xia et al., 2006).

Conforme demonstrado em cultura primária de esplenócitos de camundongos tratada com LPS, a NAC apresenta propriedades anti-inflamatórias, de modo a reduzir a proliferação linfocitária (Omara et al., 1999). Em outro estudo, realizado por Pajonk et al (2002), NAC bloqueou a atividade do fator nuclear NF- κ B induzida por radiação em células de carcinoma de bexiga e macrófagos *in vitro*.

Em atuação direta no endotélio, estudo aponta a ação protetora da NAC contra a indução do apoptose em células endoteliais tratadas com TNF- α . Além disso, a NAC contribuiu para o aumento dos níveis de glutathione peroxidase e restaurou os níveis de expressão de eNOS (Xia et al., 2006). Dado também

encontrado *in vivo*, em modelo animal de IR, a NAC inibiu completamente a diminuição da expressão da eNOS (de Araújo et al., 2005).

Em modelo murino de isquemia cerebral, a NAC levou a importante redução de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e TNF- α , além de diminuir o infiltrado macrofágico ED-1 (Khan et al., 2004). Ao transpor as análises para humanos verificou-se, em pacientes em diálise peritoneal, a ação da NAC na modulação de marcadores como IL-6 e TNF- α , após 8 semanas de tratamento (Nascimento et al. 2010).

Em estudo clínico a NAC diminuiu triglicérides, pressão arterial e proteinúria em pacientes com nefropatia diabética em dois meses de tratamento (Rouhi & Ganji, 2013). Em pacientes pós cateterismo cardíaco, a NAC atenuou a injúria glomerular ou tubular definida pela diminuição de excreção de albumina, independente de efeitos nos níveis de creatinina (Levin et al., 2007).

A suplementação com NAC contribuiu para os níveis séricos reduzidos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) nos animais do grupo IR+NAC, independente da dieta. Por sua vez, os animais submetidos à IR, sem tratamento, não apresentaram diferença quando comparados aos animais sham. Por sua vez, a presença de substâncias antioxidantes séricas, nos animais tratados concomitantemente com NAC e dieta HS, foi maior em relação ao grupo NS.

O estresse oxidativo é definido como desequilíbrio entre a capacidade pró-oxidante e antioxidante com consequências macromoleculares. Os pró-oxidantes consistem em fatores vinculados a geração das espécies reativas de

oxigênio (ROS). Estes, por sua vez, interagem com macromoléculas e causam oxidação proteica, peroxidação lipídica e danos no DNA. Em contrapartida, os antioxidantes atuam de modo a reduzir os efeitos das ROS e, consequentemente, o estresse oxidativo celular e/ou tecidual (Lakkur et al., 2014).

Contrário ao conceito apresentado, a literatura atual questiona a relação do estresse oxidativo com o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Ao invés disso, compreende-se o estresse oxidativo como “uma interrupção da sinalização e controle redox”. Essa visão alternativa assume que o estresse oxidativo, na ausência de eventos agudos, ocorre por vias redox discretas e intracelulares (Fitzpatrick et al., 2012). Portanto mesmo na ausência de alterações nos níveis séricos de antioxidantes/oxidantes, encontrados nos animais IR não tratados no presente estudo, pode haver estresse oxidativo à nível tecidual.

Apesar dos benefícios comprovados, em curto prazo, o uso inadequado de suplementos alimentares antioxidantes pode gerar um “estresse antioxidante”. Este termo é usado para descrever os efeitos negativos do excesso de antioxidantes, que assim como o estresse oxidativo, pode causar danos ao organismo. Níveis reduzidos de ROS atuam sob vias de sinalização, modulação da proliferação celular, apoptose, expressão gênica, modulação do cálcio intracelular, entre outras. Portanto, a supressão total das ROS também pode causar complicações (Poljsak et al. 2013).

Estes conceitos induzem ao questionamento sobre os benefícios, em longo prazo, dos baixos níveis de marcadores de peroxidação lipídica, como os

encontrados neste estudo nos animais tratados com NAC. Além disso, a associação do aumento sérico de cálcio nos animais tratados com NAC, independente da dieta, é algo a ser esclarecido. Os altos níveis séricos de cálcio associam-se com calcificação de válvulas cardíacas, artérias coronárias e maior mortalidade por doenças cardiovasculares. Este aumento é comumente atrelado a mecanismos calciotrópicos, tais como aumento do PTH e toxicidade por vitamina D (Lietman et al., 2010). No entanto, tal associação não foi encontrada nos grupos tratados com NAC neste trabalho.

Os níveis séricos do PTH correlacionaram-se com a albuminúria e esclerostina, e mostraram-se elevados nos animais IR/HS, o que foi prevenido pelo tratamento com NAC.

Diversos estudos também encontraram correlação entre os níveis séricos de PTH e albuminúria. Alterações no metabolismo mineral ósseo são observadas em grande parcela de pacientes com DRC, estágio 5, com níveis séricos de cálcio e 25(OH)D baixos e fósforo sérico elevado. Esses fatores são apontados como causadores do aumento do PTH em fase avançada da doença renal (Block et al., 1998).

Estudo transversal de coorte, realizado por Levin et al (2007), com 1814 pacientes, demonstrou que no estágio inicial da doença renal observa-se elevação do PTH a partir da taxa de filtração glomerular de 50ml/min/1,73m², independente das taxas do cálcio, fósforo e 25(OH)D3 séricos (Levin et al. 2007).

De modo a compreender o desencadear da alteração do PTH sérico, Muntner et al. (2009) avaliaram em 3949 indivíduos o declínio moderado da

taxa de filtração glomerular e observaram associação entre DRC moderada e alta prevalência de PTH elevado já no início da doença.

Gaibor et al. (2017), em estudo retrospectivo, analisou os efeitos da progressão para doença renal em 125 pacientes, acima dos 70 anos. Os autores identificaram uma correlação entre os níveis séricos de PTH, albuminúria e estimativa de taxa de filtração glomerular com a evolução da perda de função dos rins. Em outro estudo, com amostra populacional aproximada de 27.000 participantes norte-americanos, os autores também associaram taxas elevadas de PTH com o baixo grau de albuminúria (Ellam et al. 2014). Tendo em vista estes achados, podemos inferir que a albuminúria é um marcador relativamente precoce das alterações no metabolismo mineral ósseo relacionada à doença renal.

A esclerostina, secretada por osteócitos, associa-se com a diminuição da formação óssea por meio da inibição do processo terminal de diferenciação dos osteoblastos e consequente apoptose celular. Além disso, a esclerostina contribui de modo a bloquear a via de sinalização Wnt atrelada à osteoblastogênese e formação óssea (Asamiya et al. 2016).

Bellido et al. (2005) demonstraram que a incubação de cultura primária de osteócitos com PTH, durante 4 h, resulta na diminuição da expressão do gene da esclerostina, SOST. A fim de corroborar os achados *in vitro*, os mesmos autores administraram PTH em modelo murino, durante 4 dias, o que contribuiu para a diminuição da expressão gênica de SOST e proteica da esclerostina. O que sugere inibição da ação da esclerostina com o aumento do

PTH, uma vez que este se vincula ao número crescente de osteoblastos, (Bellido et al. 2005).

Entretanto, a esclerostina sérica, assim como o PTH, aumentam de maneira inversa ao declínio da função renal. Os valores podem ser estimados entre 3-4 vezes maior em pacientes com doença renal no estágio final, quando comparado aos controles normais. Os autores associam os níveis altos de esclerostina sérica com acúmulo devido o declínio da filtração glomerular (Asamiya et al. 2016; Cejka et al. 2014).

De maneira paradoxal, estudo transversal realizado por Cejka et al. (2014), em 1200 pacientes com DRC, estágio de 1-5, demonstrou que a eliminação renal da esclerostina aumenta frente ao declínio da função renal.

Há controvérsias também com relação à origem da esclerostina sérica, uma vez que outros tecidos também podem expressá-la. Reforth e colaboradores (2013), em estudo comparativo entre mulheres jovens e idosas, observaram que os níveis séricos de esclerostina foram maiores no segundo grupo, sem qualquer alteração na expressão do gene SOST quando comparado às mulheres jovens (Reforth et al. 2013).

Zhou e colaboradores (2017) identificaram a expressão da esclerostina na lâmina média da artéria radial de pacientes pré-diálise com DRC em estágio 5. Portanto, ainda se discute o estímulo que contribui para a correlação entre a esclerostina, declínio da função renal e PTH, que também foi observada no presente estudo.

Os animais IR+NAC/NS apresentaram aumento de esclerostina quando comparado aos demais grupos experimentais, o que pode ser consequência

dos níveis elevados de cálcio sérico, independente do PTH. Dawson-Hughes et al. (2014), em estudo follow-up, verificou que indivíduos do sexo masculino suplementados com cálcio apresentaram elevação nos níveis séricos de esclerostina.

A 1,25 (OH)₂D foi maior em todos os animais alimentados com dieta HS. Inversamente proporcional observou-se a menores níveis de FGF-23 nos grupos HS, sendo menor no grupo IR+NAC/HS. Ambos de maneira independente do PTH.

Estudo retrospectivo, realizado por Cervellin et al (2015), investigou aproximadamente cinco mil pacientes, que apresentavam hiponoremia que correlacionada positivamente com a alta taxa de deficiência de vitamina D (Cervellin et al. 2015).

O contrário também é real, uma vez que, Burgess et al. (1990) observaram que o consumo elevado de sódio contribui para o aumento da 1,25(OH)₂D e relaciona os níveis desse marcador com a diminuição da atividade e secreção da renina plasmática. Sendo assim, o sódio apresentaria efeito sobre o aumento da 1,25(OH)₂D.

Os animais que receberam sobrecarga de sódio excretaram altos níveis de cálcio pela urina, de maneira semelhante à excreção de sódio.

Em estudo clínico com mulheres pós-menopausa avaliou-se a ingestão de dieta rica em sódio. Os dados demonstraram aumento significativo na excreção urinária de cálcio, assim como na excreção de sódio, porém sem aumento na reabsorção do cálcio ingerido. Os autores do estudo atribuem ao

sal as modificações encontradas no balanço de cálcio, de positivo para negativo, nestas pacientes (Teucher et al. 2008).

O balanço negativo de cálcio pode ser o fator desencadeador da elevação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Rathod e colaboradores (2015), em estudo de regressão linear com mais de 1200 indivíduos, correlacionaram os valores de cálcio urinário de homens, mas não de mulheres, com os níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$. Sendo assim, a maior excreção do cálcio pode ser um fator secundário ao aumento da ingestão de sal, uma vez que a excreção de ambos os íons está associada, primordial na elevação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

O teor de sal na dieta tem também influência sob FGF-23, conforme demonstrado em estudo com modelo murino camundongo submetido à restrição de sódio na dieta ($<0,2\%$ NaCl). Os resultados demonstraram o aumento na concentração de FGF-23 sérico. Além disso, sugerem que este aumento se associa aos níveis elevados de aldosterona sérica nestes mesmos animais.

Zhang et al. (2016) reiteram que o aumento do marcador FGF-23 ocorre em resposta secundária à elevação da aldosterona e associa a ocorrência de altos níveis séricos de FGF-23 à nefropatia diabética, falência hepática, IRA, DRC, identificadas como doenças causadoras do hiperaldosteronismo.

Portanto, a associação inversa também é válida, onde baixos níveis de FGF-23 podem estar associados à diminuição da aldosterona. É conhecido que a alto teor de sódio na dieta diminui a aldosterona sérica. Trabalho com ratos alimentados com dieta com 8% de NaCl por 3 semanas demonstrou diminuição de angiotensina II assim como aldosterona séricas. Além disso, os mesmos

animais que receberam sobrecarga de sódio apresentaram marcadores de estresse oxidativo no plasma, coração e rins (Bayorh et al. 2005). Portanto, a sobrecarga de sódio na dieta pode ter diminuído os níveis séricos de FGF-23 nos animais HS por meio da diminuição da aldosterona.

Entretanto, não somente o sal tem influência sobre a aldosterona, mas também a NAC. Estudo experimental com ratos submetidos à nefrectomia 5/6 e tratados com NAC (600mg/L na água de beber), após 7 dias da cirurgia, apresentaram diminuição substancial da aldosterona sérica em comparação aos não-tratados. Esses resultados foram vistos a partir do 21º dia após o tratamento e foi acompanhado da diminuição do TBARS (Shimizu et al. 2005).

A partir destes preceitos, no presente estudo, a NAC pode ter contribuído para uma maior diminuição da aldosterona, o que culminou para os baixos índices de FGF-23 no grupo experimental IR+NAC/HS.

A fração de excreção de fósforo foi maior nos animais IR/HS, provavelmente devido ao estímulo dos altos níveis de PTH e apresentou níveis normais de fósforo sérico. Em contrapartida, o grupo IR+NAC/HS, a NAC diminuiu a albuminúria, devido seus efeitos protetores contra a isquemia/reperfusão renal, portanto, tal melhora pode ter evitado o aumento do PTH. Com isso o grupo apresentou diminuição da excreção de fósforo e consequente aumento do fósforo sérico. Tal aumento também pode estar relacionado à diminuição do FGF-23 nos mesmos animais.

Somados aos dados bioquímicos relacionados ao metabolismo ósseo, a histomorfometria óssea é uma importante ferramenta para o diagnóstico preciso da doença óssea e estabelecimento de tratamento específico.

Osteodistrofia renal é o termo tradicionalmente utilizado para descrever anormalidades na morfologia óssea desenvolvidas ao longo da doença renal. A classificação desta doença, a partir da análise do tecido ósseo, inclui três parâmetros: (1) remodelamento ósseo, o qual pode ser alto ou baixo, (2) mineralização, associada ao processo de calcificação do colágeno e, (3) volume ósseo, medida total do osso por volume de tecido (Moe et al. 2006). O balanço ósseo consiste no equilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção.

A osteodistrofia pode ser classificada em alto ou baixo remodelamento. A doença óssea de alto remodelamento caracteriza-se como secundária ao estado de hiperparatireoidismo. Apresenta-se com altos níveis de PTH, maior capacidade de remodelamento, aumento de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os distúrbios no remodelamento conferem formação anormal do tecido osteoide. Fatores que contribuem com o hiperparatireoidismo secundário são a hiperfosfatemia, hipocalcemia e deficiência de vitamina D (Feng & McDonald 2011; Malluche et al. 2010).

As diferenças identificadas na morfologia óssea dos animais do grupo IR/HS assemelham-se às descritas na doença óssea de alto remodelamento como maior volume, espessura e superfície osteoide, mineralização mais rápida, bem como, maior superfície de osteoblastos, acrescidos do aumento do PTH e perda de função renal. No entanto, os efeitos da sobrecarga de sódio que influenciou na elevação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e menor FGF-23, contrastam com as características típicas deste tipo de doença óssea. Vale salientar que, apesar destas discrepâncias, o aumento do PTH correlacionou-se ao aumento do tecido osteoide nestes animais.

A doença óssea de baixo remodelamento, subdividida em osteomalacia e doença óssea adinâmica, caracteriza-se por exacerbada diminuição dos sítios ativos de remodelamento. A osteomalácia configura-se pelo acúmulo de matriz não-mineralizada, frente à diminuição da mineralização, com consequências na variação do volume ósseo (Feng & McDonald 2011). Em outra instância, a doença óssea adinâmica apresenta-se com volume ósseo baixo, em frequência da diminuição da mineralização e, consequente, diminuição da formação óssea. Nessa condição, ainda se observa a diminuição dos osteoblastos, osteoclastos e ausência do acúmulo de tecido osteoide (Hruska et al. 2008).

Na DRC, embora o PTH sérico encontre-se geralmente acima dos valores normais, o padrão histológico da doença de baixo remodelamento é o de absoluta ou relativa deficiência de PTH, geralmente associado ao hipoparatiroidismo. Neste caso o tecido ósseo parece resistente ao PTH, com isso contribui para a expressiva diminuição do remodelamento ósseo. Entre as possíveis causas desse cenário destacam-se a diminuição dos receptores de PTH nas células ósseas, aumento dos níveis de osteoprotegerina, diminuição da produção e níveis circulantes de BMP e o efeito periférico da leptina (Feng & McDonald 2011; Coen 2005).

Sendo uma doença comumente identificada nos pacientes em diálise, tanto peritoneal quanto hemodiálise a toxicidade por alumínio frequentemente associa-se à doença adinâmica, de baixo remodelamento. Embora comum, a patogênese da doença óssea adinâmica sem a toxicidade por alumínio, não é compreendida. Alguns fatores podem implicar nessa desordem, tais como o aumento do cálcio plasmático, a toxicidade por vitamina D, as alterações em

fatores de crescimento e/ou citocinas (BMP, TGF- β , IGF-1 e IL-6). Assim, a doença adinâmica pode ser induzida, de maneira secundária, mediante tratamento do hiperparatireoidismo (Feng & McDonald 2011; Hruska et al. 2008).

As alterações encontradas no osso dos animais IR+NAC/HS corroboram com os sintomas da doença óssea de baixo remodelamento. Uma vez que, estes animais apresentaram menor volume ósseo e maior separação das trabéculas. Observou-se também a diminuição do PTH, altos níveis de 1,25(OH) $_2$ D, aumento do nível sérico de cálcio, o que, em conjunto, favorece a diminuição do volume ósseo. O tratamento preventivo com a NAC e o excesso de sódio contribuíram para este estado de desequilíbrio.

A correlação positiva entre os índices de mineralização óssea e os níveis séricos de produtos oxidantes provenientes da peroxidação lipídica (TBARS) chama atenção.

Muitas células dependem de ácidos graxos para gerar ATP. Estudos sugerem que osteoblastos tem altos índices de β -oxidação de ácidos graxos *in vitro*, estima-se que tal metabolização contribua com pelo menos 40% da energia utilizada por osteoblastos em cultura (Frey et al., 2015; Adamek et al., 1987). Outros estudos *in vitro* demonstraram que lipoproteínas de alta e baixa densidade são suficientes para manter a proliferação de osteoblastos mesmo na ausência de soro fetal bovino (Catherwood et al., 1988).

A partir destes preceitos, Kim et al. (2017) demonstrou em camundongos, por meio de lipídios marcados com isótopo radioativo, que o esqueleto acumula fração significativa de ácidos graxos pós-prandial,

equivalente ao montante adquirido pela musculatura ou tecido adiposo. Tendo em vista a grande importância da oxidação lipídica para o metabolismo ósseo o uso prolongado da NAC pode ter influenciado na fisiologia deste processo.

Em resumo, no presente estudo os mecanismos encontrados no grupo IR/HS deram início desde a sobrecarga de sal e sua decorrente hiperfiltração glomerular, que foi exacerbada pela IRA devido a diminuição da capacidade de concentração urinária. Ambas causam estresse oxidativo e inflamação nos rins e de maneira sistêmica. A continuidade destes mecanismos levou à fibrose e albuminúria, que por sua vez desencadeou o aumento do PTH (**Figura 18**).

O PTH influenciou a esclerostina, e a maior excreção de fósforo. Por sua vez a maior fração de excreção de cálcio, que acompanha a fração de excreção de sódio e influenciada pela hiperfiltração, atuou no aumento da 1,25(OH)₂D afim de manter estáveis os níveis séricos de cálcio. A elevação da 1,25(OH)₂D diminuiu os níveis de FGF-23 (**Figura 18**).

Embora a esclerostina e a 1,25 (OH)₂D tenham correlação com parâmetros osteoides, o PTH parece ter maior influência nas maiores taxas de formação óssea. O aumento da excreção de cálcio, PTH e volume osteoide sugerem o início de uma doença óssea de alto remodelamento, que parece ser independente dos altos níveis de 1,25(OH)₂D e FGF-23, mas está intimamente associada com o PTH e albuminúria (**Figura 18**).

Figura 18. Esquema dos resultados do grupo IR/HS

Em contrapartida, resumidamente as diferenças que ocorreram no grupo IR+NAC/HS foram desencadeadas pelo tratamento com a NAC. A NAC inibiu o estresse oxidativo e a inflamação geradas na IRA, exacerbadas pelos efeitos do sódio. Com diminuição de tais estímulos houve menores fibrose e albuminúria, melhora na concentração urinária e menor excreção de sódio que veio acompanhada de menor excreção de cálcio (**Figura 19**).

A diminuição da albuminúria e excreção de cálcio não elevou o PTH. Na ausência deste estímulo para excreção de fósforo, somado à diminuição do

FGF-23, possivelmente atrelada aos baixos índices de aldosterona tipicamente causados pela dieta HS e NAC, houve aumento do fósforo sérico. A dieta hipersódica e a maior excreção de cálcio continuaram influenciando os níveis de 1,25(OH)2D de maneira independente dos efeitos renais (**Figura 19**).

A melhora na excreção de cálcio, os altos níveis de 1,25(OH)2D e a diminuição substancial da peroxidação lipídica levou ao aumento do cálcio sérico. Todos estes mecanismos favorecidos pelo tratamento com a NAC levaram à menor volume ósseo e um possível início de doença óssea de baixo remodelamento (**Figura 19**).

A partir destes achados entende-se que a sobrecarga de sal na dieta é capaz de dar continuidade ao insulto da IRA nos rins, bem como, facilitar a perda de função renal e influenciar parâmetros importantes do metabolismo ósseo como balanço de cálcio, 1,25(OH)2D e FGF-23. Sendo assim, o acompanhamento de pacientes que sofreram IRA torna-se imprescindível, de modo a orientá-los quanto à prevenção do aparecimento precoce da DRC e mudança de hábitos frente a dieta rica em sódio.

Figura 19. Esquema dos resultados do grupo IR+NAC/HS

A correlação entre a elevação do PTH e o início da perda de função renal, na literatura e no presente estudo, apontam a albuminúria como um forte marcador relativamente precoce da doença óssea.

Quanto ao tratamento com a NAC, apesar da sua eficiência no retardo da evolução dos efeitos da IRA potencializados pela dieta rica em sal, paradoxalmente, o uso prolongado do antioxidante pode contribuir em efeitos secundários no metabolismo ósseo. Sendo assim sugerimos que o uso de antioxidantes, sob cautela, deve ser visto como o de qualquer outro medicamento.

1. A sobrecarga de 8,0% de cloreto de sódio na dieta causou evolução da IRA após 10 semanas da isquemia e reperfusão bilateral. Entretanto, o tratamento com a NAC atenuou os efeitos da IRA e consequentemente preveniu sintomas da evolução da doença renal.

2. A diminuição da função renal, causada pela IRA e dieta HS, está associada com o aumento do PTH, que por sua vez, influenciou no metabolismo ósseo com aumento do volume osteoide e de superfície de osteoblastos. O tratamento com a NAC diminuiu os níveis de PTH, no entanto levou à perda de volume ósseo.

7. REFERÊNCIAS

Adamek G, Felix R, Guenther HL, Fleisch H. Fatty acid oxidation in bone tissue and bone cells in culture. Characterization and hormonal influences. *Biochem J*. 1987 Nov 15;248(1):129-37.

Akabetri S, Lindergrrd B, Simonsen O, Nyberg G. Impact of parathyroid hormone on bone density in long-term renal transplant patients with good graft function. *Transplantation*. 2006 Sep 27;82(6):749-52.

Asamiya Y, Tsuchiya K, Nitta K. Role of sclerostin in the pathogenesis of chronic kidney disease-mineral bone disorder. *Renal Replacement Therapy* (2016) 2:8

Basile DP, Yoder MC. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2014;14(1):3-14.

Bayorh MA, Ganafa AA, Emmett N, Socci RR, Eatman D, Fridie IL. Alterations in aldosterone and angiotensin II levels in salt-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2005 May;27(4):355-67.

Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*. 2005 Nov;146(11):4577-83. Epub 2005 Aug 4.

Bernuy J, Gonzales GF. Bone mineral metabolism in patients with chronic kidney disease: review of its pathophysiology and morbimortality. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015 Apr-Jun;32(2):326-34.

Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis*. 1998 Apr;31(4):607-

17.

Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004; 66(2):480–485.

Bonventre JV¹, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011 Nov;121(11):4210-21. doi: 10.1172/JCI45161. Epub 2011 Nov 1.

Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M. Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1990 Dec;3(12 Pt 1):903-5.

Cachat F, Combescure C, Cauderay M, Girardin E, Chehade H. A systematic review of glomerular hyperfiltration assessment and definition in the medical literature. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015. 6;10(3):382-9. doi: 10.2215/CJN.03080314.

Catherwood BD, Addison J, Chapman G, Contreras S, Lorang M. Growth of rat osteoblast-like cells in a lipid-enriched culture medium and regulation of function by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Bone Miner Res.* 1988 Aug;3(4):431-8.

Cejka D, Marculescu R, Kozakowski N, Plischke M, Reiter T, Gessl A, Haas M. Renal elimination of sclerostin increases with declining kidney function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jan;99(1):248-55. doi: 10.1210/jc.2013-2786. Epub 2013 Dec 20.

Cervellin G, Salvagno G, Bonfanti L, Bonelli P, Guidi GC, Lippi G. Association of Hyponatremia and Hypovitaminosis D in Ambulatory Adults. *J Med Biochem.* 2015 Oct;34(4):450-454. doi: 10.1515/jomb-2015-0003. Epub 2015 Sep 19.

Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED, Bagshaw SM, Bittleman D, Cruz D, Endre Z, Fitzgerald RL, Forni L, Kane-Gill SL, Hoste E, Koyner J, Liu KD, Macedo E, Mehta R, Murray P, Nadim M, Ostermann M,

Palevsky PM, Pannu N, Rosner M, Wald R, Zarbock A, Ronco C, Kellum JA; Acute Disease Quality Initiative Workgroup 16. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Apr;13(4):241-257. doi: 10.1038/nrneph.2017.2. Epub 2017 Feb 27.

Chawla LS¹, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med.* 2014 Jul 3;371(1):58-66. doi: 10.1056/NEJMr1214243.

Cheidde L, Schor N. Revisão: transportadores de água. *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.45 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1999

Christov M. Fibroblast growth factor 23 in acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014 Jul;23(4):340-5. Chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998; 31:607–617

Coen G. Adynamic bone disease: an update and overview. *J Nephrol.* 2005 Mar-Apr;18(2):117-22.

Cohen AJ, Roe FJ. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible aetiological role of dietary salt. *Food Chem Toxicol.* 2000 Feb-Mar;38(2-3):237-53. Review.

Coskun Y, Paydas S, Balal M, Soyupak S, Kara E. Bone Disease and Serum Fibroblast Growth Factor-23 Levels in Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2016 Jul-Aug;48(6):2040-5.

Dare AJ, Bolton EA, Pettigrew GJ, Bradley JA, Saeb-Parsy K, Murphy MP. Protection against renal ischemia-reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biol.* 2015 Aug;5:163-8. doi: 10.1016/j.redox.2015.04.008. Epub 2015 Apr 29.

Dawson-Hughes B, Harris SS, Ceglia L, Palermo NJ. Effect of supplemental

vitamin D and calcium on serum sclerostin levels. *Eur J Endocrinol.* 2014 Mar 13;170(4):645-50. doi: 10.1530/EJE-13-0862. Print 2014 Apr.

de Araujo M, Andrade L, Coimbra TM, Rodrigues AC Jr, Seguro AC. Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Nov;16(11):3339-49. Epub 2005 Sep 21.

de Cavanagh EM, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. *Am J Hypertens.* 2010 Dec;23(12):1318-25. doi: 10.1038/ajh.2010.167. Epub 2010 Aug 12.

Devarajan P1. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jun;17(6):1503-20. Epub 2006 May 17.

Elbini Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci.* 2016 Apr 15;151:359-363. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.003. Epub 2016 Mar 2.

Ellam T, Fotheringham J, Wilkie ME, Francis SE, Chico TJ. Bone mineral metabolism parameters and urinary albumin excretion in a representative US population sample. *PLoS One.* 2014 Feb 5;9(2):e88388. doi: 10.1371/journal.pone.0088388. eCollection 2014.

Faraco G, Brea D, Garcia-Bonilla L, Wang G, Racchumi G, Chang H, Buendia I, Santisteban MM, Segarra SG, Koizumi K, Sugiyama Y, Murphy M, Voss H2, Anrather J, Iadecola C. Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nat Neurosci.* 2018 Feb;21(2):240-249. doi: 10.1038/s41593-017-0059-z. Epub 2018 Jan 15.

Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-45. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203.

Fernández-Llama P, Andrews P, Turner R, Saggi S, Dimari J, Kwon TH, Nielsen S, Safirstein R, Knepper MA. Decreased abundance of collecting duct aquaporins in post-ischemic renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Aug;10(8):1658-68.

Ferrari OG, Ferreira JC, Cavallari RT, Neves KR, dos Reis LM, Dominguez WV, Oliveira EC, Gracioli FG, Passlick-Deetjen J, Jorgetti V, Moysés RMA. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC Nephrol*. 2014; 15: 69. Published online 2014 May 3. doi: 10.1186/1471-2369-15-69

Fitzpatrick AM., Jones DP. and Brown LAS. Glutathione Redox Control of Asthma: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jul 15; 17(2): 375–408

Fraga CM, Tomasi CD, Damasio DC, Vuolo F, Ritter C, Dal-Pizzol F. N-acetylcysteine plus deferoxamine for patients with prolonged hypotension does not decrease acute kidney injury incidence: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *Crit Care*. 2016 Oct 17;20(1):331.

Frey JL, Li Z, Ellis JM, Zhang Q, Farber CR, Aja S, Wolfgang MJ, Clemens TL, Riddle RC. Wnt-Lrp5 signaling regulates fatty acid metabolism in the osteoblast. *Mol Cell Biol*. 2015 Jun 1;35(11):1979-91. doi: 10.1128/MCB.01343-14. Epub 2015 Mar 23.

Frings-Meuthen P, Buehlmeier J, Baecker N, Stehle P, Fimmers R, May F, Kluge G, Heer M. High sodium chloride intake exacerbates immobilization-induced bone resorption and protein losses. *J Appl Physiol* (1985). 2011 Aug;111(2):537-42. doi: 10.1152/jappphysiol.00454.2011. Epub 2011 May 19.

Gaibor NGT, Nava Pérez NC, Martínez Echevers Y, Montes Delgado R, Guerrero Riscos MÁ. PTH levels and not serum phosphorus levels are a predictor of the progression of kidney disease in elderly patients with advanced chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2017 Mar - Apr;37(2):149-157. doi:

10.1016/j.nefro.2016.08.004. Epub 2016 Nov 5.

Gardner DS, De Brot S, Dunford LJ, Grau-Roma L, Welham SJ, Fallman R, O'Sullivan SE, Oh W, Devonald MA. Remote effects of acute kidney injury in a porcine model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Feb 15;310(4):F259-71. doi: 10.1152/ajprenal.00389.2015. Epub 2015 Nov 25.

Glasscock RJ. Is the presence of microalbuminuria a relevant marker of kidney disease? *Curr Hypertens Rep*. 2010 Oct;12(5):364-8. doi: 10.1007/s11906-010-0133-3.

Hocher B, Armbruster FP, Stoeva S, Reichetzedder C, Grön HJ, Lieker I, Khadzhynov D, Slowinski T, Roth HJ. Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress--do we need a fourth generation parathyroid hormone assay? *PLoS One*. 2012;7(7):e40242. doi: 10.1371/journal.pone.0040242. Epub 2012 Jul 6.

Hong SH, Park CO, Park CS. Prediction of newly developed acute renal failure using serum phosphorus concentrations after living-donor liver transplantation. *J Int Med Res*. 2012;40(6):2199-212.

Horne KL, Packington R, Monaghan J, Reilly T, Selby NM. Three-year outcomes after acute kidney injury: results of a prospective parallel group cohort study. *BMJ Open*. 2017 Mar 29;7(3):e015316. doi: 10.1136/bmjopen-2016-015316.

Hruska KA. Chronic kidney disease mineral bone disorder (CKD-MBD) In: Rosen CJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Am. Soc. Bone Miner. Res.; Washington, DC: 2008. pp. 343–49.

KDIGO. Clinical practice guidelines for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 2009; 76:S1-S113.

Kellum JA, Lameire N; KDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care*. 2013 Feb 4;17(1):204. doi: 10.1186/cc11454.

Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res*. 2004 May 15;76(4):519-27.

Kim SP, Li Z, Zoch ML, Frey JL, Bowman CE, Kushwaha P, Ryan KA, Goh BC, Scafidi S, Pickett JE, Faugere MC, Kershaw EE, Thorek DLJ, Clemens TL, Wolfgang MJ, Riddle RC. Fatty acid oxidation by the osteoblast is required for normal bone acquisition in a sex- and diet-dependent manner. *JCI Insight*. 2017 Aug 17;2(16). pii: 92704. doi: 10.1172/jci.insight.92704. [Epub ahead of print]

Köse SA, Nazıroğlu M. N-acetyl cysteine reduces oxidative toxicity, apoptosis, and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Free Radic Res*. 2015 Mar;49(3):338-46. Epub 2015 Feb 9.

Kuo CC, Wu VC, Tsai CW, Wu KD, Taiwan Primary Aldosteronism Investigation (TAIPAI) Study Group. Relative kidney hyperfiltration in primary aldosteronism: A meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12: 113–122, 2011

Kwon TH, Frøkiær J, Nielsen S. Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis. *Kidney Res Clin Pract*. 2013 Sep;32(3):96-102. doi: 10.1016/j.krcp.2013.07.005. Epub 2013 Aug 27.

Lakkur S, Bostick RM, Roblin D, Ndirangu M, Okosun I, Annor F, Judd S, Flanders WD, Stevens VL, Goodman M. Oxidative balance score and oxidative stress biomarkers in a study of Whites, African Americans, and African immigrants. *Biomarkers*. 2014 Sep; 19(6): 471–480.

Leaf DE, Waikar SS, Wolf M, Cremers S, Bhan I, Stern L. Dysregulated mineral metabolism in patients with acute kidney injury and risk of adverse outcomes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Oct;79(4):491-8. doi: 10.1111/cen.12172. Epub 2013 Mar 26.

Leaf DE, Wolf M, Waikar SS, Chase H, Christov M, Cremers S, Stern L. FGF-23 levels in patients with AKI and risk of adverse outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Aug;7(8):1217-23. doi: 10.2215/CJN.00550112. Epub 2012 Jun 14.

Lee SH, Jang HD. Scoparone attenuates RANKL-induced osteoclastic differentiation through controlling reactive oxygen species production and scavenging. *Exp Cell Res*. 2015 Feb 15;331(2):267-77. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.12.018. Epub 2015 Jan 6.

Levin A, Pate GE, Shalansky S, Al-Shamari A, Webb JG, Buller CE, Humphries KH. N-acetylcysteine reduces urinary albumin excretion following contrast administration: evidence of biological effect. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Sep;22(9):2520-4. Epub 2007 Jun 8.

Lombardi R, Yu L, Younes-Ibrahim M, Schor N, Burdmann EA. Epidemiology of acute kidney injury in Latin America. *Semin Nephrol*. 2008 Jul;28(4):320-9. doi: 10.1016/j.semnephrol.2008.04.001

Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev*. 2015 Jun 1;4(2):20-7. doi: 10.12861/jrip.2015.06. eCollection 2015.

Malluche HH, Monier-Faugere MC, Herberth J. Bone disease after renal transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2010 Jan;6(1):32-40.2009.192. Epub 2009 Nov 17.

Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev*. 2012 Jan;92(1):131-55. doi:

10.1152/physrev.00002.2011.

Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006 Jun;69(11):1945-53.

Morizane S, Mitani F, Ozawa K, Ito K, Matsushashi T, Katsumata Y, Ito H, Yan X, Shinmura K, Nishiyama A, Honma S, Suzuki T, Funder JW, Fukuda K, Sano M. Biphasic time course of the changes in aldosterone biosynthesis under high-salt conditions in Dahl salt-sensitive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 May;32(5):1194-203. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.242719. Epub 2012 Mar 1.

Muntner P, Jones TM, Hyre AD, Melamed ML, Alper A, Raggi P, Leonard MB. Association of serum intact parathyroid hormone with lower estimated glomerular filtration rate. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Jan;4(1):186-94. doi: 10.2215/CJN.03050608. Epub 2008 Nov 19.

Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol.* 2011 Apr;7(4):209-17. doi: 10.1038/nrneph.2011.13. Epub 2011 Feb 22.

Nascimento MM, Suliman ME, Silva M, Chinaglia T, Marchioro J, Hayashi SY, Riella MC, Lindholm B, Anderstam B. Effect of oral N-acetylcysteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stress markers in peritoneal dialysis patients: a placebo-controlled study. *Perit Dial Int.* 2010 May-Jun;30(3):336-42. doi: 10.3747/pdi.2009.00073. Epub 2010 Feb 26.

Nicholson JP, Resnick LM, Cigarroa J, Marion D, Vaughan ED, Laragh JH. The Pressor Effect of Sodium-Volume Expansion Is Calcium Mediated. *American Journal of Hypertension*, Volume 4, Issue 11, 1 November 1991, Pages 904–908

Omara FO, Blakley BR, Bernier J, Fournier M. Immunomodulatory and protective effects of N-acetylcysteine in mitogen-activated murine splenocytes in vitro. *Toxicology*. 1997 Jan 15;116(1-3):219-26.

Pajonk F, Riess K, Sommer A, McBride WH. N-acetyl-L-cysteine inhibits 26S proteasome function: implications for effects on NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med*. 2002 Mar 15;32(6):536-43.

Palatini P, Dorigatti F, Saladini F, Benetti E, Mos L, Mazzer A, Zanata G, Garavelli G, Casiglia E. Factors associated with glomerular hyperfiltration in the early stage of hypertension. *Am J Hypertens*. 25: 1011–1016, 2012 [PubMed]

Pechman KR, De Miguel C, Lund H, Leonard EC, Basile DP, Mattson DL. Recovery from renal ischemia-reperfusion injury is associated with altered renal hemodynamics, blunted pressure natriuresis, and sodium-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Nov;297(5):R1358-63. doi: 10.1152/ajpregu.91022.2008. Epub 2009 Aug 26.

Pechman KR1, Basile DP, Lund H, Mattson DL. Immune suppression blocks sodium-sensitive hypertension following recovery from ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Apr;294(4):R1234-9. doi: 10.1152/ajpregu.00821.2007. Epub 2008 Feb 6.

Picken M, Long J, Williamson GA, Polichnowski AJ. Progression of Chronic Kidney Disease After Acute Kidney Injury: Role of Self-Perpetuating Versus Hemodynamic-Induced Fibrosis. *Hypertension*. 2016 Oct;68(4):921-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07749. Epub 2016 Aug 22.

Plotnikov EY, Kazachenko AV, Vyssokikh MY, Vasileva AK, Tcvirkun DV, Isaev NK, Kirpatovsky VI, Zorov DB. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int*. 2007 Dec;72(12):1493-502. Epub 2007 Oct 3.

Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and

antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:956792. doi: 10.1155/2013/956792. Epub 2013 Apr 29.

Quarles LD. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Jan 17;8(5):276-86. doi: 10.1038/nrendo.2011.218.

Rathod A, Bonny O, Guessous I, Suter PM, Conen D, Erne P, Binet I, Gabutti L, Gallino A, Muggli F, Hayoz D, Pécère-Bertschi A, Paccaud F, Burnier M, Bochud M. Association of urinary calcium excretion with serum calcium and vitamin D levels. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Mar 6;10(3):452-62. doi: 10.2215/CJN.12511213. Epub 2014 Dec 17.

Roforth MM, Fujita K, McGregor UI, Kirmani S, McCready LK, Peterson JM, Drake MT, Monroe DG, Khosla S. Effects of age on bone mRNA levels of sclerostin and other genes relevant to bone metabolism in humans. *Bone*. 2014 Feb;59:1-6. doi: 10.1016/j.bone.2013.10.019. Epub 2013 Oct 29.

Ronco C. Kidney attack: overdiagnosis of acute kidney injury or comprehensive definition of acute kidney syndromes? *Blood Purif*. 2013;36(2):65-8. doi: 10.1159/000354768. Epub 2013 Aug 20

Rouhi H, Ganji F. Effects of N-acetyl cysteine on serum lipoprotein (a) and proteinuria in type 2 diabetic patients. *J Nephropathol*. 2013 Jan;2(1):61-6. doi: 10.5812/nephropathol.8940. Epub 2013 Jan 1.

Sawhney S, Marks A, Fluck N, Levin A, Prescott G, Black C. Intermediate and Long-term Outcomes of Survivors of Acute Kidney Injury Episodes: A Large Population-Based Cohort Study. *Am J Kidney Dis*. 2017 Jan;69(1):18-28. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.05.018. Epub 2016 Aug 21.

Senol N, Nazıroğlu M, Yürüker V. N-acetylcysteine and selenium modulate oxidative stress, antioxidant vitamin and cytokine values in traumatic brain injury-induced rats. *Neurochem Res*. 2014 Apr;39(4):685-92. Epub 2014 Feb

12.

Shimizu MH, Coimbra TM, de Araujo M, Menezes LF, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int.* 2005 Nov;68(5):2208-17.

Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013 Nov;9(11):641-9. doi: 10.1038/nrneph.2013.147. Epub 2013 Jul 23.

Spurgeon-Pechman KR, Donohoe DL, Mattson DL, Lund H, James L, Basile DP. Recovery from acute renal failure predisposes hypertension and secondary renal disease in response to elevated sodium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Jul;293(1):F269-78. Epub 2007 May 16.

Teucher B, Dainty JR, Spinks CA, Majsak-Newman G, Berry DJ, Hoogewerff JA, Foxall RJ, Jakobsen J, Cashman KD, Flynn A, Fairweather-Tait SJ. Sodium and bone health: impact of moderately high and low salt intakes on calcium metabolism in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2008 Sep;23(9):1477-85. doi: 10.1359/jbmr.080408.

Wei SY, Wang YX, Zhang QF, Zhao SL, Diao TT, Li JS, Qi WR, He YX, Guo XY, Zhang MZ, Chen JY, Wang XT, Wei QJ, Wang Y, Li B. Multiple Mechanisms are Involved in Salt-Sensitive Hypertension-Induced Renal Injury and Interstitial Fibrosis. *Sci Rep.* 2017 Apr 6;7:45952. doi: 10.1038/srep45952.

Xia Z, Liu M, Wu Y, Sharma V, Luo T, Ouyang J, McNeill JH. N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha-induced human vascular endothelial cell apoptosis and restores eNOS expression. *Eur J Pharmacol.* 2006 Nov 21;550(1-3):134-42. Epub 2006 Sep 7.

Zhang B, Umbach AT, Chen H, Yan J, Fakhri H, Fajol A, Salker MS, Spichtig D, Daryadel A, Wagner CA, Föller M, Lang F. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Feb 5;470(2):384-390.

Epub 2016 Jan 8.

Zhou H, Yang M, Li M, Cui L. Radial artery sclerostin expression in chronic kidney disease stage 5 predialysis patients: a cross-sectional observational study. *Int Urol Nephrol*. 2017 Aug;49(8):1433-1437. doi: 10.1007/s11255-017-1604-0. Epub 2017 Apr 28.

Zuk A, Bonventre JV1,. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med*. 2016;67:293-307. doi: 10.1146/annurev-med-050214-013407.

Anexo 1. Evolução ponderal. Massa corpórea (g) dos animais que receberam dieta normossódica - NS (cinza) ou hipersódica - HS (preto) e foram submetidos à cirurgia Sham (A), isquemia e reperfusão renal - IR (B) ou isquemia e reperfusão com tratamento com NAC - IR+NAC da 6^a à 21^a semana de vida.

Anexo 2. Resultados suplementares. Ureia urinária 24h (mg/dl); Ureia sérica (mg/dl); Sódio sérico (mg/dl); K sérico (mg/dl); Batimentos cardíacos por minuto (BPM) dos animais que receberam dieta normossódica - NS ou hipersódica - HS e foram submetidos à cirurgia Sham, isquemia e reperfusão renal - IR ou isquemia e reperfusão com tratamento com NAC - IR+NAC na 10ª semana de vida.

	Sham		IR		IR+NAC	
	NR	HR	NR	HR	NR	HR
Ureia 24h (mg/dl)	1007 ± 83,52	1553 ±188,4*	849,2 ±104,6	1671 ±261,3*	913,5 ±95,81	1354 ±77,64*
Ureia sérica (mg/dL)	36,43 ± 2,66	41,38 ±2,22	49,44 ±3,85°	39,7 ±6,21	46,90±4,40	40,67±2,28
Na sérico (mg/dl)	141,9±1,32	140,1±1,79	139,6±1,08	138,4±1,48	139,9±0,92	141,0±0,71
K sérico (mg/dl)	4,81±0,15	4,54±0,16	4,92±0,15	4,86±0,17	4,44±0,19	4,62±0,18
BPM	389,6±13,45	384,4±24,86	374,4±6,64	378,0±15,09	390.3±12,10	404,9±14,59

Manuscript Number:

Title: N-acetyl-L-cysteine Exacerbates The Kidney Dysfunction, Bone Impairment Caused By Chronic High Sodium Diet In Renal Ischemia And Reperfusion In Rat

Article Type: Full length article

Keywords: renal ischemia and reperfusion, N-acetyl-L-cysteine, high sodium diet, rat, bone.

Corresponding Author: Dr. Luzia Naoko Shinohara Naoko Shinohara Furukawa, Ph.D.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Carolina M Romão

Order of Authors: Carolina M Romão; Rafael C Pereira; Vanda Jorgetti; Luciene M dos Reis; Luzia Naoko Shinohara Naoko Shinohara Furukawa, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Aims: to investigate effect of long term the N-acetylcysteine (NAC) treatment in Wistar rats submitted to renal ischemia and reperfusion and to chronic high sodium diet. Main methods: adult male Wistar rats received a high (HSD; 8.0% NaCl) or a normal sodium diet (NSD; 1.3% NaCl) and NAC (600 mg/L) in the drinking water or normal water starting at 8 weeks of age. At 11 weeks of age, the rats underwent a renal ischemia and reperfusion (I/R) procedure and were followed for 10 weeks after I/R. Key findings: tail blood pressure (tBP) was higher in HSD group; however, NAC did not change the tBP. The serum creatinine was higher and creatinine clearance was lower with NAC treatment in both diet group. The fraction excretion of sodium and potassium were higher in HSD group; however, the NAC treatment increased further. Albuminuria was lower in HSD group; but the NAC treatment increased it. The kidney and heart masses were lower in HSD+NAC than NSD+NAC group. The serum PGF-23 was lower in HSD than NSD group. The serum calcium and fraction excretion of phosphorus were increased with NAC treatment. The trabecular separation was higher in HSD+NAC and lower in NSD+NAC group. The osteoid thickness was lower in HSD+NAC and higher in NSD+NAC group. Significance: despite of hypertrophy prevention in kidney and heart, NAC exacerbated the kidney dysfunction and bone impairment caused by chronic high sodium diet in renal ischemia and reperfusion in rat.

Suggested Reviewers: Reinhold G Erben
Veterian, University of Veterinary Medicine Vienna
Reinhold.Erben@vetduni.ac.at
He studies about sodium and PGE-23 regulation

Nadezda Koleganova

Institute of Pathology, University of Heidelberg
nad_ko@gmx.de
She studies about high sodium diet and experimental animal.

Marcin Renke
Department of Nephrology, Transplantology and Internal Medicine, Medical University of Gdansk
mrenke@gumed.edu.pl
She studies about N-acetylcysteine and renal disease

Michael E Ullian
Division of Nephrology, Medical University of South Carolina
ullianne@usc.edu
He studies N-acetylcysteine and renal disease.

Jay Cao
Agricultural Research Service, USDA, Agricultural Research Service
Jay.Cao@ars.usda.gov
He studies about N-acetylcysteine and bone.

Anexo 3. Submissão de manuscrito. Comprovante de submissão de artigo referente ao presente estudo