

MAURICIO DE CARVALHO

**EFEITOS DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E DA UROMODULINA
NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO**

**Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção de título de Doutor em
Medicina Interna, Setor de Ciências da
Saúde, Departamento de Clínica Médica da
Universidade Federal do Paraná.**

Orientador:

Prof. Dr. Rogério Andrade Mulinari

Co-Orientador: Dr. Yasushi Nakagawa

CURITIBA

2001



PARECER

PARECER CONJUNTO dos Professores Dr. Waldir Eduardo Garcia, Dr. Istênio José Fernandes Pascoal, Dr. José Gastão Rocha de Carvalho, Dr. Mário Luiz Luvizotto, Dr. Rogério Andrade Mulinari, sobre a Tese de Doutorado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por Mauricio de Carvalho, intitulada: "EFEITOS DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E DA UROMODULINA NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO"

A Banca Examinadora considerou que Mauricio de Carvalho apresentou trabalho adequado para Tese de Doutorado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "10", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de DOUTOR EM MEDICINA e a publicação da tese em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 19 de dezembro de 2001.

Dr. Waldir Eduardo Garcia

Dr. Istênio José Fernandes Pascoal

Dr. José Gastão Rocha de Carvalho

Dr. Mário Luiz Luvizotto

Dr. Rogério Andrade Mulinari

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE QUADROS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 ESTADOS DE SATURAÇÃO E NUCLEAÇÃO	1
1.3 CRESCIMENTO DOS CRISTAIS	4
1.4 AGREGAÇÃO DOS CRISTAIS	5
1.5 RETENÇÃO DE PARTÍCULAS CRISTALINAS NO RIM.....	6
1.6 INIBIDORES DA CRISTALIZAÇÃO.....	7
1.7 PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL	12
1.8 UROMODULINA.....	17
2 OBJETIVO	20
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	21
3.2 COLETA DE URINA.....	21
3.3 ANÁLISE DOS CÁLCULOS RENAIIS ELIMINADOS.....	22
3.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E UROMODULINA	22
3.5 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E UROMODULINA.....	23
3.6 ESPECTROMETRIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.....	24
3.7 ANÁLISE DE CARBOIDRATOS	24
3.8 TÉCNICA DE CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO.....	25
3.9 MEDIDAS DE CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO	25
3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	26

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS	27
4.1 BIOQUÍMICA URINÁRIA	27
4.2 DETECÇÃO, CONFORMAÇÃO ESPACIAL, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E EXCREÇÃO DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E UROMODULINA.....	28
4.3 MEDIDAS DA DENSIDADE ÓPTICA	29
4.4 DADOS DE CRISTALIZAÇÃO	31
4.5 MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA.....	32
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ConA	- <i>Canavalia ensiformis</i>
DNA	- <i>Desoxiribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
DO	- Densidade óptica
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
Kf	- Produto de formação
Kps	- Produto de solubilidade
KDa	- Quilodáton
Kv	- Quilovolt
PBS	- <i>Phosphate buffer sodium</i> (Tampão fosfato de sódio)
PC	- Produto de concentração
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
Rpm	- Rotações por minuto
SDS-PAGE	- <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel</i> (Gel de poliacrilamida em sódio dodecil sulfato)
THP	- <i>Tamm-Horsfall protein</i> (Proteína de Tamm-Horsfall)
UM	- Uromodulina

LISTA DE FIGURAS

1	ESTADOS DE SATURAÇÃO	2
2	THP E UM EM GEL DE SDS-PAGE	28
3	CURVAS DE DENSIDADE ÓPTICA	30
4	CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DE VOLUME OBTIDA COM O APARELHO COULTER.....	32
5	EFEITO DA THP DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES).....	33
6	EFEITO DA THP DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES)	33
7	EFEITO DA THP DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)	34
8	EFEITO DA THP DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)	34
9	EFEITO DA UM DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES).....	35
10	EFEITO DA UM DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES)	36
11	EFEITO DA UM DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)	37
12	EFEITO DA UM DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)	37

LISTA DE QUADROS

1	FORÇAS DETERMINANTES DA AGREGAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO.....	5
2	INIBIDORES DA CRISTALIZAÇÃO URINÁRIA	8
3	BIOQUÍMICA URINÁRIA	27
4	EXCREÇÃO URINÁRIA DE THP E UM	29
5	EFEITOS DA THP E UM NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO	31

RESUMO

Um dos mecanismos de defesa contra a nefrolitíase é a presença de macromoléculas que modulam a nucleação, crescimento, agregação e retenção de cristais nos rins. O objetivo deste estudo foi determinar o comportamento da proteína de Tamm-Horsfall (THP) e da uromodulina (UM) na cristalização do oxalato de cálcio. Foi estudado um grupo de dez pacientes masculinos, com história de pelo menos um cálculo composto de 50% ou mais de oxalato de cálcio. Foram classificados como portadores de doença litiásica idiopática e não apresentavam anormalidades metabólicas associadas à nefrolitíase. Dez homens sem doença litiásica foram também estudados, assim como um grupo constituído por cinco mulheres normais e outro formado por cinco gestantes. A cristalização foi induzida por supersaturação fixa de oxalato de cálcio. A bioquímica urinária não revelou diferenças significativas entre os pacientes e demais grupos. O número de partículas depositadas sob ação da THP dos portadores de nefrolitíase foi maior que o dos demais grupos ($p < 0,0001$). Entretanto, a THP do grupo nefrolitíase diminuiu significativamente o diâmetro das partículas ($p < 0,002$) quando analisada pela moda de distribuição da curva de volume, $5,64 \pm 0,55 \mu\text{m}$ da THP comparado a $11,41 \pm 0,48 \mu\text{m}$ da UM; contra $15,94 \pm 3,93$ e $12,45 \pm 0,97 \mu\text{m}$ da THP e UM de homens normais, respectivamente; $8,17 \pm 1,57$ e $9,82 \pm 0,95$ da THP e UM de mulheres normais, respectivamente; $12,17 \pm 1,41 \mu\text{m}$ e $12,99 \pm 0,51$ da THP e UM das gestantes, respectivamente. A UM produziu menos partículas do que a THP em todos os grupos estudados. No entanto, o volume total dos cristais formados pela UM foi maior. Este comportamento sugere uma ação preferencial da THP na nucleação e da UM na agregação cristalina. Esta diferença foi ampliada em pacientes do grupo nefrolitíase.

ABSTRACT

One of the defenses against nephrolithiasis include macromolecules that modulate the nucleation, growth, aggregation and retention of crystals in the kidneys. The aim of this study was to determine the behavior of two of these proteins, Tamm-Horsfall (THP) and uromodulin (UM) on calcium oxalate crystallization. We studied a group of 10 male stone-formers, with at least one separate kidney stone, with 50% or more composed of calcium oxalate. They were classified as having idiopathic nephrolithiasis and had no well-known metabolic risk factors involved in kidney stone pathogenesis. Ten men without nephrolithiasis were also studied, as were a group formed by 5 normal women and another formed by 5 pregnant women. Crystallization was induced by a fixed supersaturation of calcium oxalate. The urinary chemistry from patients overlapped those of other groups and did not differ significantly. The number of particulate material deposited from patients' THP was significantly higher than the other groups ($p < 0.001$). However, THP significantly decreased the particle diameter in the stone-formers group ($p < 0.002$) when analyzed by the mode of the volume distribution curve, $5.64 \pm 0.55 \mu\text{m}$ compared to 11.41 ± 0.48 of UM; 15.94 ± 3.93 and $12.45 \pm 0.97 \mu\text{m}$ of normal men THP and UM, respectively; 8.17 ± 1.57 and 9.82 ± 0.95 of normal women THP and UM, respectively; 12.17 ± 1.41 and $12.99 \pm 0.51 \mu\text{m}$ of pregnant women THP and UM, respectively). UM produced fewer particles than THP in all groups. Nonetheless, the total volume of the crystals produced by UM was larger than THP. This dual behavior suggests different functions. THP may act on nucleation and UM may promote aggregation of calcium oxalate crystals.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

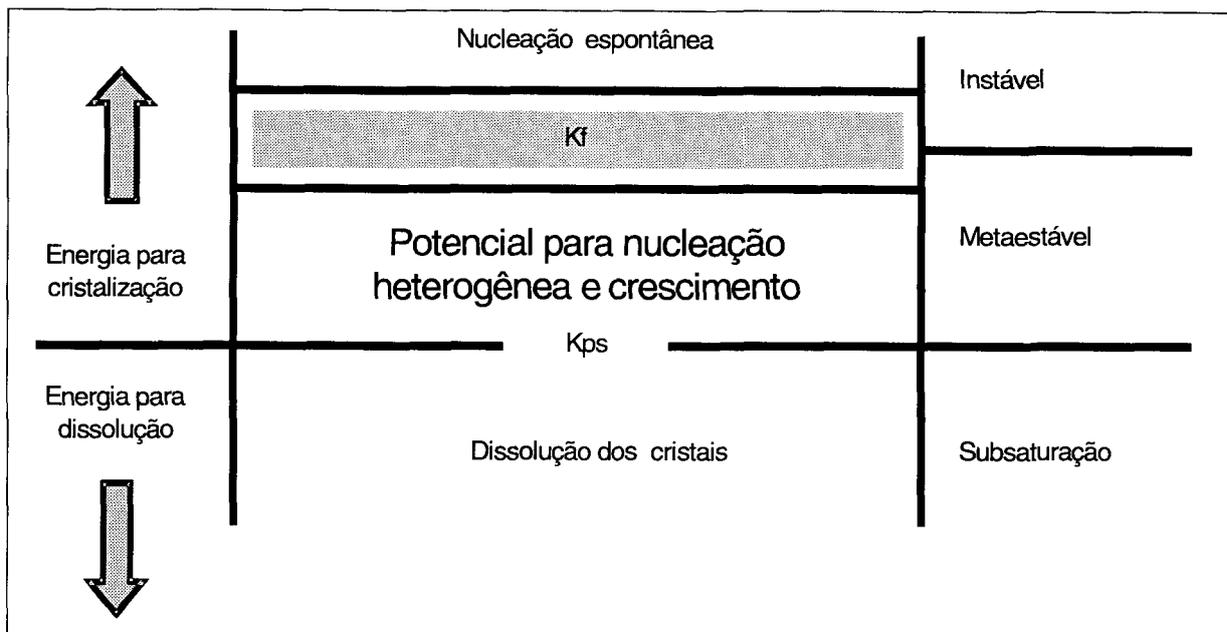
A formação de cálculos no trato urinário pode ser entendida como uma forma de biomineralização (MANN, S., 1983). A nefrolitíase é, portanto, um processo de cristalização que ocorre em um sistema biológico e é influenciada por ele. Nas suas diversas etapas, vários componentes e moduladores podem ser identificados. De modo simplificado, estes podem ser divididos em fatores físico-químicos, que influenciam principalmente a saturação urinária e posterior nucleação, crescimento e agregação de partículas cristalinas, e fatores biológicos, relacionados primordialmente a macromoléculas urinárias que atuam como inibidores da cristalização (ROBERTSON, W. G.; PEACOCK, M., 1972).

1.2 ESTADOS DE SATURAÇÃO E NUCLEAÇÃO

A formação de partículas cristalinas envolve dois aspectos físico-químicos: uma fase termodinâmica que inclui o desenvolvimento de supersaturação, resultando na nucleação de microcristais, e uma fase cinética, que engloba a taxa de nucleação, crescimento e agregação destes cristais (KOK, D. J. et al. 1988). Estes processos determinarão a forma, o tamanho e o número dos cristais gerados.

A figura 1 ilustra três condições gerais de uma solução contendo íons ou moléculas de materiais cristalinos solúveis, como a urina por exemplo. O diagrama demonstra aumento crescente de concentração, de baixo para cima. O produto de concentração, uma medida da solubilidade de determinada substância, é determinado matematicamente multiplicando-se seus componentes iônicos individuais. Por exemplo, o produto de concentração (PC) da hidroxiapatita é calculado como $= [Ca^{+2}]^5 [PO_4^{-3}]^3 [OH^-]$ (MEYER, J. L., 1990).

FIGURA 1 - ESTADOS DE SATURAÇÃO



Dois outros conceitos são importantes para a interação soluto-solvente nos processos de cristalização: o produto de solubilidade (K_{ps}) e o produto de formação (K_f). O K_{ps} é o produto de concentração no qual existe equilíbrio entre a porção cristalina e a solvente, não havendo formação de novas partículas. O K_f refere-se ao produto de concentração no qual haverá precipitação, em velocidade cinética significativa, mesmo sem a inclusão de materiais pré-formados ou outras superfícies cristalinas (FINLAYSON, B.; KHAN, S. R.; HACKETT, R. L., 1984).

O K_{ps} e o K_f são os limites que diferenciam os três estados básicos de saturação em soluções artificiais simples, produzidas em laboratório, ou complexas, como a urina humana.

Soluções com concentrações abaixo do K_f não permitem a formação de cristais sob qualquer circunstância. Mesmo se adicionarmos cristais pré-formados, estes se dissolverão até a solução se tornar saturada. Por outro lado, quando o produto de concentração torna-se maior que o K_f , inicia-se a nucleação, a primeira fase de formação de qualquer substância cristalina (FINLAYSON, B., 1978). Nesta situação, a energia livre presente é tão alta que a nucleação é praticamente inevitável, causando um rearranjo molecular e estabilização da solução.

A região de maior interesse do ponto de vista químico, biológico e médico situa-se entre o K_{ps} , abaixo da qual a cristalização não se inicia, e o K_f , acima da qual a cristalização é constante. Esta zona intermediária é denominada de metaestável (SMITH, L. H., 1990). Possui grande importância na patogenia da nefrolitíase, já que a maioria dos produtos de concentração da urina de indivíduos normais e de portadores de cálculo renal situa-se nesta faixa (COE, F.L.; PARKS, J. H., 1997). Além disto, os fatores inibidores da cristalização exercem seus efeitos principalmente dentro destes limites (MEYER, J. L., 1990).

Na zona metaestável, os produtos de concentração das diversas substâncias permitem o crescimento de cristais preexistentes, mas não a formação de novos núcleos. Entretanto, algumas possibilidades de nucleação de novo devem ser consideradas quando analisamos o trato urinário.

Em primeiro lugar, em determinadas regiões do nefro, como na alça de Henle, os produtos de concentração podem exceder o K_f por períodos longos o bastante para que a nucleação ocorra. Uma outra possibilidade é a de ocorrer fluxo urinário lento, mesmo por curtos períodos. Nesta situação, o processo cinético tempo-dependente pode ser deflagrado. Finalmente, no caso específico da urina, várias substâncias presentes, como macromoléculas e debris celulares, podem servir de núcleo inicial para o processo de cristalização. Este fenômeno é denominado de nucleação heterogênea e acontece com K_f bem menores do que aqueles presentes em soluções perfeitamente puras, onde a nucleação só se manifesta de forma homogênea, ou seja, em arranjo moleculares uniformes (MEYER, J. L., 1990).

Pelo fato de a nucleação diminuir a supersaturação de uma solução sem produzir no entanto partículas de tamanho significativo, tem-se questionado sua importância na nefrolitíase (CERINI, C. et al., 1999). Entretanto, constitui-se em pré-requisito para a formação de cristais que, em última análise, levam à formação de cálculos renais (HESS, B. et al., 1995).

1.3 CRESCIMENTO DOS CRISTAIS

Uma vez que o núcleo do cristal tenha atingido um tamanho crítico e a solução que o abrigue permaneça com valores acima do K_f , novas camadas de componentes serão adicionadas. Este fenômeno é chamado de crescimento do cristal (FINLAYSON, B., 1978).

Para que ocorra a incorporação de componentes cristalinos ao núcleo formado, vários passos são necessários. O primeiro deles é a migração através da solução, em um processo de difusão. Quando o componente atinge a superfície do cristal, ocorre o acoplamento por meio de adsorção. Unidades de crescimento bombardeiam constantemente a superfície do cristal e são atraídas pelos íons presentes. Formam-se verdadeiras camadas de adsorção, que são incorporadas e constantemente renovadas. Finalmente, ocorre a desidratação da camada recém-formada, através de um processo de dessolvatação, que confere resistência ao cristal, impedindo sua dissolução (MEYER, J. L., 1990).

O processo de difusão do componente na superfície do cristal ocorre até que o mesmo encontre uma região onde obtenha uma face adicional de contacto e perca sua mobilidade. Esta região é denominada de ponto de crescimento do cristal. É a etapa final do crescimento e também a sua limitante (HESS, B.; KOK, D. J., 1996).

A existência destes pontos de crescimento produz implicações do ponto de vista prático. Substâncias ditas inibidoras ou *crystal killers* ligam-se preferencialmente a estes locais e impedem o acoplamento adicional de íons (MARTIN, X.; SMITH, L. H.; WERNESS, P. G., 1984).

Dentro da patogênese da nefrolitíase humana, interroga-se o valor do crescimento de cristais, principalmente em relação ao oxalato de cálcio. Considerando-se que a velocidade de crescimento dos cristais de oxalato de cálcio é baixa e o trânsito do fluido tubular renal de apenas alguns minutos, estudos de microperfusão demonstraram que a probabilidade de uma partícula atingir tamanho relevante apenas por crescimento é muito baixa, mesmo com o crescimento acontecendo a uma velocidade de dois micrômetros por minuto (KOK, D. J.; KHAN, S. R., 1994).

1.4 AGREGAÇÃO DOS CRISTAIS

O processo pelo qual cristais em solução juntam-se para formar uma partícula maior é chamado de agregação ou aglomeração (HESS, B.; KOK, D. J., 1996). Como é necessária energia para haver desintegração de um sólido para a fase líquida, a agregação é um processo naturalmente favorecido.

Embora a velocidade de agregação seja proporcional ao estado de saturação de uma solução, ela pode ocorrer em uma faixa ampla de condições (COE, F. L.; PARKS, J. H., 1990). Além disso, a agregação *per se* é um processo muito rápido, permitindo a formação de partículas de tamanho considerável dentro de segundos.

A agregação de partículas em solução é governada por várias forças, com efeitos muitas vezes diversos. O quadro 1 resume os principais determinantes da agregação do oxalato de cálcio na urina e em soluções aquosas.

QUADRO 1 - FORÇAS DETERMINANTES DA AGREGAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO

FORÇAS QUE FAVORECEM A AGREGAÇÃO	FORÇAS QUE DIFICULTAM A AGREGAÇÃO
Van der Waals	Repulsão eletrostática (Potencial zeta)
Adesão por viscosidade	Turbulência da solução
Eletrostática	
Formação de pontes	

Quando a distância entre as partículas cristalinas é muito pequena, as chamadas forças de Van der Waals aumentam e favorecem a agregação (FINLAYSON, B.; KHAN, S. R.; HACKETT, R. L., 1984). A agregação também pode ocorrer por viscosidade. Macromoléculas podem aderir às superfícies dos cristais e funcionar como adesivo entre as partículas (KHAN, S. R., 1995). A formação de pontes, chamadas sólidas ou de precipitação, conecta duas partículas através de material cristalino. Elas são o resultado da tendência das várias soluções de minimizar a energia livre existente nos sistemas, por meio de uma redução na superfície total das partículas (HESS, B.; KOK, D. J., 1996).

A principal força de desagregação é a chamada repulsão eletrostática ou potencial zeta (SCURR, D. S.; ROBERTSON, W. G., 1986). Ela depende da carga elétrica existente na superfície do cristal e pode variar de acordo com as diferentes soluções. Por exemplo, na água os cristais de oxalato de cálcio tem um potencial zeta de +20 milivolts, enquanto que na urina este potencial é negativo, devido à adsorção de partículas negativas (HESS, B.; NAKAGAWA, Y.; COE, F. L., 1989).

Finalmente, uma força dispersiva externa é produzida pela agitação de uma solução de cristais ou pela corrente de líquidos no fluido tubular. Entretanto, pode também causar um aumento da agregação, ao aumentar a frequência de colisão entre moléculas (HESS, B.; KOK, D. J., 1996).

1.5 RETENÇÃO DE PARTÍCULAS CRISTALINAS NO RIM

A passagem de cristais pela urina, denominada cristalúria, ocorre em portadores de doença litiásica, bem como em indivíduos normais (ELLIOT, J. S.; RABINOWITZ, I. N., 1980). A supersaturação da urina em relação a vários sais é a explicação desta ocorrência. Alguns estudos, analisando a taxa de crescimento e agregação cristalina e a velocidade do fluxo tubular renal, sugeriram que cristais formados durante o trânsito intranefro não alcançariam tamanho suficiente para ocluir a luz tubular. Conseqüentemente, a formação posterior de cálculos urinários dependeria da retenção destas partículas (FINLAYSON, B.; REID, F., 1978; BROWN, C. M.; PURICH, D. L., 1991). O ancoramento dos cristais é facilitado por interações com a célula tubular renal. Macromoléculas urinárias podem facilitar ou impedir esta adesão (LIESKE, J. C.; TOBACK, F. G., 1996). Uma vez retido, haverá então condições de tempo para o crescimento do cristal, desde que mantidas as condições de saturação da urina.

1.6 INIBIDORES DA CRISTALIZAÇÃO

As várias etapas da cristalização de um sistema são amplamente dependentes da composição do próprio sistema. Em relação à urina, por exemplo, uma variedade de constituintes pode afetar a saturação, atuar como inibidores ou promotores da cristalização (RYALL, R. L. et al., 1986).

O interesse pelo papel dos inibidores da cristalização do oxalato de cálcio vem de várias décadas. Inicialmente, demonstrou-se que a urina de pessoas normais era capaz de inibir a calcificação da cartilagem de ratos, enquanto que a urina de formadores de cálculo urinário não possuía esta propriedade (HOWARD, J. E.; THOMAS, W. C., 1958).

A partir desta data, vários estudos ajudaram a criar a chamada teoria dos inibidores na doença litiásica. Segundo ela, indivíduos normais não apresentariam cálculos renais por possuírem substâncias na urina que interfeririam na nucleação, crescimento ou agregação dos cristais de oxalato de cálcio. Ao contrário, portadores de nefrolitíase apresentariam deficiência qualitativa ou quantitativa destas mesmas substâncias (ROBERTSON, W. G. et al., 1976; RYALL, R. L. et al., 1991).

A atividade inibitória pode ser definida como a capacidade da urina em impedir a nucleação espontânea de cristais ou se esta situação ocorrer, prevenir o crescimento e agregação posteriores (GARDNER, G. L.; DOREMUS, R. H., 1978). Várias substâncias foram descritas como inibidoras da cristalização na urina. Podemos classificá-las em dois grandes grupos, como descrito no quadro 2: baixo peso molecular e macromoléculas, estas por definição com peso molecular maior que 10.000 dáltons.

QUADRO 2 - INIBIDORES DA CRISTALIZAÇÃO URINÁRIA

INIBIDORES DE BAIXO PESO MOLECULAR	INIBIDORES MACROMOLECULARES
Citrato	Glicosaminoglicanos
Pirofosfato	Nefrocalcina
Magnésio	Uropontina
	Bikunina
	Fragmento Urinário da Protrombina

O citrato é um potente inibidor da cristalização (TISELIUS, H.G.; FORNANDER, A.M.; NILSSON, M.A., 1994). Forma sais solúveis com o cálcio, diminuindo a disponibilidade do mesmo para se combinar com ácidos orgânicos, como o oxalato por exemplo (PAK, C. Y. C., 1994). Além deste efeito específico em diminuir a supersaturação urinária, o citrato inibe a cristalização do oxalato de cálcio. O número de partículas formadas diminui, assim como seu crescimento e capacidade de agregação (PAK, C. Y. C., 1990). Mulheres normais apresentam uma relação citrato/cálcio urinário muito alta. Entretanto, em homens normais a relação se aproxima àquela de mulheres formadoras de cálculo (PARKS, J. H.; COE, F. L., 1986). Esta talvez seja uma das explicações da elevada prevalência de nefrolitíase em homens. Além disto, vários autores demonstraram uma menor excreção de citrato na urina de portadores de doença calculosa renal (RUDMAN, D. et al., 1982; HOSKING, D. H. et al., 1985).

O pirofosfato foi o primeiro inibidor da cristalização isolado da urina (FLEISCH, H.; BISAZ, S., 1962). Embora possa formar complexos com o cálcio, também inibe a cristalização por adsorção à superfície de crescimento dos cristais (MEYER, J. L.; SMITH, L. H., 1975). Em uma concentração de 16 μ M, que se situa na faixa fisiológica de excreção urinária, o pirofosfato inibiu o crescimento de cristais monohidratados de oxalato de cálcio. Em urinas não diluídas, o pirofosfato não demonstrou, porém, efeitos na nucleação ou agregação do oxalato de cálcio (RYALL, R. L.; HIBBERD, C. M.; MARSHALL, V. R., 1985).

A formação de complexos com o oxalato parece ser o mecanismo principal de ação do magnésio. Seu efeito inibitório na cristalização acontece independente da presença de macromoléculas na urina. Ao contrário do citrato e do pirofosfato, inibe a nucleação e aumenta o limite de metaestabilidade da urina. Em um estudo que empregou solução supersaturada de oxalato de cálcio, houve diminuição de 50% no número de partículas formadas, utilizando magnésio em concentração de 2 $\mu\text{mol/ml}$ (DESMARS, J. F.; TAWASHI, R., 1973). Curiosamente, pacientes com nefrolitíase não apresentam níveis urinários diminuídos de magnésio e estudos em animais não revelaram benefício na suplementação deste íon (WELSHMAN, S. G.; MCGEOWN, M. G., 1975).

Os glicosaminoglicanos são produtos da quebra enzimática dos proteoglicanos séricos. Aproximadamente 12 mg são excretados por dia, 65% deste total sob a forma de condroitinsulfato (KHAN, S. R., 1997). Os glicosaminoglicanos participam da formação da matriz orgânica dos cálculos urinários, principalmente através da incorporação de heparansulfato e ácido hialurônico (ROBERTS, S. D.; RESNICK, M. I., 1986). Em vários modelos de cristalização, através de medidas do potencial zeta, notou-se que os glicosaminoglicanos atuam bloqueando locais de crescimento dos cristais, inibindo portanto o crescimento e a agregação. Podem também prevenir a adesão dos cristais às células uroteliais (DUSSOL, B.; BERLAND, Y., 1998; SHIRANE, Y. et al., 1995). Alguns estudos reportaram menor atividade inibitória e uma capacidade aumentada de promover nucleação dos glicosaminoglicanos isolados da urina de pacientes portadores de nefrolitíase (SHUM, D. K. Y.; GOHEL, M. D. I., 1993).

Descrita por NAKAGAWA, Y. et al. (1981), na Universidade de Chicago, a nefrocalcina é um poderoso inibidor da nucleação, crescimento, agregação e adesão de cristais de oxalato de cálcio. É uma glicoproteína urinária com peso molecular monomérico de 14 KDa. Possui tendência de se auto-agregar, formando polímeros com pesos moleculares de até 68 KDa (NAKAGAWA, Y. et al. 1983). A nefrocalcina é secretada pelo túbulo proximal e por células do segmento espesso ascendente da alça de Henle, em quantidades que variam de 5 a 16 mg por dia (NAKAGAWA, Y. et al., 1985; NAKAGAWA, Y.; NETZER, M.; COE, F.L., 1990). Em torno de 10% do seu peso

monomérico é constituído por carboidratos. Uma molécula de nefrocalcina liga-se a até 4 mol de cálcio e seu modo de ligação difere completamente das outras proteínas ligadoras de cálcio. É rica em ácido glutâmico e aspártico e contém dois ou três resíduos de ácido gama-carboxiglutâmico (COE, F. L. et al., 1994). Curiosamente, a nefrocalcina isolada da urina de portadores de nefrolitíase e do interior de cálculos renais é deficiente em ácido glutâmico e possui uma menor atividade inibitória. A nefrocalcina obtida da urina de homens e mulheres saudáveis, ao passar por uma coluna de troca aniônica, apresenta quatro picos de atividade inibitória, de diferentes forças iônicas. Estas frações são designadas de A, B, C e D. A fração D não possui ácido glutâmico e apresenta proporcionalmente a menor atividade inibitória (COE, F. L.; PARKS, J. H.; NAKAGAWA, Y., 1991). Em pacientes selecionados, portadores de nefrolitíase recorrente, nota-se ausência de ácido glutâmico em todas as quatro frações isoladas e conseqüentemente menor inibição da cristalização (NAKAGAWA, Y. et al., 1987). A contribuição da nefrocalcina para a atividade inibitória urinária total varia entre os diversos estudos, de 16 a 90% (NAKAGAWA, Y. et al. 1983; WORCESTER, E. N. et al., 1988).

A uropontina é muito semelhante à osteopontina, a fosfoproteína óssea que se liga à matriz do osso em formação. Possui peso molecular estimado de 44 a 75 KDa, dependendo da porcentagem de gel de poliacrilamida utilizado (KHAN, S. R., 1997).

Esta migração anômala parece ser devida a diferenças na sua glicosilação e fosforilação. É uma proteína rica em ácido aspártico e glutâmico e possui 16,6% de seu peso constituído por carboidratos (CHALKO, C. et al., 1992). Técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* demonstraram presença de uropontina no segmento fino e espesso ascendente da alça de Henle, no túbulo contornado distal e na mácula densa. A expressão de seu RNA mensageiro é aumentada na gravidez e em rins de ratos portadores de nefrolitíase (HOYER, J. R., 1994). A excreção urinária média, em indivíduos normais, é de 2,4 a 3,7 mg por dia. Esta quantidade varia inversamente com o volume urinário e não é afetada pela excreção urinária de cálcio (MIN, W. et al.,

1998). Vários estudos demonstraram que a uropontina inibe a nucleação heterogênea e também a agregação de cristais de oxalato de cálcio, em quantidades normalmente presentes na urina humana (ASPLIN, J. R. et al., 1995; ASPLIN, J. R. et al., 1998). Recentemente foi notado o papel inibitório da uropontina na adesão de cristais de oxalato de cálcio, quando utilizadas células epiteliais renais em cultura (DUSSOL, B.; BERLAND, Y., 1996; LIESKE J. C. et al., 1997). Até o momento, desconhecem-se anormalidades estruturais na uropontina excretada por formadores de cálculos renais.

Inicialmente denominada de proteína rica em ácido urônico, a bikunina é um fragmento do inibidor inter- α -tripsina (ATMANI, F. et al., 1993). Este é uma proteína plasmática, com peso molecular de 220 KDa, membro da superfamília dos inibidores de protease tipo Kunitz. O inibidor inter- α -tripsina consiste de três cadeias: duas cadeias pesadas e uma leve, de 45 KDa, que é a bikunina (SALIER, J. P., 1990). É sintetizado no fígado e alcança o plasma por secreção. Pode então sofrer ação enzimática, liberando seus componentes (KOBAYASHI, H. et al., 1998). No rim, está presente apenas nos túbulos proximais. O inibidor inter- α -tripsina é excretado normalmente na urina em concentrações que variam de dois a dez mg/dia. Entretanto, em certas situações patológicas, este valor pode aumentar até 50 a 100 vezes. As três cadeias do inibidor inter- α -tripsina foram detectadas na urina e na matrix de cálculos urinários. Porém, apenas a bikunina apresenta capacidade de inibir a cristalização do oxalato de cálcio (DAWSON, C. J.; GROVER, P. K.; RYALL, R. L., 1998). Além disto, a bikunina isolada de portadores de nefrolitíase contém menos ácido siálico e exibe menor atividade inibitória do que a purificada de indivíduos sadios (ATMANI, F. et al., 1994).

Analisando proteínas incorporadas na matriz orgânica de cristais formados experimentalmente na urina humana, STAPLETON, A. M. F. et al. (1993) notaram a presença de uma proteína de 31 KDa, que foi denominada de proteína da matriz do cristal. Posteriormente, sua seqüência de aminoácidos mostrou identidade com àquela da protrombina. Já era conhecido que, na presença de diferentes fatores de ativação, a protrombina poderia sofrer clivagem, com liberação de fragmentos denominados F1 e

F1+2. Foi demonstrado então que a proteína da matriz do cristal era o fragmento F1 da protrombina (STAPLETON, A. M. F. et al., 1996). Apesar de ser excretada em pequena concentração na urina (em torno de 13,4 nM/dia), apresenta atividade inibitória do crescimento e agregação de cristais (BEZEAUD, A.; GUILLIN, M. C., 1984). O fragmento urinário da protrombina contém 154 aminoácidos, dos quais 23% são ácido glutâmico e aspártico. Ocasionalmente inibição da agregação de partículas microcristalinas, que é diretamente proporcional à quantidade de ácido glutâmico (STAPLETON, A. M. F.; RYALL, R. L., 1994). Ressaltando sua importância na patogênese da nefrolitíase, notou-se que a excreção urinária do fragmento urinário da protrombina aumenta significativamente em portadores de cálculo urinário quando comparada a controles sadios (STAPLETON, A. M. F. et al., 1993).

1.7 PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL

Conforme citação, em 1895 Morner descreveu uma substância com características auto-agregantes, semelhantes àquelas que posteriormente foram identificadas na proteína de Tamm-Horsfall, que batizou de uromucóide (KOKOT, F.; DULAWA, J., 2000). Em 1950, Igor Tamm e Frank L. Horsfall Jr., trabalhando no Instituto Rockefeller em Nova York, separaram e caracterizaram uma proteína presente na urina, capaz de inibir a hemaglutinação viral. Foram estudados o vírus da influenza, caxumba e o relacionado à doença de Newcastle. Os autores isolaram esta proteína na urina humana e de outros animais, como gatos, coelhos e porcos da Guiné. Em seu artigo pioneiro, caracterizaram o modo de purificação da proteína através da precipitação repetida com soluções hipertônicas de cloreto de sódio e posterior diálise em banhos de água destilada. Mais ainda, conceituaram-na como uma mucoproteína e estimaram sua excreção urinária em valores de até 17 mg/l (TAMM, I.; HORSFALL Jr., F. L., 1950). Uma década mais tarde, McQueen estabeleceu que a THP era o principal componente da matriz dos cilindros hialinos. Ele demonstrou quantidades até 50 vezes superiores de

THP em relação à albumina nos cilindros urinários de pacientes com síndrome nefrótica, através de estudos bioquímicos e de microscopia imunofluorescente (McQUEEN, E. G., 1962).

Desde então, diversas propriedades têm sido atribuídas à THP. Destacam-se uma atividade reguladora de citocinas intra-renais e a participação no desenvolvimento de doença renal túbulo-intersticial (THOMAS, D. B. et al., 1993). Sugere-se ainda que, por sua capacidade de agregação e formação de gel, a THP seria responsável pela impermeabilidade à água do segmento espesso ascendente da alça de Henle, local de sua secreção. A THP contribui também para a nefropatia do mieloma múltiplo, através de sua agregação em conjunto com a proteína de Bence-Jones (HUANG, Z-Q.; SANDERS, P. W., 1997; YING, W-Z.; SANDERS, P. W., 1998). É postulado que a THP poderia funcionar como um sistema de defesa das células uroteliais contra infecções bacterianas. Isto se daria pela formação de um gel protetor e conseqüente aprisionamento de bactérias, como a *Escherichia coli* por exemplo (DULAWA, J. et al., 1988).

Bioquimicamente, a THP pode se apresentar em uma forma agregada, formando polímeros, com peso molecular de até 7 milhões de dáltons. Monômeros da proteína, dissociados por vários agentes, possuem peso molecular de 80 KDa (MALAGOLINI, N.; CAVALLONE, D.; SERAFINI-CESSI, F., 1997). Aminoácidos de caráter ácido predominam em sua composição, principalmente resíduos de cistina, conferindo à THP um ponto isoelétrico baixo, em torno de 3,5. Portadores de doença litiásica recorrente apresentam valores diferentes, com pontos isoelétricos variando de 4,5 a 6, fato este que pode ter significância clínica (SCHNIERLE P.; HERING, F.; SEILER, H., 1996). A THP isolada da urina de diferentes espécies animais, como o homem, coelho, *hamster* e rato, mantém composição aminoácida constante, quando analisada sob as mesmas condições laboratoriais (HOYER, J.R.; SEILER, M.W., 1979; GOKHALE, J.A.; GLENTON, P.A.; KHAN, S .R., 1997).

Cerca de 30% do peso molecular da THP é constituído por carboidratos, sendo portanto classificada como uma glicoproteína (FLETCHER, A. P.; NEUBERGER, A.;

RATCLIFFE, W. A., 1970). Diferentemente dos aminoácidos, os carboidratos variam bastante de espécie para espécie. Por exemplo, a inibição da hemaglutinação viral causada pela THP humana é relacionada ao seu conteúdo de ácido siálico (em torno de 5% do total de carboidratos). A THP isolada da urina de *hamster* não possui este carboidrato e àquela isolada da urina de coelhos possui o ácido siálico O-acetilado, o que não confere propriedades inibitórias da hemaglutinação viral a estas duas espécies (HOYER, J.R.; SEILER, M. W., 1979). A THP da maioria da população caucasiana apresenta uma estrutura denominada de antígeno Sd. Este consiste em um complexo de resíduos de carboidratos do tipo galactosamina, N-acetilados, ligados através de junções beta, também encontrado em eritrócitos. Aproximadamente 90% dos oligossacarídeos presentes na THP humana consistem de cadeias de ácido siálico tri e tetra antenárias. Várias evidências também confirmam a presença de cadeias ricas em manose não processada como constituintes da porção glicídica da THP. Estas cadeias possuem como estrutura geral a seqüência: dupla N-acetil-galactosamina – d – manose (KUMAR, S.; MUCHMORE, A., 1990).

A distribuição da THP no organismo humano é exclusivamente renal. Dentro do rim, é localizada especificamente nas células epiteliais do segmento espesso ascendente da alça de Henle e na porção mais proximal do túbulo contornado distal. Utilizando-se microscopia eletrônica é possível detectar a THP na face luminal e basolateral da membrana celular, nas membranas do aparelho de Golgi e no retículo endoplasmático (KUMAR, S.; MUCHMORE, A., 1990). Estudos ontogenéticos indicam que a presença da THP é intimamente relacionada com o desenvolvimento e maturação funcional da alça de Henle (HOYER, J. R. et al., 1974). Um fato de importância fisiológica é a ausência de THP na região da mácula densa, vizinha ao segmento espesso da alça de Henle. Isto permite o livre funcionamento do mecanismo de retroalimentação túbulo-glomerular, que é baseado na exposição à concentração eletrolítica do fluido tubular (YING, W-Z.; SANDERS, P. W., 1998).

A THP é a proteína com maior concentração na urina humana. Sua excreção varia de 20 a 100 mg/dia, dependendo do volume urinário. A excreção urinária

representa em parte a solubilização da THP presente nas membranas luminais dos túbulos renais (BROWN, D.; WANECK, G. L., 1992; KHAN, S. R., 1997).

A participação da THP na doença litíásica começou a ser delineada com os trabalhos de BOYCE, W.H.; GARVEY, F. K.; NORFLEET, C. M., 1954. Estes autores demonstraram que a ligação de íons de cálcio às mucoproteínas, dentre as quais a THP, resultava na precipitação de um complexo que cristalizava íons presentes em solução. A partir destes resultados, formularam uma hipótese segundo a qual a THP seria o núcleo inicial na formação de cálculos no interior do aparelho urinário. Estudos subseqüentes corroboraram esta afirmação (HALLSON, P. C.; ROSE, G. A., 1979; ROSE, G. A.; SULAIMAN, S., 1982).

Entretanto, quando se analisa mais detalhadamente a metodologia utilizada, verifica-se que todos estes estudos iniciais utilizaram urina humana ultrafiltrada e concentrada através de evaporação. Sabendo-se que fatores como pH, força iônica e o aumento de sua própria concentração podem favorecer a auto-agregação (formação de gel), é possível que estes resultados tenham sido influenciados pela floculação causada pela evaporação e não tenham refletido necessariamente a ação fisiológica da THP (GROVER, P. K.; RYALL, R. L.; MARSHALL, V. R., 1990).

De fato, nas décadas seguintes, diferentes trabalhos em diversas condições de experimentação evidenciaram o papel da THP como uma glicoproteína de predominante ação inibitória no processo de cristalização urinária.

KITAMURA, T.; PAK, C. Y. C. (1982) utilizando THP em concentração de 50 mg/l em uma solução de pH 6,5, força iônica de 0,15 e cálcio a 1 mM, observaram inibição da nucleação de microcristais adicionando-se quantidades crescentes de oxalato. Entretanto, ao se diminuir o pH da solução para 6, mesmo mantendo-se as demais condições, a THP passava a acelerar o processo de nucleação.

O efeito inibitório sobre o crescimento de cristais parece ser pouco significativo. Em experimentos com cristais pré-formados de oxalato de cálcio e solução com pH de 6,5, força iônica de 0,15 e concentração de cálcio e oxalato de 0,44 mM, 50 mg/l de THP inibiu o crescimento em 38%. Porém, ao se diminuir o pH

para 6 e aumentar a concentração de cálcio da solução para 1 mM, a taxa de inibição de crescimento destes cristais pré-formados era de apenas 3%, mesmo diminuindo-se a concentração de oxalato para 0,2 mM (HESS, B., 1994).

Vários estudos avaliaram o efeito da THP no processo de agregação de cristais de oxalato de cálcio. HESS, B.; NAKAGAWA, Y.; COE, F. L. (1989) utilizaram um sistema espectrofotométrico, que permitia medidas de DO contínuas ao longo tempo e que excluía a possibilidade de nucleação e crescimento concomitante de cristais pré-formados. Em uma solução contendo 40 mg/l de THP, pH de 7,2, força iônica de 0,21 e concentrações de cálcio e oxalato de 0,14 mM, relataram 90% de inibição da agregação de cristais monohidratados de oxalato de cálcio. Estes mesmos autores estudaram a THP isolada da urina de portadores de doença litiásica grave e recorrente. Notaram que a THP dos pacientes apresentava tendência exagerada à auto-agregação em diferentes arranjos moleculares, conforme mensurações de viscosidade, cromatografia de filtração por gel e centrifugação de equilíbrio. O peso molecular da THP isolada dos pacientes era quase o dobro daquele obtido de indivíduos normais. Esta diferença da THP mostrou ser apenas de caráter qualitativo, já que não houve diferença entre a quantidade da proteína excretada diariamente entre controles e portadores de nefrolitíase (HESS, B. et al., 1991).

Entretanto, KOKOT, F.; DULAWA, J. (2000) relataram taxas de excreção da THP que variavam com a excreção renal de cálcio. Portadores de doença litiásica, em atividade formadora de cálculos ou não, apresentaram concentração da THP aumentada na urina. Porém, após sobrecarga oral de cálcio, ambos os grupos diminuíram significativamente estes valores. Nos pacientes com doença ativa, a excreção urinária da THP correlacionou-se positivamente com a calciúria e fosfatúria. Nos pacientes com doença litiásica quiescente, houve correlação significativa apenas com a excreção urinária de magnésio.

1.8 UROMODULINA

Em 1985, Andrew V. Muchmore e Jean M. Decker iniciaram protocolo de pesquisa visando detectar proteínas com atividade imunossupressora na urina de mulheres grávidas. Utilizaram amostras de urina de gestantes entre a vigésima e a quadragésima semana de gestação. Volumes de até seis litros, de doadoras individuais, foram processadas através de colunas de concavalina A – sefarose. Após processo de purificação, obtiveram uma glicoproteína de 85 KDa. Demonstraram então que esta proteína possuía capacidade de inibir a proliferação de linfócitos T e monócitos induzida por antígenos, como o toxóide tetânico e a fitohemaglutinina, em concentrações de 10^{-9} a 10^{-11} M. Por sua fonte de isolamento e atividade moduladora da resposta imune *in vitro*, denominaram-na de uromodulina (UM) (MUCHMORE, A. V.; DECKER, J. M., 1985).

Trabalhos subseqüentes, dos mesmos autores, relataram propriedades adicionais da UM. Foi descrita capacidade de ligação à interleucina 1, interleucina 2 e fator de necrose tumoral, através de sua porção glicídica. Estes oligossacarídeos foram caracterizados como ricos em manose (MUCHMORE, A. V.; DECKER, J. M., 1986; MUCHMORE, A. V.; DECKER, J. M., 1987; SHERBLUM, A. et al., 1989). A proteína purificada apresentava 30% de carboidratos em sua composição, tendência para formar agregados e pontes dissulfídicas no interior da molécula.

Em 1987, dois laboratórios independentes identificaram a THP e UM como sendo proteínas idênticas (PENNICA, D. et al., 1987; HESSION, C. et al, 1987). Pennica e colaboradores isolaram e caracterizaram a UM utilizando clones genômicos e DNA complementar. A seqüência de aminoácidos, codificada por um dos éxons do gene da uromodulina, mostrou homologia com o receptor da lipoproteína de baixa densidade, com o precursor do fator de crescimento epidérmico e com a própria THP. Técnica de hibridização por *Northern* demonstrou que a UM é sintetizada nos rins. Baseando-se apenas na seqüência e identidade dos aminoácidos, concluíram pela homologia das

duas proteínas. Porém, os autores não relataram se a composição dos carboidratos destas glicoproteínas era a mesma e se havia semelhança de função entre as duas.

MUCHMORE, A. V.; SHIFRIN, S.; DECKER, J. M. (1987) como haviam feito Pennica e colaboradores, também foram capazes de isolar a UM de urina de mulheres não grávidas. Entretanto, descreveram que a UM isolada da urina de gestantes, pelo método da concavalina A, foi consideravelmente mais potente na inibição da proliferação de células T induzidas por antígeno quando comparada com a THP isolada da urina de mulheres não grávidas (HESSION, C. et al., 1987). Não existe consenso se os resultados são explicados pela glicosilação diferente da THP e UM ou se são devidos aos métodos diferentes de purificação, a saber concavalina A e precipitação pelo sal (KUMAR, S., 1998).

SU, S-J. et al. (1997) estudaram os efeitos da UM e THP na produção de fator de necrose tumoral alfa e fator tissular por monócitos humanos. Utilizaram urina de gestantes de 30 a 35 semanas como fonte de UM e urina de mulheres não grávidas para isolar a THP. O método de purificação foi o mesmo para ambas glicoproteínas. Demonstraram que tanto a THP como a UM induziram monócitos a secretar fator de necrose tumoral alfa *in vitro*. Entretanto, apenas a UM foi capaz de manter esta propriedade *in vivo*. Desde que a única distinção entre a UM e a THP reside na glicosilação, afirmam ser lógico acreditar que o comportamento biológico diverso seja explicado pela diferença entre os carboidratos de ambas as proteínas. Conclui-se que, em circunstâncias como infecções do trato urinário, trauma, tumor e nefrolitíase, a UM e THP poderiam ativar monócitos e subseqüentemente iniciar a resposta inflamatória e ativar a cascata de coagulação.

Utilizando urina de 18 mulheres não grávidas e 12 gestantes normais para purificar THP e UM, respectivamente, OLCZAK, T. et al. (1998) estudaram a composição global dos monossacarídeos e realizaram testes diferenciais de reatividade com lecitinas, citoquinas e proteínas séricas. Relataram não haver diferença entre a THP e UM no conteúdo de monossacarídeos, bem como na reatividade as várias substâncias testadas. Afirmam que ambas as proteínas são idênticas ou muito similares. No

entanto, como não analisaram resíduos oligossacarídeos específicos, é possível conjecturar que a UM de gestantes apresente glicosilação distinta, sem causar mudança na composição monossacarídica geral.

Em um comentário editorial, KUMAR, S. (1998) afirma que mais trabalhos são necessários para definir se existe glicosilação diferencial da UM e THP durante a gravidez. E mais ainda, se diferenças nos métodos de purificação podem ser responsáveis por diferentes comportamentos biológicos entre as duas proteínas.

2 OBJETIVO

Determinar a função da proteína de Tamm-Horsfall e da uromodulina na cristalização do oxalato de cálcio em um grupo selecionado de portadores de nefrolitíase, grupo de homens e de mulheres normais e de gestantes no primeiro trimestre de gravidez.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram selecionados dez pacientes do sexo masculino, denominados de grupo nefrolitíase, com média de idade de $38,5 \pm 1,03$ anos, provenientes do Ambulatório de Nefrolitíase da Universidade de Chicago, Illinois, EUA. Todos apresentaram pelo menos um cálculo renal, composto por 50% ou mais de oxalato de cálcio, sem a presença de cistina ou estruvita, em um período de avaliação pré-estudo de um ano. Estes pacientes foram classificados como portadores de nefrolitíase idiopática, ou seja, não possuíam anormalidades urológicas; hiperparatireoidismo primário ou outras causas de hipercalcemia; rim de medular esponjosa; doenças gastrintestinais; sarcoidose; gota ou outras causas de hiperuricemia; acidose tubular renal ou drogas que pudessem causar nefrolitíase.

Dez homens, denominados de grupo homens normais, com média de idade de $39,3 \pm 2,72$ anos, cinco mulheres normais (grupo mulheres normais), com média de idade de $37,2 \pm 1,92$ e cinco gestantes (grupo gestantes) com $37,3 \pm 0,97$ anos, no primeiro trimestre de gestação, foram também estudados. Não possuíam antecedentes pessoais de cálculos, nem história familiar de nefrolitíase ou outra doença renal qualquer.

3.2 COLETA DE URINA

Foram colhidas três amostras de urina de 24 horas de todos os participantes do estudo. As urinas foram mantidas sem refrigeração e utilizou-se timol como conservante. Foram dosados cálcio, creatinina, fosfato, sódio, potássio, magnésio e ácido úrico, por técnica convencional automatizada de laboratório utilizando-se um aparelho Beckman Synchron CX5 (Beckman Instruments, Brea, EUA) do Laboratório de Pesquisa em Nefrologia da Universidade de Chicago. O oxalato foi medido pela técnica

da oxalato oxidase (Sigma Diagnostics, Saint Louis, EUA) e o citrato pela enzima citrato liase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha). Também foram determinados o pH e o volume urinário de cada amostra. Utilizou-se a média das três amostras como valor final. Os valores de referência utilizados foram: cálcio – 100 a 300 mg/dia; oxalato – 20 a 45 mg/dia; citrato – 500 a 750 mg/dia; ácido úrico – 600 a 800 mg/dia; magnésio – 50 a 150 mg/dia; fósforo – 500 a 1500 mg/dia; creatinina – 1000 a 2000 mg/dia; sódio – 50 a 150 mEq/dia; potássio – 20 a 100; volume – maior que 1,5 litro; pH – 5,8 a 6,2.

3.3 ANÁLISE DOS CÁLCULOS RENAIIS ELIMINADOS

Os cálculos eliminados e recuperados pelos pacientes foram analisados pela técnica de espectrofotometria infravermelha (Beck Analytical Services, Indianapolis, EUA). Todos possuíam mais de 50% de oxalato de cálcio em sua composição.

3.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E UROMODULINA

Ambas as proteínas foram isoladas de amostras individuais de urina de 24 horas. A THP foi obtida adicionando-se cloreto de sódio à urina até obter-se concentração de 580 mmol/l. Para prevenir crescimento bacteriano, azido de sódio foi acrescentado em uma concentração final de 0,025%. A solução resultante foi mantida à temperatura de 4°C e agitada constantemente por um período de 12 horas. A seguir, procedeu-se à centrifugação com 10.000 rpm por 30 minutos à 4°C. O precipitado resultante foi lavado com solução aquosa de cloreto de sódio a 580 mmol/l, dissolvido em 1/10 do volume original de água e dialisado contra 10 litros de água destilada por 12 horas. O processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais uma vez e a proteína foi novamente dissolvida em água e dialisada. O líquido viscoso e claro, remanescente da diálise, constituído pela THP, foi então submetido à liofilização para armazenagem a -20°C.

A uromodulina foi purificada pelo método descrito originalmente por MUCHMORE, A. V.; DECKER, J. M. (1985). A proteína obtida após precipitações repetidas pelo sal, como na técnica utilizada por TAMM, I; HORSFALL JR, F. L. (1950) foi dissolvida, vertida em coluna de afinidade sefarose – concavalina A e lavada várias vezes com solução tampão de fosfato de sódio (PBS). Posteriormente, a UM sofreu eluição com alfa-metil-manosídeo, em volume correspondente a três vezes o volume da coluna.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E UROMODULINA

A THP e UM purificadas foram separadas por eletroforese utilizando-se gel de poliacrilamida em SDS-PAGE a 10%, com tamanho de 16 x 11,5 x 1,5 mm. Seis microlitros de cada proteína foram dissolvidos em igual volume de solução tampão de 0,02 M Tris, 0,015 M glicina e 0,08% de SDS, com pH 8,8. Dez microlitros desta mistura, separadamente para cada proteína, foram aplicados a uma determinada linha do gel. A eletroforese foi realizada com 70 V por aproximadamente duas horas, com a solução tampão. A coloração empregada para a detecção das bandas proteicas foi a de nitrato de prata. Os padrões de massa molecular foram 28, 36, 48, 80 e 100 KDa (Sigma Chemical, Saint Louis, EUA).

Para identificação da THP e UM utilizou-se técnica de ensaio de imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) (WORCESTER, E. M. et al., 1988; HESS, B. et al., 1991). O ensaio foi realizado em placas de ELISA (Nunc Scientific Supply, IL, EUA), adicionando-se 100 µl de solução tampão, composta por borato 0,02 M com pH de 8,4, a 0,2 µg/ml de anticorpo monoclonal anti-THP/UM e incubados por uma noite a 4°C. Para bloquear ligações inespecíficas foi adicionada às placas solução de gelatina a 0,25%, dissolvida em PBS. Posteriormente, amostras de ambas proteínas foram acrescentadas, em cinco diluições seriadas. Após incubação, com duração de uma hora a 37°C, foi acrescentado um segundo anticorpo anti-THP/UM, obtido de coelho, marcado com peroxidase. As placas foram lavadas e incubadas com 100 µl de biotina-avidina. A conversão deste

substrato em composto colorimétrico foi feita com a adição de orto-fenilenediamina, dissolvida em tampão de citrato de sódio com pH de 4,2. A absorção óptica foi medida em um leitor de placas de ELISA na faixa de 450 nm.

3.6 ESPECTROMETRIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

A conformação de ambas proteínas foi medida por técnica de dicróismo circular (HESS, B. et al., 1991). A THP e UM foram dissolvidas em PBS a 0,05 M, com pH de 7,7. A região próxima da ultravioleta (250-320 nm) foi mensurada com uma cubeta de quartzo cilíndrica de 10 mm. Para região de 200 a 250 nm, foi utilizada uma cubeta de um milímetro. A intensidade dicróica circular foi calibrada com solução aquosa de ácido d-10-canforsulfônico a 0,06%. Todas as medidas foram feitas em duplicata. Os cálculos da elipsóide residual média ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) foram computados usando uma massa de resíduos média de 110 dáltons. Todas as medidas foram feitas utilizando-se um aparelho de dicroicografia modelo JASCO J-600 (Japan Spectroscopic, Tóquio, Japão).

3.7 ANÁLISE DE CARBOIDRATOS

O conteúdo de carboidratos foi analisado por cromatografia gasosa (Perkin-Elmer, modelo 910, com detector de ionização por chama). Os monossacarídeos foram obtidos por hidrólise ácida com ácido clorídrico dissolvido em metanol a 1 N, sob temperatura de 80°C por 24 horas. Posteriormente foram acetilados e trimetisilados. Áreas de pico foram medidas por integração eletrônica, com um analisador Sigma 10 (Perkin-Elmer Corp., EUA). Empregou-se o manitol como padrão interno de análise. O tempo de retenção e fator de resposta para cada monossacarídeo foi estabelecido utilizando-se fucose, glicose, galactose, manose, glicosamina, galactosamina, manosamina, ácido glicurônico e ácido N-acetilneuramínico (NAKAGAWA, Y. et al., 1985).

A reatividade à lecitina foi analisada por ELISA, de acordo com o método proposto por TURNER, G. A.; GOODARZI, M. T.; THOMPSON, S. (1995), utilizando-se colunas de adsorção revestidas com *Canavalia ensiformis* (Con A).

3.8 TÉCNICA DE CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO

Foi utilizado um sistema no qual a cristalização foi induzida por concentração fixa de oxalato e cálcio. Adicionou-se a uma placa de ELISA de 96 poços, 250 µl de uma solução composta por 4 mM de cloreto de cálcio, dissolvidos em 20 mmol de acetato de sódio com pH de 5,7 e 150 mmol de cloreto de sódio. A seguir, 50 µl da proteína a ser testada foi adicionada para obter-se uma concentração final de 1×10^{-6} M. Finalmente, a cristalização foi induzida por 25 µl de oxalato de sódio a 0,5 mM.

Todas as substâncias químicas foram obtidas em grau elevado de pureza. Antes de serem adicionadas às placas de ELISA, as soluções foram filtradas através de filtros de Millipore com 0,22 µm de diâmetro. Todos os ensaios foram realizados em um sistema de protocolo paralelo, em duplicata, no qual em uma única placa era possível medir o efeito da THP e UM em pequenos grupos de diferentes indivíduos. Todas as placas foram preparadas a temperatura constante de 37°C.

3.9 MEDIDAS DE CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO

A absorção ou DO de cada placa é proporcional à massa de cristais formados por unidade de volume e foi lida em comprimento de onda de 630 nm, usando um aparelho leitor Dynatech MicroElisa (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA, EUA). As medidas foram feitas em tempo zero, ou seja, antes da adição do oxalato de cálcio, 3 minutos após e a cada 20 minutos, por uma hora com agitação constante da placa a 500 rpm (HESS, B.; NAKAGAWA, Y.; COE, F. L., 1989).

A seguir, cada placa de ELISA foi examinada por um microscópio óptico de luz invertida para verificar a presença de cristais recém-formados. Então, o conteúdo de

cada poço da placa foi suspenso em 5 ml de uma solução eletrolítica composta por 300 mM de cloreto de sódio e 20 mM de acetato de sódio com pH de 5,7. Imediatamente, o número, volume total e a moda de distribuição da curva de volume dos cristais de oxalato de cálcio formados foram determinados utilizando-se um aparelho Coulter Counter Multisizer II (Coulter Electronics Ltda, Luton Beds, Inglaterra), com tubo capilar de 100 μm . Todas as contagens foram corrigidas por partículas pré-existentes, realizando-se contagens da solução eletrolítica, da solução eletrolítica e da proteína e subtraindo estes valores da contagem total obtida pós-cristalização. O aparelho Coulter foi calibrado e checado diariamente no início e no final de cada experimento, utilizando-se esférulas calibradas com diâmetro de 10,27 μm fornecidas pelo fabricante. O limiar de sensibilidade para a detecção de cristais foi de 2 μm .

3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A morfologia dos cristais formados foi estudada por microscopia eletrônica de varredura. Ao final dos experimentos, os cristais precipitados foram separados com filtro de 0,22 μm de porosidade e lavados com um mililitro de água destilada. Os cristais e o filtro foram mantidos em ar ambiente, em temperatura constante de 37°C até secarem completamente. A seguir, foram montados em lâmina de alumínio e cobertos com ouro por 180 segundos, até atingir espessura média de 10 nanômetros. As lâminas foram então examinadas utilizando-se um aparelho Hitachi S-800, com uma voltagem operacional de 15 Kv.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram colhidos em duplicata e relatados como média \pm desvio padrão da média ($\bar{x} \pm DP$). Comparações entre as amostras dos grupos em estudo foram feitas por testes *t* de Student e análise de variância univariada. A análise dos dados foi realizada com o uso de um programa estatístico padrão (Minitab 11.0, Minitab Inc., PA, EUA). A hipótese de nulidade foi rejeitada sempre que $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 BIOQUÍMICA URINÁRIA

Os valores da bioquímica urinária foram normais para todos os parâmetros estudados. A medida dos diversos eletrólitos urinários revelou apenas mínimas variações dentro da faixa de normalidade sem, entretanto, haver diferença significativa entre os grupos (quadro 3).

QUADRO 3 - BIOQUÍMICA URINÁRIA

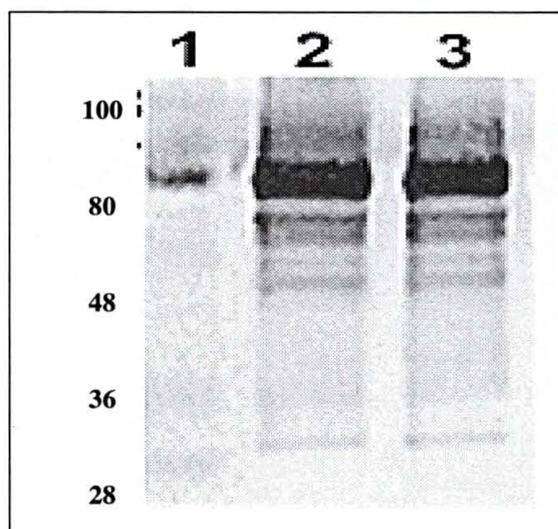
EXCREÇÃO URINÁRIA	GRUPO NEFROLITÍASE (n=10)	GRUPO HOMENS NORMAIS (n=10)	GRUPO MULHERES NORMAIS (n=5)	GRUPO GESTANTES (n=5)
Cálcio , mg/dia	238,2 ± 48,2	248,5 ± 38,6	241 ± 54,4	234 ± 50,9
Oxalato , mg/dia	36,3 ± 9,2	33,2 ± 5,4	32,2 ± 5,1	29,6 ± 7,6
Citrato , mg/dia	581,4 ± 52,2	603,5 ± 59,0	622,2 ± 65,3	644,4 ± 49,0
Ácido úrico , mg/dia	724,1 ± 95,2	688,3 ± 63,9	700,6 ± 70,4	693,8 ± 67,9
Magnésio , mg/dia	115,6 ± 39,3	106,3 ± 28,8	104 ± 25,6	99,2 ± 24,6
Fósforo , mg/dia	1034,7 ± 201,6	972,9 ± 211,1	913,2 ± 161,2	1017,4 ± 191,7
Creatinina , mg/dia	1640 ± 374	1510 ± 370	1332 ± 286	1259 ± 285
Sódio , mEq/dia	150,2 ± 37,2	125,8 ± 57,2	128,6 ± 36,7	120,8 ± 42,8
Potássio , mEq/dia	51,6 ± 8,6	61,5 ± 13,9	62,6 ± 24,6	64 ± 20,9
Volume urinário , litros/dia	1,9 ± 0,5	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2 ± 0,3
pH	6,16 ± 0,4	5,99 ± 0,4	6,01 ± 0,3	6,22 ± 0,7

NOTA: Valores expressos como $\bar{X} \pm DP$.

4.2 DETECÇÃO, CONFORMAÇÃO ESPACIAL, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E EXCREÇÃO DA PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL E UROMODULINA

A THP e a UM apareceram no gel como banda única, com massa molecular aproximada de 80 KDa, detectada pelo gel de SDS-PAGE e confirmada pela técnica de ELISA, com forte reação contra anticorpo anti-THP/UM, obtido de coelho (Biomedical Technologies, Stoughton, MA, EUA) (figura 2).

FIGURA 2 - THP E UM EM GEL DE SDS-PAGE



NOTAS: Bandas de peso molecular de 80 kilodáltons, aproximadamente.
Gel número 1- Controle; Gel número 2- Proteína de Tamm-Horsfall; Gel número 3- Uromodulina.

A conformação espacial de ambas proteínas medida pela espectrometria circular dicróica foi diferente. A UM revelou conter mais estrutura beta ($[\Theta]_{215 \text{ nm}} = 2700 \text{ graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) quando comparada com a THP ($[\Theta]_{215 \text{ nm}} = 2100 \text{ graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, $p < 0,01$).

O conteúdo total de carboidratos não variou entre as duas proteínas. Porém, a UM apresentou 30% mais resíduos de glicose e manose do que a THP em todos os grupos estudados. A Con-A reconheceu apenas a UM, provavelmente pela exposição de resíduos de manose causada pela clivagem de moléculas como Neu/GalNAc/GluNAc e GalNAc/GluNAc (NAKAGAWA, Y.; COE, F. L., 1997).

A excreção urinária da THP e UM não diferiu significativamente entre os grupos estudados, conforme demonstrado no quadro 4.

QUADRO 4 - EXCREÇÃO URINÁRIA DE THP E UM

PROTEÍNA (mg/dia)	GRUPO NEFROLITÍASE (n=10)	GRUPO HOMENS NORMAIS (n=10)	GRUPO MULHERES NORMAIS (n=5)	GRUPO GESTANTES (n=5)
THP	49 ± 1,1	51 ± 0,5	50,2 ± 1,9	52 ± 0,7
UM	49,3 ± 1,2	49,3 ± 2,2	50,8 ± 1,9	51,3 ± 2,7

NOTAS: Valores expressos como $\bar{X} \pm DP$.

Ausência de diferenças significativas entre os grupos (p=NS).

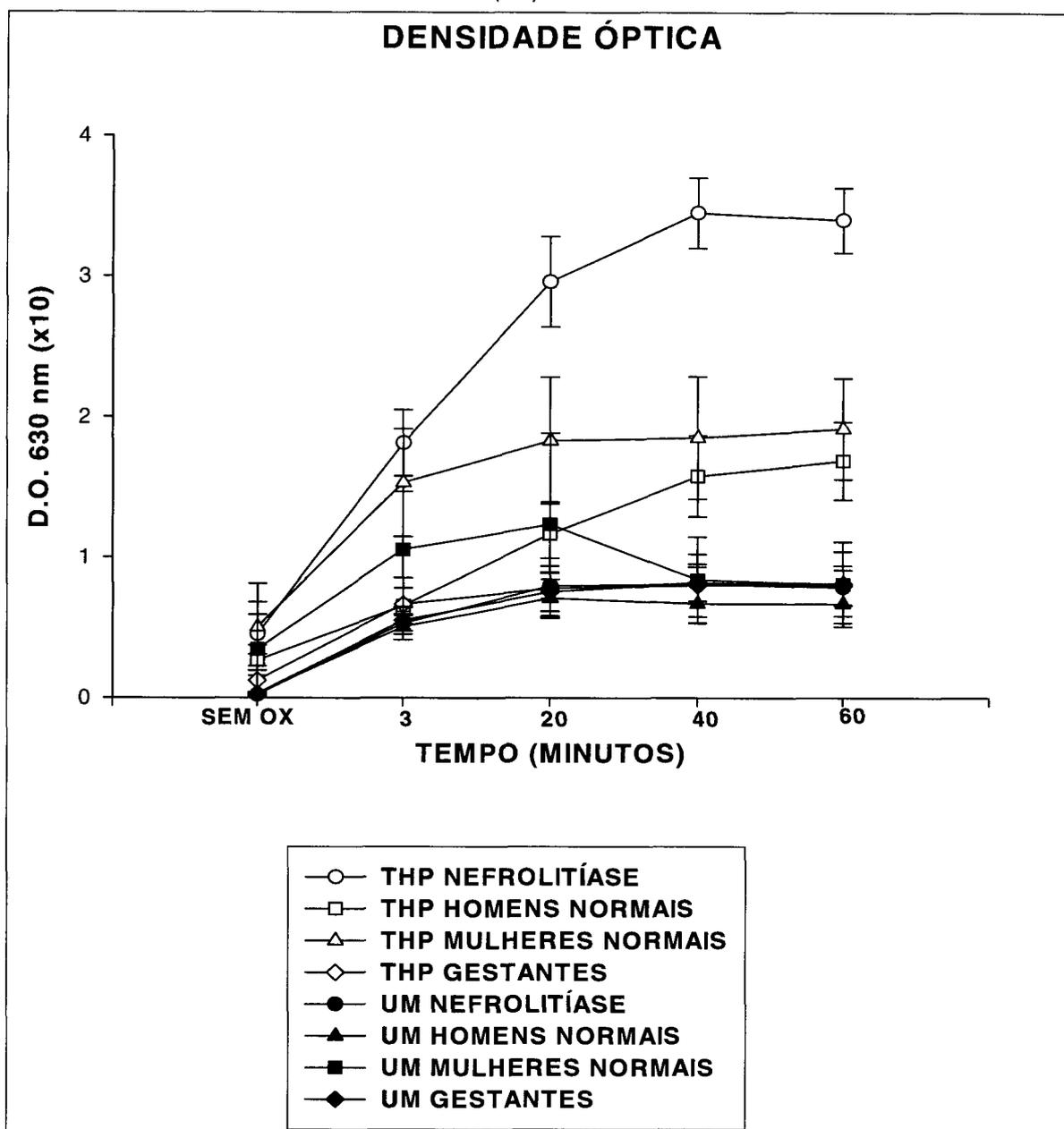
4.3 MEDIDAS DA DENSIDADE ÓPTICA

Foram realizadas mensurações seriadas da DO, conforme especificado pelo protocolo (figura 3). A THP do grupo nefrolitíase e do grupo das mulheres normais mostrou valores de DO um pouco acima dos outros grupos, porém de forma não significativa.

Após a indução com o oxalato de sódio, houve um aumento inicial acentuado da DO em todos os grupos, principalmente nos primeiros vinte minutos, refletindo geração acelerada de núcleos cristalinos. As curvas atingiram platô em torno de 40 minutos de observação para ambas as proteínas. Nas curvas da uromodulina, após este período, notou-se inclusive diminuição da DO (figura 3).

A curva da THP dos portadores de nefrolitíase foi significativamente diferente dos outros grupos aos 40 e 60 minutos ($p < 0,0001$ para todas as comparações) e também aos 3 e 20 minutos ($p < 0,01$), excetuando-se a curva da THP do grupo mulheres normais, onde não houve diferença. A THP deste último grupo também apresentou curva de DO com valores estatisticamente superiores aos da THP e da UM dos grupos de homens normais e gestantes ($p < 0,01$).

FIGURA 3 - CURVAS DE DENSIDADE ÓPTICA (DO)



NOTA: Mensurações obtidas em tempo zero (sem oxalato), 3, 20, 40 e 60 minutos pós adição de oxalato de cálcio. DO medida em 630 nm.

O quadro 5 mostra a DO de todos os grupos, medida com espectrofotômetro a 630 nm, obtida ao final do experimento (60 minutos).

QUADRO 5 - EFEITOS DA THP E UM NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO

MEDIDA	GRUPO NEFROLITÍASE (n=10)		GRUPO HOMENS NORMAIS (n=10)		GRUPO MULHERES NORMAIS (n=5)		GRUPO GESTANTES (n=5)	
	THP	UM	THP	UM	THP	UM	THP	UM
DO 630 nm ($\times 10^{-1}$)	3,40 \pm 0,23*	0,78 \pm 0,12	1,68 \pm 0,27	0,67 \pm 0,13	1,91 \pm 0,36 [#]	0,80 \pm 0,30	0,81 \pm 0,23	0,79 \pm 0,14
Número dos cristais ($\times 10^3$)	53,53 \pm 10,33*	8,76 \pm 1,24	11,05 \pm 2,10	6,19 \pm 0,77	20,02 \pm 5,81 [¶]	13,14 \pm 3,72	6,10 \pm 1,21	4,43 \pm 0,42
Volume total dos cristais ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	1,68 \pm 0,15	2,23 \pm 0,21*	1,22 \pm 0,15	1,26 \pm 0,10	1,51 \pm 0,17	1,63 \pm 0,12	1,24 \pm 0,19	1,21 \pm 0,12
Moda da curva de volume (μm)	5,64 \pm 0,55 [¶]	11,41 \pm 0,48	15,94 \pm 3,93	12,45 \pm 0,97	8,17 \pm 1,57	9,82 \pm 0,95	12,17 \pm 1,41	12,99 \pm 0,51

FONTE: Pesquisa de campo

NOTAS: Dados obtidos ao final do experimento (60 minutos).

$\bar{X} \pm \text{DP}$; * $p < 0,0001$, [¶] $p < 0,002$, [#] $p < 0,01$ comparado com os outros grupos.

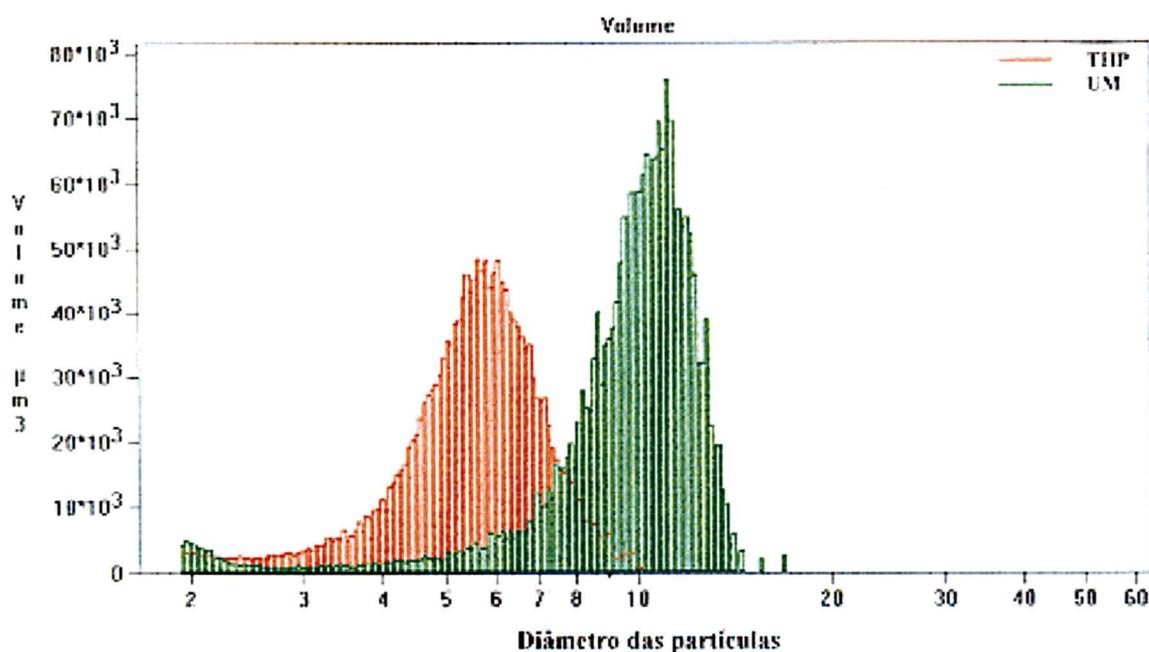
4.4 DADOS DE CRISTALIZAÇÃO

As medidas de cristalização, obtidas com o aparelho Coulter, demonstraram que o número de partículas formado pela THP dos portadores de nefrolitíase foi significativamente maior que os demais grupos estudados ($p < 0,0001$, quadro 5). Entretanto, a THP deste mesmo grupo reduziu o diâmetro dos cristais formados, quando analisados pela moda da curva de distribuição de volume, em comparação a THP e UM dos homens, mulheres e gestantes estudados ($p < 0,002$, quadro 5).

A uromodulina produziu menos partículas do que a proteína de Tamm-Horsfall em todos os grupos (quadro 5). Entretanto, o volume total dos cristais produzidos pela UM foi maior que o da THP no grupo dos homens e mulheres normais, sendo menor apenas nas gestantes. Mais ainda, o volume total foi significativamente diferente no grupo nefrolitíase ($2,23 \pm 0,21$ para UM *versus* $1,68 \pm 0,15 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ da THP dos formadores de cálculo, $p < 0,05$) e significativamente maior quando comparada com o volume dos cristais produzidos pela UM dos outros grupos ($p < 0,0001$ para todas as comparações, quadro 5).

A figura 4 ilustra graficamente as relações entre volume total e diâmetro das partículas formadas no grupo de pacientes com nefrolitíase. Em relação ao diâmetro, a moda da curva da THP situou-se em $5,64 \pm 0,55 \mu\text{m}$ *versus* $11,41 \pm 0,48 \mu\text{m}$ da UM ($p < 0,0001$). O volume total dos cristais, representado pela área sob as curvas, foi significativamente maior na presença de UM ($p < 0,05$).

FIGURA 4 - CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DE VOLUME OBTIDA COM O APARELHO COULTER



4.5 MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA

O efeito da THP na cristalização do oxalato de cálcio no grupo de homens normais e no grupo nefrolitíase, analisado por microscopia óptica, está representado nas figuras 5 e 6, respectivamente. Quando comparado com o grupo de homens normais, a THP dos pacientes estudados permitiu a formação de um número maior de cristais, com diâmetro reduzido, mantendo a morfologia de oxalato de cálcio mono e diidratado. O mesmo efeito pode ser observado à microscopia eletrônica (figuras 7 e 8).

FIGURA 5 - EFEITO DA THP DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES)

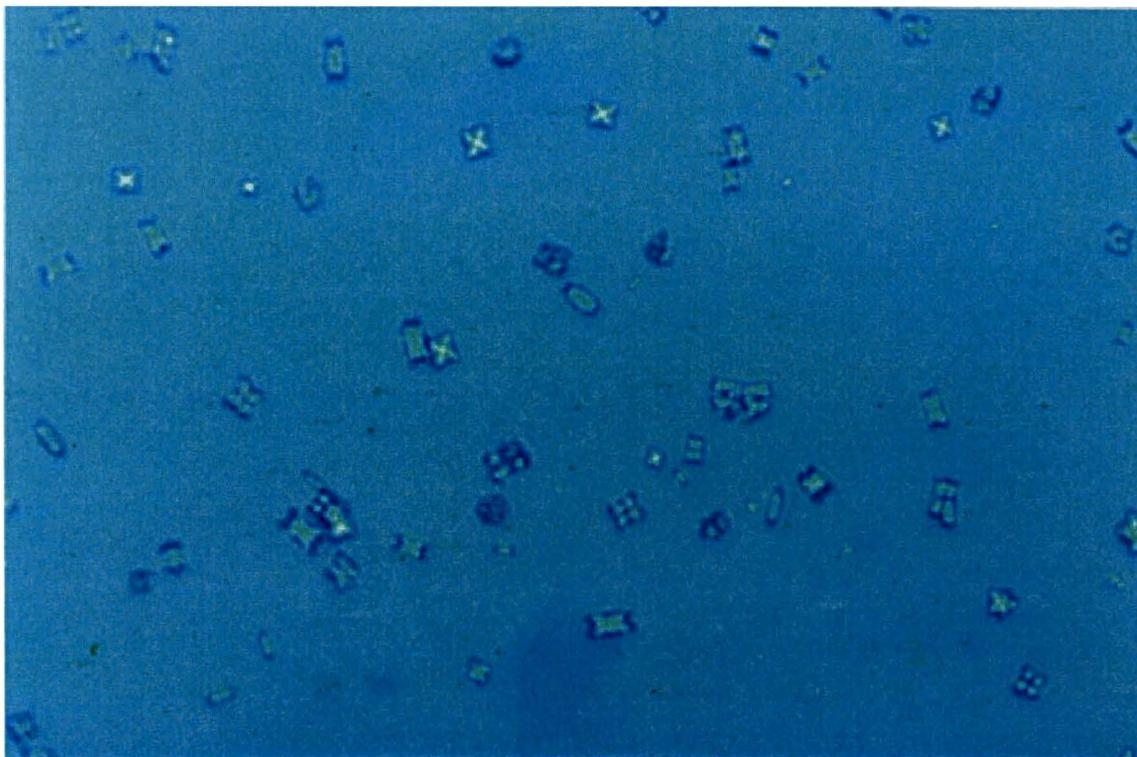


FIGURA 6 - EFEITO DA THP DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES)

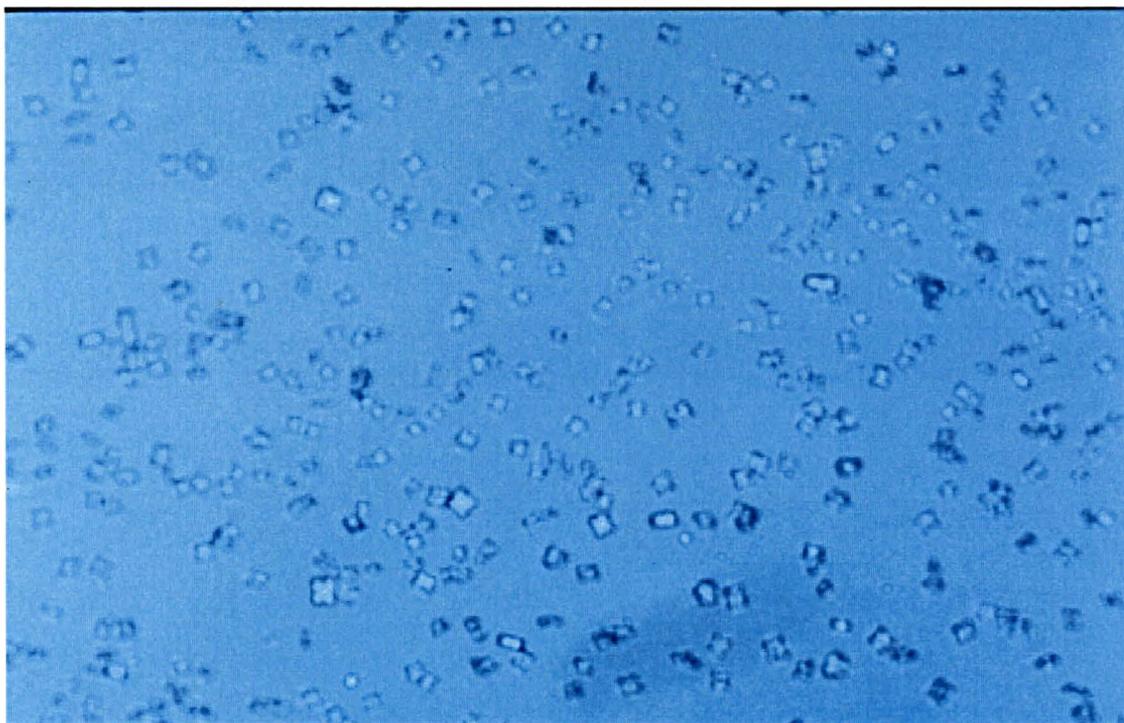


FIGURA 7 - EFEITO DA THP DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)

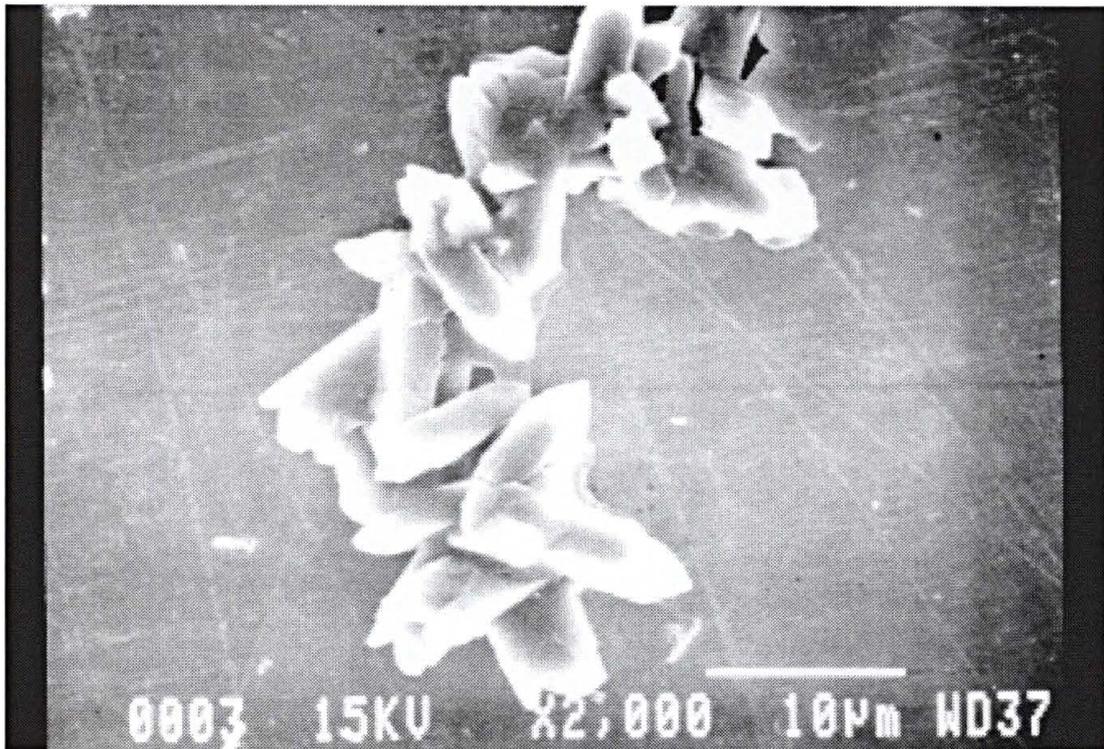
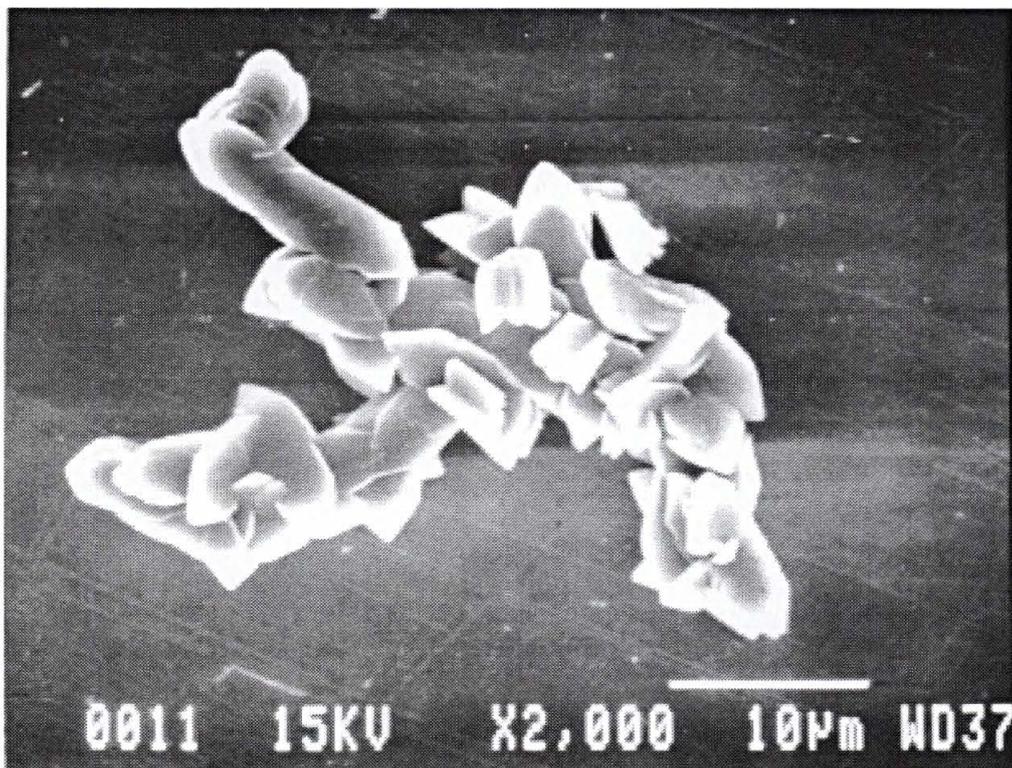


FIGURA 8 - EFEITO DA THP DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)



A UM do grupo de homens normais preservou em parte a morfologia característica dos cristais de oxalato de cálcio. Notaram-se também conjuntos de cristais agregados porém em menor número e volume do que os formados no grupo nefrolitíase. A figura 9 é um exemplo representativo do grupo de homens normais. A UM do grupo nefrolitíase induziu a formação de volumosos agregados cristalinos, com cristais em menor número e sem apresentar a morfologia característica de oxalato de cálcio mono e diidratado, conforme representado na figura 10.

FIGURA 9 - EFEITO DA UM DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES)

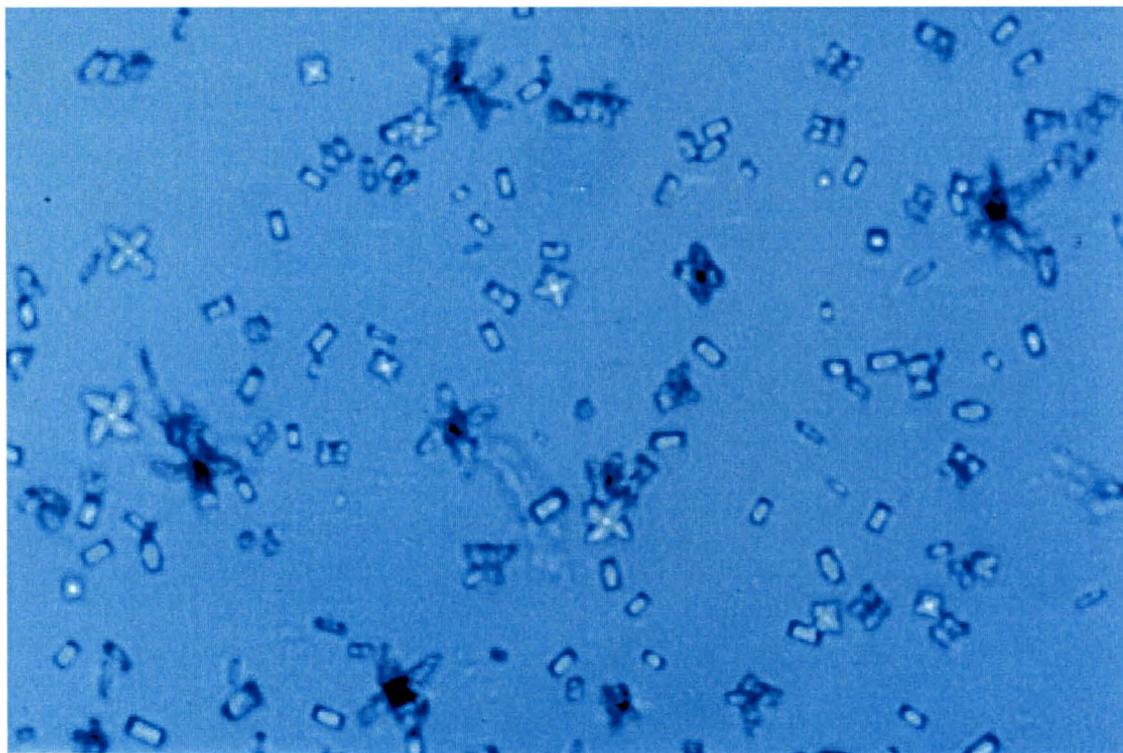
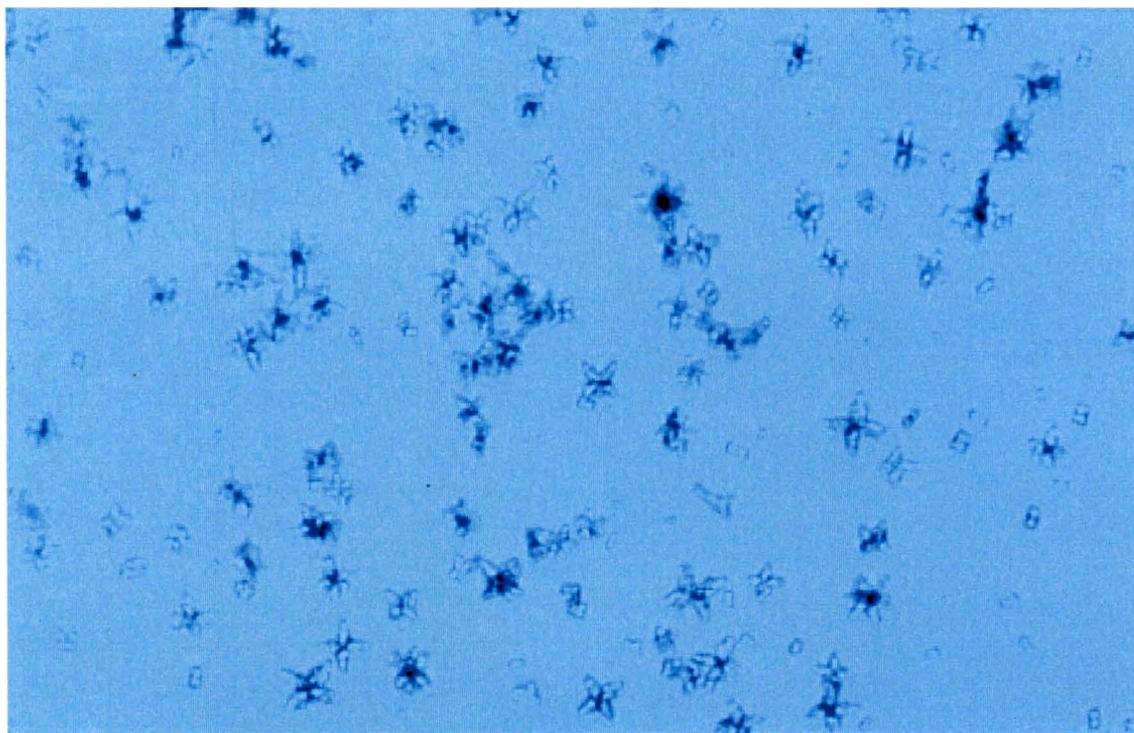


FIGURA 10 - EFEITO DA UM DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ÓPTICA 500 VEZES)



Na presença de UM houve formação de agregados cristalinos com morfologia variada e de grande volume. Estas alterações foram mais pronunciadas no grupo de pacientes com nefrolitíase. As figuras 11 e 12 são exemplos representativos do grupo de homens normais e do grupo nefrolitíase, respectivamente, quando analisados à microscopia eletrônica.

FIGURA 11 - EFEITO DA UM DO GRUPO DE HOMENS NORMAIS NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)

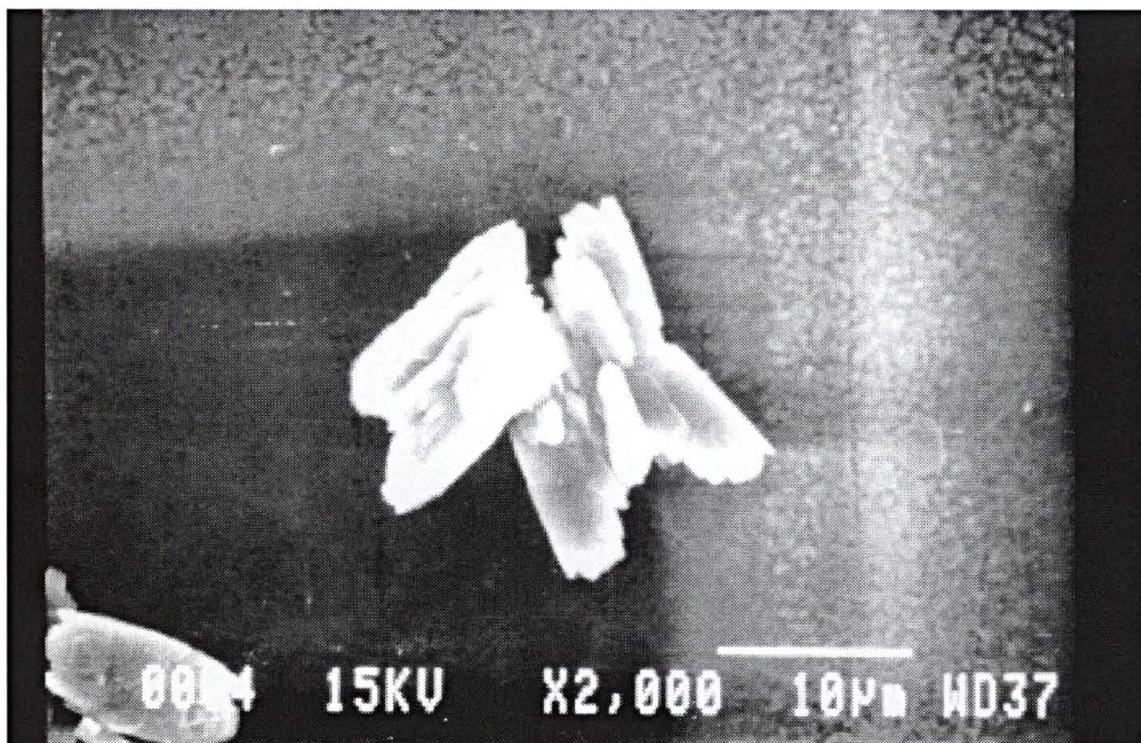
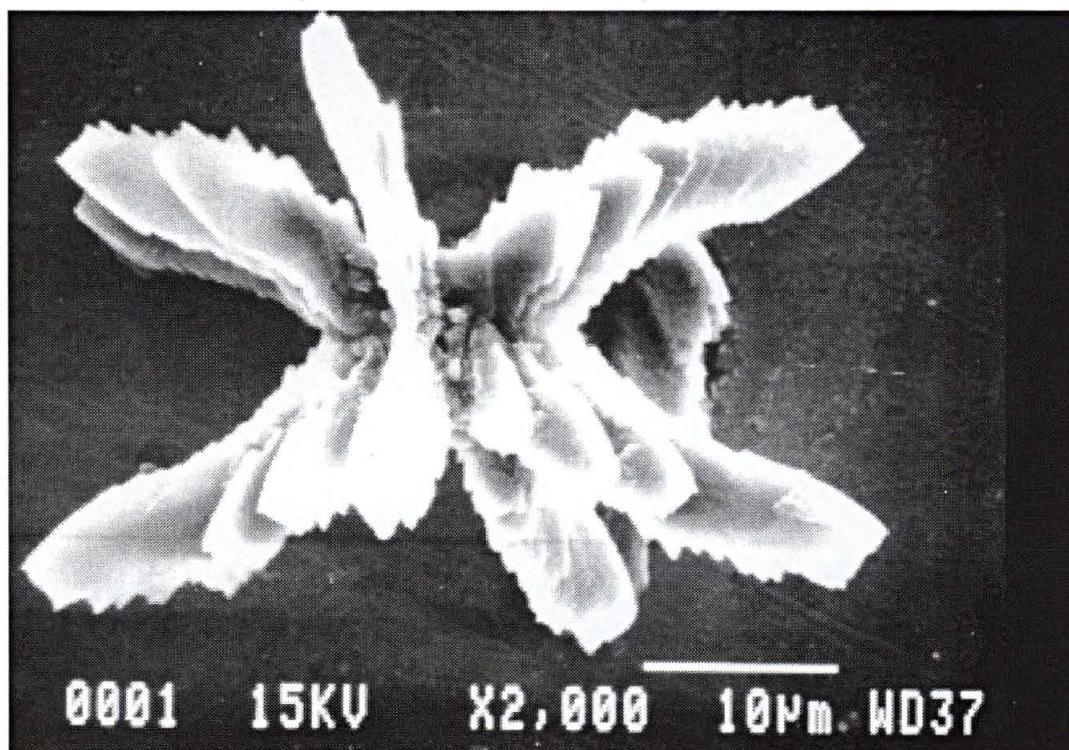


FIGURA 12 - EFEITO DA UM DO GRUPO NEFROLITÍASE NA CRISTALIZAÇÃO DO OXALATO DE CÁLCIO (MICROSCOPIA ELETRÔNICA)



5 DISCUSSÃO

Em torno de 20% dos pacientes formadores de cálculos de oxalato de cálcio não apresentam anormalidades bioquímicas ou baixo volume urinário. A ocorrência de defeitos na nucleação, crescimento ou agregação é mais freqüentemente observada nesta população (PAK, C. Y. C., 1987). Porém, os defeitos nem sempre se manifestam em conjunto, podendo haver alterações isoladas. Por exemplo, um estudo de 25 pacientes selecionados e com níveis normais de saturação urinária não detectou aumento do crescimento de cristais de oxalato de cálcio *in vitro*. Não foram excluídos, entretanto, déficits de nucleação e agregação e notou-se ainda aumento da excreção da THP (PORILE, J. L. et al., 1996).

Neste trabalho foram selecionados pacientes que não apresentavam anormalidades bioquímicas urinárias comumente associadas à litíase, como hipercalciúria, hiperoxalúria ou hipocitratúria. Conseqüentemente, não possuíam valores elevados de supersaturação urinária. Esta abordagem visou encontrar pacientes com defeitos em macromoléculas inibidoras da cristalização urinária, dentre as quais situam-se a THP e a UM.

Os resultados revelaram que a proteína de Tamm-Horsfall e a uromodulina atuam de maneira diversa na cristalização do oxalato de cálcio *in vitro*. Além disto, estas diferenças são ampliadas quando se compara portadores de nefrolitíase e indivíduos normais.

Apesar da composição proteica da THP e da UM ser idêntica, sua conformação é diferente. A técnica de espectrometria de dicroísmo circular utilizada demonstrou que a UM apresenta mais estrutura beta do que a THP ($[\Theta]_{215 \text{ nm}} = 2700$ graus.cm².dmol⁻¹ versus $[\Theta]_{215 \text{ nm}} = 2100$ graus.cm².dmol⁻¹ da THP, $p < 0,01$). Este dado sugere diferenças na conformação molecular das duas proteínas, porém não permite inferir diretamente sobre o comportamento na cristalização do oxalato de cálcio. Também relevante é o fato de a UM apresentar conteúdo aparente de glicose e manose maior que o da THP em todos os grupos estudados e de possuir diferentes concentrações de resíduos glicosil.

Estas diferenças entre a THP e UM, principalmente na composição glicídica, são provavelmente as responsáveis pelos resultados distintos observados na cristalização do oxalato de cálcio.

Alterações da porção carboidrato da THP foram descritas em portadores de várias enfermidades renais, como glomerulonefrites, infecções, nefrite intersticial e síndrome de Bartter. A quantidade de resíduos de N-acetilgalactosamina e N-acetilglucosamina presentes na THP dos pacientes estava significativamente diminuída quando comparada com indivíduos normais. Provavelmente em consequência desta alteração, a THP destes pacientes estudados demonstrou uma maior afinidade de ligação à imunoglobulina G (OLCZAK, T. et al., 1999).

As propriedades funcionais da THP e da UM são determinadas, em sua imensa maioria, pela interação com a porção glicídica da molécula. A THP liga-se à interleucina 1α e β e ao fator de necrose tumoral através de seqüências de carboidratos presentes em sua molécula (HESSION, C. et al., 1987). O efeito imunomodulador da UM, representado pela inibição da proliferação de linfócitos T antígeno-específicos, é devido ao resíduo Man7GlcNAc2 (KOKOT, F.; DULAWA, J., 2000). A porção D-manose da THP funciona como receptor para a adesão de bactérias, como a *Escherichia coli*, possuidoras de fímbrias tipo 1. Por outro lado, bactérias recobertas com THP são protegidas da ação fagocitária de macrófagos (BASTOS, A. C. S. C. et al., 2001).

Desde que a única diferença entre as duas proteínas reside em sua glicosilação, supõe-se que a diferença biológica também dependa deste achado. De fato, a tendência de auto-agregação e o aumento da viscosidade encontrada na THP de diabéticos e de portadores de nefrolitíase acelerada foram atribuídos à redução no conteúdo de carboidratos, principalmente no conteúdo de ácido N-acetilneuramínico, causada por alterações moleculares pós-translacionais. Comparada com indivíduos normais, a THP destes grupos exibiu instabilidade colóide acentuada, sinalizando auto-agregação (RAMBAUSEK, M. et al., 1988; HESS, B. et al., 1991). Amostras de THP isoladas de indivíduos normais, tratadas com a

enzima neuraminidase para diminuir a concentração de ácido siálico, promoveram a agregação de cristais de oxalato e fosfato de cálcio (HALLSON, P.C. et al., 1997).

A THP isolada da urina de ratos e camundongos apresentou composição proteica similar à THP humana. Porém, foram notadas diferenças na composição glicídica e vários pontos para modificações pós-translacionais em sua porção carboidrato (PRASADAN, K. et al., 1995; GOKHALE, J. A.; GLENTON, P. A.; KHAN, S. R., 1997)

Foram encontradas alterações glicídicas na UM isolada da urina de mulheres grávidas. Durante a gestação houve uma diminuição do conteúdo total de cadeias de oligomanose, com exceção do resíduo Man7GlcNAc2 (SMAGULA, R. M. et al., 1990). Análises estruturais revelaram que a THP e UM são proteínas O-glicosiladas. A THP de mulheres não grávidas e de homens expressa a terminação O-glicans tipo centro 1, com uma molécula de ácido siálico ou fucose na terminação. Por sua vez, a UM de gestantes apresenta O-glicans do tipo centro 2, terminando com uma a três sequências siálicas de Lewis (x). Demonstrou-se que este tipo de alteração é revertida no puerpério. Os dados sugerem que o estado de glicosilação da UM está sob controle hormonal durante a gravidez e pode explicar o efeito imuno-modulador aumentado desta proteína neste período (EASTON, R. L. et al., 2000).

Este estudo demonstrou que a THP e a UM das gestantes estudadas produziu um número menor de cristais e com volume reduzido. Durante a gravidez, ocorre hipercalciúria sem alteração significativa no volume urinário. A excreção de citrato e magnésio não aumenta proporcionalmente e o pH urinário sobe. Conseqüentemente, a supersaturação urinária em relação ao oxalato de cálcio e brushita torna-se semelhante à de mulheres com nefrolitíase. Provavelmente a alta eficiência de proteínas inibidoras da cristalização, como por exemplo a nefrocalcina e a THP-UM, seja um fator adicional para a baixa prevalência de doença litíase nesta população (MAIKRANZ, P. et al., 1989).

Vários estudos mediram a excreção urinária da THP em indivíduos normais e em portadores de calculose urinária. O método utilizado para a purificação foi o de precipitações repetidas (TAMM, I.; HORSFALL Jr., F. L., 1950). Os valores encontrados

variaram de 10 a 100 mg/dia. Diferenças no peso corporal (GLAUSER, A. et al., 2000), concentração de citrato urinário (GANTER, K.; BONGARTZ, D.; HESSE, A., 1999), taxa de filtração glomerular (TORFFVIT, O.; KAMPER, A-L.; STRANDGAARD, S., 1996) e na ingestão de cloreto de sódio (YING, W-Z.; SANDERS, P.W., 1998) foram atribuídas como fatores determinantes da taxa de excreção. A maioria dos autores não detectou diferenças na excreção urinária entre indivíduos normais e portadores de nefrolitíase. Alguns, todavia, relataram valores de THP diminuídos ou dependentes do tipo de litíase. A formação de cálculos de ácido úrico e oxalato de cálcio associou-se à redução da excreção de THP em comparação a indivíduos sem doença litiásica. Notou-se ainda excreção aumentada de THP em mulheres normais (ROMERO, M. C.; NOCERA, S.; NESSE, A. B., 1998; GLAUSER, A. et al., 2000).

Em concordância com a maioria dos autores, não foram encontradas diferenças significativas na excreção urinária da THP e UM entre os portadores de nefrolitíase e os indivíduos normais selecionados. Os valores obtidos de THP e UM foram ao redor de 50 mg/dia para todos os grupos estudados. Os monossacarídeos presentes na THP e na UM entre os grupos também foram semelhantes, ou seja, a UM de todos os grupos estudados apresentou maior proporção de glicose e manose do que a THP correspondente. Não houve, portanto, diferenciação entre os pacientes com nefrolitíase e os indivíduos normais na porção glicídica da proteína. HESS, B. et al. (1991) analisaram pacientes com cálculos de oxalato de cálcio recorrentes. Demonstraram que a THP nestes casos exibia tendência à auto-agregação e estimulava a aglomeração cristalina. O comportamento proteico anormal parecia ter herança familiar e encontraram diferenças nos aminoácidos presentes na proteína. A composição proteica não foi detalhada neste estudo.

A nucleação e agregação dos cristais de oxalato de cálcio foi avaliada por meio de um aparelho Coulter. Esta técnica foi descrita inicialmente por ROBERTSON, W. G.; PEACOCK, M. (1972) e posteriormente aperfeiçoada (RYALL, R.L.; MARSHALL, V.R., 1978; RYALL, R.L.; RYALL, R. G.; MARSHALL, V. R., 1981; RYALL, R. L.; HIBBERD, C. M.; MARSHALL, V. R., 1985). Ela permite medir o número de cristais produzidos, informando

sobre a taxa de nucleação que ocorre no sistema. Além disto, fornece o volume total e a curva de distribuição das partículas cristalinas, inclusive com a moda desta curva, que representa o diâmetro médio dos cristais em solução. A grande vantagem de sua utilização reside no fato de medir o crescimento cristalino independente da agregação, quando os processos ocorrerem simultaneamente (RYALL, R.L.; RYALL, R.G.; MARSHALL, V.R., 1981). Embora diferenças no número de cristais possam ser índice de agregação, devem sempre ser acompanhadas da curva de distribuição de volume. Mais ainda, o diâmetro dos cristais nesta curva vai alterar a posição e não a forma da mesma (RYALL, R.L.; HIBBERD, C.M.; MARSHALL, V.R., 1985).

GROVER, P. K.; RYALL, R.L.; MARSHALL, V. R. (1990) estudaram o efeito de sobrecarga de oxalato em urina contendo 35 mg/l de THP utilizando um aparelho Coulter. Adicionaram quantidades crescentes de oxalato até o surgimento de cristais maiores que 2 μm , detectados pelo Coulter, determinando assim o limite de metaestabilidade urinária. A partir deste ponto, uma concentração de oxalato padrão foi utilizada e foram medidos os parâmetros de cristalização. Houve uma diminuição significativa no diâmetro das partículas formadas na presença da THP (6,5 μm *versus* 12,1 μm da urina de controles sem a proteína, $p < 0,01$). Desta forma, concluíram que sob condições fisiológicas usuais, a THP inibe a agregação do oxalato de sódio.

A THP neste estudo aumentou o número e diminuiu o diâmetro das partículas formadas, principalmente em portadores de nefrolitíase. A UM, por sua vez, contribuiu para a formação de cristais com volume aumentado e em número reduzido, quando comparado com a THP. Estes achados foram concordantes nas medidas obtidas pela variação da DO (nucleação), dados do aparelho Coulter (nucleação e agregação) e confirmados por microscopia óptica e eletrônica.

Este comportamento díspar sugere que as duas proteínas tenham diferentes funções no processo de cristalização do oxalato de cálcio. A THP atuaria primordialmente na fase inicial de nucleação e a UM participaria em maior grau na agregação dos cristais de oxalato de cálcio.

Nas condições empregadas neste trabalho, com utilização de solução rica em cálcio, a forma diidratada do oxalato de cálcio tem preferência sobre a forma monohidratada. Ambas, porém, estão presentes em cálculos com composição predominante de oxalato de cálcio. Embora o tamanho dos cristais seja reconhecidamente associado à supersaturação relativa de uma solução, proteínas presentes podem modificá-lo, assim como sua morfologia (BURNS, J. R.; FINLAYSON, B., 1980). A THP causou pouca alteração estrutural, formando primordialmente cristais diidratados. A UM, por sua vez, exibiu um fenômeno acentuado de polimorfismo cristalino, como demonstrado por microscopia óptica e eletrônica. As diferenças nas formas apresentadas pelos cristais em solução possuem significado fisiopatológico, já que parecem ser influenciadas por macromoléculas orgânicas, principalmente proteínas, incorporadas em seu interior ou adsorvidas em sua superfície. Interessantemente, várias proteínas com estas propriedades, como por exemplo a nefrocalcina, osteopontina e o fragmento urinário da protrombina, também são inibidoras da cinética de cristalização urinária. Pode-se incluir como um dos mecanismos naturais de defesa na formação de cálculos urinários a proteção contra adesão de cristais no epitélio, provida pelo efeito de macromoléculas na estrutura dos cristais (WESSON, J. A. et al., 1998).

A passagem de cristais pelo trato urinário ocorre tanto em indivíduos normais como em portadores de nefrolitíase. Apesar dos cristais serem mais volumosos nos nefrolitiásicos, o desenvolvimento de cálculos só é possível se houver retenção destas partículas dentro dos túbulos renais (ROBERTSON, W.G., 1969). A retenção pode ser definida como movimento cristalino em velocidade menor que o fluxo urinário tubular. Pode acontecer por aumento do cristal, geralmente por mecanismo de agregação, adesão tubular e por aprisionamento de partículas em locais de fluxo urinário lento (KOK, D. J.; KHAN, S. R., 1994). Uma vez retido, o cristal interage e adere às células epiteliais tubulares renais, por meio de glicoproteínas contendo ácido siálico na superfície apical celular. O mecanismo de adesão dos cristais pode ser inibido por várias substâncias, como por exemplo glicosaminoglicanos, uropontina, nefrocalcina e citrato (LIESKE, J. C.; TOBACK, F. G., 1996). Inversamente, ocorre aumento da adesão

quando existe lesão celular, devido à exposição de diferentes substâncias, como a fosfatidilserina, por exemplo (WIESSNER, J. H. et al., 2001). Após o processo de adesão, o cristal é rapidamente internalizado, ocorrem modificações no citoesqueleto e na expressão gênica e pode haver proliferação celular (LIESKE, J. C.; TOBACK, F. G., 1996).

GARCIA, W. E. et al. (1998) estudaram a influência da THP e da UM na adesão de cristais de oxalato de cálcio monoidratado a células epiteliais renais. Cristais marcados com carbono¹⁴ foram recobertos pela proteína a ser estudada e colocados em culturas de células epiteliais renais de macaco não transformadas, da linhagem BSC-1. A THP diminuiu a adesão dos cristais em 30%. A UM não causou alteração significativa, comportando-se de modo semelhante a cristais não expostos às proteínas. Além disto, quando a THP foi tratada com neuraminidase, que se liga à proteínas que contenham ácido siálico, sua capacidade de diminuir a adesão cristalina foi abolida.

Vários estudos relataram diferentes ações da THP na cristalização do oxalato de cálcio, um comportamento semelhante aos personagens de Robert L. Stevenson Dr. Jekyll e Mr. Hyde, conforme revisão relativamente recente (HESS, B., 1994). Os dados deste estudo sugerem, no entanto, que a diferente glicosilação pós-translacional exibida pela proteína de Tamm-Horsfall e por sua fração congênere, a uromodulina, seja o fator determinante da função destas proteínas.

6 CONCLUSÃO

- O maior conteúdo de glicose e manose na molécula diferenciou bioquimicamente a uromodulina da proteína de Tamm-Horsfall.
- A quantidade da proteína de Tamm-Horsfall e de uromodulina excretada em urina de 24 horas foi semelhante para pacientes com litíase renal, homens e mulheres normais e gestantes.
- A proteína de Tamm-Horsfall aumentou a densidade óptica e o número de partículas cristalinas formadas, com diâmetro comparativamente menor do que aquelas formadas pela uromodulina. Este efeito foi amplificado nos portadores de nefrolitíase.
- A uromodulina produziu um número menor de cristais, porém mais agregados e por conseqüência com volume maior do que as partículas cristalinas formadas pela proteína de Tamm-Horsfall. Esta diferença foi mais acentuada nos pacientes com cálculo renal.

REFERÊNCIAS

- ASPLIN, J.R. et al. Uropontin (UP) inhibits aggregation of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals. **J Am Soc Nephrol**, v. 6, p. 941, 1995.
- ASPLIN, J.R. et al. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. **Kidney Int**, v. 53, p. 194-199, 1998.
- ATMANI, F. et al. Isolation and purification of a new glycoprotein from human urine inhibiting calcium oxalate crystallization. **Urol Res**, v. 21, p. 61-66, 1993.
- ATMANI, F. et al. Reduced inhibitory activity of uronic-acid-rich protein in urine of stone formers. **Urol Res**, v. 22, p. 257-260, 1994.
- BASTOS, A.C.S.C. et al. Role of Tamm-Horsfall protein in the binding and *in vivo* phagocytosis of type 1 fimbriated *Escherichia coli* by mouse peritoneal macrophages. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, p. 913-917, 2001.
- BEZEAUD, A.; GUILLIN, M.C. Quantitation of prothrombin activation products in human urine. **Br J Haematol**, v. 58, p. 579-606, 1984.
- BOYCE, W.H.; GARVEY, F.K.; NORFLEET, C.M. Ion-binding properties of electrophoretically homogeneous mucoproteins of urine in normal subjects and in patients with renal calculous disease. **J Urol**, v. 72, p. 1019-1031, 1954.
- BROWN, C.M.; PURICH, D.L. Strong inference in mechanistic urolithiasis: A tribute to Birdwell Finlayson's biophysical contributions. **Am J Kidney Dis**, v. 17, p. 451-457, 1991.
- BROWN, D.; WANECK, G.L. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. **J Am Soc Nephrol**, v. 3, p. 895-906, 1992.
- BURNS, J.R.; FINLAYSON, B. Changes in calcium oxalate crystal morphology as a function of concentration. **Invest Urol**, v. 18, p. 174-177, 1980.
- CERINI, C. et al. Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: Involvement in the prevention of stone formation. **Kidney Int**, v. 55, p. 1776-1786, 1999.
- CHALKO, C. et al. Characterization of urinary uropontin excretion in humans. **J Am Soc Nephrol**, v. 3, p. 681-688, 1992.
- COE, F.L.; PARKS, J.H. Defenses of an unstable compromise: Crystallization inhibitors and the kidney's role in mineral regulation. **Kidney Int**, v. 38, p. 625-631, 1990.
- COE, F.L.; PARKS, J.H.; NAKAGAWA, Y. Protein inhibitors of crystallization. **Semin Nephrol**, v. 11, p. 98-109, 1991.
- COE, F.L. et al. Role of nephrocalcin in inhibition of calcium oxalate crystallization and nephrolithiasis. **Miner Electrolyte Metab**, v. 20, p. 378-384, 1994.
- COE, F.L.; PARKS, J.H. New insights into the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis: New research venues. **J Bone Miner Res**, v. 12, p. 522-533, 1997.
- DAWSON, C.J.; GROVER, P.K.; RYALL, R.L. Inter- α -inhibitor in urine and calcium oxalate urinary crystals. **Br J Urol**, v. 81, p. 20-26, 1998.

- DESMARS, J.F.; TAWASHI, R. Dissolution and growth of calcium oxalate monohydrate. I. Effect of magnesium and pH. **Biochim Biophys Acta**, v. 313, p. 256-267, 1973.
- DULAWA, J. et al. Tamm-Horsfall glycoprotein interferes with bacterial adherence to human kidney cells. **Eur J Clin Invest**, v. 18, p. 87-92, 1988.
- DUSSOL, B.; BERLAND, Y. Urinary kidney stone inhibitors. Where are we? **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, p. 1222-1224, 1996.
- DUSSOL, B.; BERLAND, Y. Urinary kidney stone inhibitors. What is the news? **Urol Int**, v. 60, p. 69-73, 1998.
- ELLIOT, J.S.; RABINOWITZ, I.N. Calcium oxalate crystalluria: Crystal size in urine. **J Urol**, v. 123, p. 324-327, 1980.
- EASTON, R.L. et al. Pregnancy-associated changes in the glycosylation of Tamm-Horsfall glycoprotein. Expression of sialyl Lewis (x) sequences on core 2 type O-glycans derived from uromodulin. **J Biol Chem**, v. 275, p. 21928-21938, 2000.
- FINLAYSON, B. Physicochemical aspects of urolithiasis. **Kidney Int**, v. 13, p. 344-360, 1978.
- FINLAYSON, B.; REID, F. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. **Invest Urol**, v. 15, p. 442-448, 1978.
- FINLAYSON, B.; KHAN, S.R.; HACKETT, R.L. Mechanisms of stone formation – An overview. **Scanning Electron Microsc**, v. 3, p. 1419-1425, 1984.
- FLEISCH, H.; BISAZ, S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. **Am J Physiol**, v. 203, p. 671-675, 1962.
- FLETCHER, A.P.; NEUBERGER, A.; RATCLIFFE, W.A. Tamm-Horsfall urinary glycoprotein: The chemical composition. **Biochem J**, v. 120, p. 417-424, 1970.
- GANTER, K.; BONGARTZ, D.; HESSE, A. Tamm-Horsfall protein excretion and its relation to citrate in urine of stone-forming patients. **Urology**, v. 53, p. 492-495, 1999.
- GARCIA, W.E. et al. Tamm-Horsfall protein, but not uromodulin, inhibits adhesion of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals to renal cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, p. 554A, 1998.
- GARDNER, G.L.; DOREMUS, R.H. Crystal growth inhibitors in human urine. Effect on calcium oxalate kinetics. **Invest Urol**, v. 15, p. 478-485, 1978.
- GLAUSER, A. et al. Determinants of urinary excretion of Tamm-Horsfall protein in non-selected kidney stone formers and healthy subjects. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, p. 1580-1587, 2000.
- GOKHALE, J.A.; GLENTON, P.A.; KHAN, S.R. Biochemical and quantitative analysis of Tamm-Horsfall protein in rats. **Urol Res**, v. 25, p. 347-354, 1997.
- GROVER, P.K.; RYALL, R.L.; MARSHALL, V.R. Does Tamm-Horsfall mucoprotein inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? **Clin Chim Acta**, v. 190, p. 223-238, 1990.
- HALLSON, P.C.; ROSE, G.A. Uromucoids and urinary stone formation. **Lancet**, v. 1, p. 1000-1002, 1979.

HALLSON, P.C. et al. Effects of Tamm-Horsfall protein with normal and reduced sialic acid content upon the crystallization of calcium phosphate and calcium oxalate in human urine. **Br J Urol**, v. 80, p. 533-8, 1997.

HESS, B.; NAKAGAWA, Y.; COE, F.L. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. **Am J Physiol**, v. 257 (Renal Fluid Electrolyte Physiol, n. 26), p. F99-F106, 1989.

HESS, B. et al. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. **Am J Physiol**, v. 260 (Renal Fluid Electrolyte Physiol., n. 29), p. F569-F578, 1991.

HESS, B. Tamm-Horsfall glycoprotein and calcium nephrolithiasis. **Miner Electrolyte Metab**, v. 20, p. 393-398, 1994.

HESS, B. et al. Simultaneous measurements of calcium oxalate crystal nucleation and aggregation: impact of various modifiers. **Urol Res**, v. 23, p. 231-238, 1995.

HESS, B.; KOK, D.J. Nucleation, growth and aggregation of stone-forming crystals. In COE, F.L.; FAVUS, M.J.; PAK, C.Y.C.; PARKS, J.H.; PREMINGER, G.M. (Ed): **Kidney Stones: Medical and Surgical Management**. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, 1996. p. 3-32.

HESSION, C. et al. Uromodulin (Tamm Horsfall glycoprotein): A renal ligand for lymphokines. **Science**, v. 237, p. 1479-1484, 1987.

HOSKING, D.H. et al. Urinary citrate excretion in normal persons and patients with idiopathic calcium urolithiasis. **J Lab Clin Med**, v. 106, p. 682-9, 1985.

HOWARD, J.E.; THOMAS, W.C. Some observations on rachitic rat cartilage of probable significance in the etiology of renal calculi. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 70, p. 94, 1958.

HOYER, J.R. et al. Ontogeny of Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. **Lab Invest**, v. 30, p. 757-761, 1974.

HOYER, J.R.; SEILER, M.W. Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. **Kidney Int**, v. 16, p. 279-289, 1979.

HOYER, J.R. Uropontin in urinary calcium stone formation. **Miner Electrolyte Metab**, v. 20, p. 385-392, 1994.

HUANG, Z-Q; SANDERS, P.W. Localization of a single binding site for immunoglobulin light chains on human Tamm-Horsfall glycoprotein. **J Clin Invest**, v. 99, p. 732-736, 1997.

KHAN, S.R. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis and the formation of human urinary stones. **Scanning Eletron Microsc**, v. 9, p. 597-616, 1995.

KHAN, S.R. Interactions between stone-forming calcific crystals and macromolecules. **Urol Int**, v. 59, p. 59-71, 1997.

KITAMURA, T; PAK, C.Y.C. Tamm and Horsfall glycoprotein does not promote spontaneous precipitation and crystal growth of calcium oxalate in vitro. **J Urol**, v. 127, p. 1024-1026, 1982.

KOBAYASHI, H. et al. Identification of structural domains in inter- α -trypsin inhibitor involved in calcium oxalate crystallization. **Kidney Int**, v. 53, p. 1727-1735, 1998.

KOK, D.J. et al. Modulation of calcium oxalate monohydrate crystallization kinetics in vitro. **Kidney Int**, v. 34, p. 346-350, 1988.

- KOK, D.J.; KHAN, S.R. Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. **Kidney Int**, v. 46, p. 847-854, 1994.
- KOKOT, F.; DULAWA, J. Tamm-Horsfall protein updated. **Nephron**, v. 85, p. 97-102, 2000.
- KUMAR, S.; MUCHMORE, A. Tamm-Horsfall protein-uromodulin (1950-1990). **Kidney Int**, v. 37, p. 1395-1401, 1990.
- KUMAR, S. Are Tamm-Horsfall protein and uromodulin identical? **Eur J Clin Invest** 28: 475-482. (1998).
- LIESKE, J.C.; TOBACK, F.G. Interaction of urinary crystals with renal epithelial cells in the pathogenesis of nephrolithiasis. **Semin Nephrol**, v. 16, p. 458-473, 1996.
- LIESKE, J.C. et al. Renal cell osteopontin production is stimulated by calcium oxalate monohydrate crystals. **Kidney Int**, v. 51, p. 679-686, 1997.
- MAIKRANZ, P. et al. Gestational hypercalciuria causes pathological urine calcium oxalate supersaturations. **Kidney Int**, v. 36, p. 108-113, 1989.
- MALAGOLINI, N.; CAVALLONE, D.; SERAFINI-CESSI, F. Intracellular transport, cell-surface exposure and release of recombinant Tamm-Horsfall glycoprotein. **Kidney Int**, v. 52, p. 1340-1350, 1997.
- MANN, S. Mineralization in biological systems. **Struct Bonding**, v. 54, n. H4, p. 125-174, 1983.
- MARTIN, X.; SMITH, L.H.; WERNESS, P.G. Calcium oxalate dihydrate formation in urine. **Kidney Int**, v. 25, p. 948-952, 1984.
- MCQUEEN, E.G. The nature of urinary casts. **J Clin Pathol**, v. 15, p. 367-371, 1962.
- MEYER J.L.; SMITH, L.H. Growth of calcium oxalate crystals. II. Inhibition by natural crystal growth inhibitors. **Invest Urol**, v. 13, p. 36-39, 1975.
- MEYER J.L. Physicochemistry of stone formation. In RESNICK, M.I.; PAK, C.Y.C. (Ed). **Urolithiasis: a Medical Surgical Reference**. W.B. Saunders, Philadelphia, 1990. p. 11-34.
- MIN, W. et al. Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. **Kidney Int**, v. 53, p. 189-193, 1998.
- MUCHMORE, A.V.; DECKER, J.M. Uromodulin: A unique 85-kd immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. **Science**, v. 229, p. 479-481, 1985.
- MUCHMORE, A.V.; DECKER, J.M. Uromodulin: An immunosuppressive 85-kilodalton glycoprotein isolated from human pregnancy urine is a high affinity ligand for recombinant IL-1 α . **J Biol Chem**, v. 261, p. 13404-13407, 1986.
- MUCHMORE, A.V.; DECKER, J.M. Evidence that recombinant IL-1 exhibits lectin-like specificity and binds to homogeneous uromodulin via N-linked oligosaccharides. **J Immunol**, v. 138, p. 2541-2546, 1987.
- MUCHMORE, A.V.; SHIFRIN, S.; DECKER, J.M. In vitro evidence that carbohydrate moieties derived from uromodulin, na 85,000 dalton immunosuppressive glycoprotein isolated from pregnancy urine, are immunosuppressive in the absence of intact protein. **J Immunol**, v. 138, p. 2547-2553, 1987.

NAKAGAWA, Y. et al. Purification and characterization of calcium oxalate monohydrate crystal growth inhibitor from human kidney tissue culture medium. **J Biol Chem**, v. 256, p. 3936-3944, 1981.

NAKAGAWA, Y. et al. Purification and characterization of the principal inhibitor of calcium oxalate monohydrate crystal growth in human urine. **J Biol Chem**, v. 258, p. 12594-12600, 1983.

NAKAGAWA, Y. et al. Urine glycoprotein crystal growth inhibitors. Evidence for a molecular abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. **J Clin Invest**, v. 76, p. 1455-1462, 1985.

NAKAGAWA, Y. et al. Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. Evidence that nephrocalcin from patients with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient in γ -carboxyglutamic acid. **J Clin Invest**, v. 79, p. 1782-1787, 1987.

NAKAGAWA, Y.; NETZER, M.; COE, F.L. Immunohistochemical localization of nephrocalcin (NC) to proximal tubule and thick ascending limb of Henle's loop (TAHL) of human and mouse kidney: resolution of a conflict. **Kidney Int**, v. 37, p. 474-474, 1990.

NAKAGAWA, Y.; COE, F.L. A conventional Tamm-Horsfall glycoprotein is a mixture of Tamm-Horsfall glycoprotein and Uromodulin. **J Am Soc Nephrol**, v. 8, p. 565, 1997.

OLCZAK, T. et al. Tamm-Horsfall protein isolated from urine of pregnant and non-pregnant women has similar oligosaccharides. **Eur J Clin Invest**, v. 28, p. 475-482, 1998.

OLCZAK, T. et al. Composition of the sugar moiety of Tamm-Horsfall protein in patients with urinary diseases. **Int J Clin Lab Res**, v. 29, p. 68-74, 1999.

PAK, C.Y.C. The problem of idiopathic stone formers presenting with no metabolic disorders. Pathogenesis and management. **Contrib Nephrol**, v. 58, p. 164-171, 1987.

PAK, C.Y.C. Hypocitraturic calcium nephrolithiasis. In: RESNICK, M.I.; PAK, C.Y.C. (Ed). **Urolithiasis: a Medical Surgical Reference**. W.B. Saunders, Philadelphia, 1990. p. 89-103.

PAK, C.Y.C. Citrate and renal calculi: An update. **Miner Electrolyte Metab**, v. 20, p. 371-377, 1994.

PARKS, J.H.; COE, F.L. A urinary calcium-citrate index for the evaluation of nephrolithiasis. **Kidney Int**, v. 30, p. 85-90, 1986.

PENNICA, D. et al. Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. **Science**, v. 236, p. 83-88, 1987.

PORILE et al. Normal calcium oxalate crystal growth inhibition in severe calcium oxalate nephrolithiasis. **J Am Soc Nephrol**, v. 7, p. 602-607, 1996.

PRASADAN, K. et al. Nucleotide sequence and peptide motifs of mouse uromodulin (Tamm-Horsfall protein) — the most abundant protein in mammalian urine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1260, p. 328-332, 1995.

RAMBAUSEK, M. et al. Tamm-Horsfall glycoprotein in diabetes mellitus: abnormal chemical composition and colloid stability. **Eur J Clin Invest**, v. 18, p. 237-242, 1988.

ROBERTS, S.D.; RESNICK, M.I. Glycosaminoglycans content of stone matrix. **J Urol**, v. 135, p. 1078-1082, 1986.

ROBERTSON, W.G. A method for measuring calcium crystalluria. **Clin Chim Acta**, v.26, p. 105-110, 1969.

ROBERTSON, W.G.; PEACOCK, M. Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone formers. **Clin Sci (Lond)**, v. 43, p. 499-506, 1972.

ROBERTSON, W.G. et al. Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. **N Engl J Med**, v. 294, p. 249-252, 1976.

ROMERO, M.C.; NOCERA, S.; NESSE, A.B. Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients. **Clin Biochem**, v. 30, p. 63-67, 1997.

ROSE, G.A.; SULAIMAN, S. Tamm-Horsfall mucoprotein promotes calcium oxalate crystal formation in urine: quantitative studies. **J Urol**, v. 127, p. 177-179, 1982.

RUDMAN, D. et al. Hypocitraturia in calcium nephrolithiasis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 55, p. 1052-7, 1982.

RYALL, R.L.; MARSHALL, V.R. A reappraisal of the Coulter Counter technique for measuring calcium oxalate crystal size. **Clin Chim Acta**, v. 83, p. 99-107, 1978.

RYALL, R.L.; RYALL, R.G.; MARSHALL, V.R. Interpretation of particle growth and aggregation patterns obtained from the Coulter Counter: a simple theoretical model. **Invest Urol**, v. 18, p. 396-400, 1981.

RYALL, R.L.; HIBBERD, C.M.; MARSHALL, V.R. A method for studying inhibitory activity in whole urine. **Urol Res**, v. 13, p. 285-289, 1985.

RYALL, R.L. et al. Inhibitory activity of whole urine: a comparison of urines from stone formers and healthy subjects. **Clin Chim Acta**, v. 154, p. 59-68, 1986.

RYALL, R.L. et al. Effects of chondroitin sulphate, human serum albumin and Tamm-Horsfall mucoprotein on calcium oxalate crystallization in undiluted human urine. **Urol Res**, v. 19, p. 181-188, 1991

SALIER, J.P. Inter- α -trypsin inhibitor: emergence of a family within the Kunitz-type protease inhibitor superfamily. **TIBS**, v. 15, p. 435-439, 1990.

SCHNIERLE, P.; HERING, F.; SEILER, H. Isoelectric focusing of Tamm-Horsfall glycoproteins: a simple tool for recognizing recurrent calcium oxalate renal stone formers. **Urol Res**, v. 24, p. 79-82, 1996.

SCURR, D.S.; ROBERTSON, W.G. Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. II. Studies on their mode of action in an artificial urine. **J Urol**, v. 136, p. 128-131, 1986.

SHERBLOM, A. et al. IL-2, a lectin with specificity for high-mannose glycopeptides. **J Immunol**, v. 143, p. 939-944, 1989.

SHIRANE, Y. et al. Morphological effects of glycosaminoglycans on calcium oxalate monohydrate crystals. **Scanning Microsc**, v. 9, p. 1081-1088, 1995.

SHUM, D.K.Y.; GOHEL, M.D.I. Separate effects of urinary chondroitin sulfate and heparan sulfate on the crystallization of urinary calcium oxalate: differences between stones formers and normal control subjects. **Clin Science**, v. 85, p. 33-39, 1993.

SMAGULA, R.M. et al. Pregnancy-associated changes in oligomannose oligosaccharides of human and bovine uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein). **Glycoconj J**, v. 7, p. 609-624, 1990.

SMITH, L.H. The pathophysiology and medical treatment of urolithiasis. **Semin Nephrol**, v. 10, p. 31-52, 1990.

STAPLETON, A.M.F. et al. Immunohistochemical distribution and quantification of crystal matrix protein. **Kidney Int**, v. 44, p. 817-824, 1993.

STAPLETON, A.M.F.; RYALL, R.L. Crystal matrix protein – Getting blood out of a stone. **Miner Electrolyte Metab**, v. 20, p. 399-409, 1994.

STAPLETON, A.M.F. et al. Further evidence linking urolithiasis and blood coagulation: Urinary prothrombin fragment 1 is present in stone matrix. **Kidney Int**, v. 49, p. 880-888, 1996.

SU, S-J. et al. Uromodulin and Tamm-Horsfall protein induce human monocytes to secrete TNF and express tissue factor. **J Immunol**, v. 158, p. 3449-3456, 1997.

TAMM, I.; HORSFALL, F.L. Jr. Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 74, p. 108-114, 1950.

THOMAS, D.B. et al. Tamm-Horsfall protein binds to a single class of carbohydrate specific receptors on human neutrophils. **Kidney Int**, v. 44, p. 423-429, 1993.

TISELIUS, H-G; FORNANDER, A.M.; NILSSON, M.A. Effects of citrate and urinary macromolecules on crystal aggregation. In: RYALL, R.L.: **Urolithiasis 2**. Plenum Press, New York, 1994. p. 213-214.

TORFFVIT, O.; KAMPER, A-L.; STRANDGAARD, S. Tamm-Horsfall protein in urine after uninephrectomy/transplantation in kidney donors and their recipients. **Scand J Urol Nephrol**, v. 31, p. 555-559, 1997.

TURNER, G.A.; GOODARZI, M.T.; THOMPSON, S. Glycosylation of alpha-1-proteinase inhibitor and haptoglobin in ovarian cancer: evidence for two different mechanisms. **Glycoconjugate**, v. 12, p. 211-218, 1995.

WELSHMAN, S.G.; MCGEOWN, M.G. The relationship of the urinary cations, calcium, magnesium, sodium and potassium, in patients with renal calculi. **Br J Urol**, v. 47, p. 237-242, 1975.

WESSON, J.A. et al. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. **Kidney Int**, v. 53, p. 952-957, 1998.

WIESSNER et al. Mechanisms of calcium oxalate crystal attachment to injured renal collecting duct cells. **Kidney Int**, v. 59, p. 637-644, 2001.

WORCESTER, E.M. et al. Crystal adsorption and growth slowing by nephrocalcin, albumin, and Tamm-Horsfall protein. **Am J Physiol**, v. 255, p. F1197-F1205, 1988.

YING, W-Z.; SANDERS, P.W. Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats. **Kidney Int**, v. 54, p. 1150-1156, 1998.