WEVERTON MACHADO LUCHI

**A deficiência de vitamina D é um potencial fator de risco para
nefrotoxicidade induzida por contraste**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Luchi, Weverton Machado

A deficiência de vitamina D é um potencial fator de risco para nefrotoxicidade induzida por contraste / Weverton Machado Luchi. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Antonio Carlos Seguro.

Descritores: 1.Deficiência de vitamina D 2.Estresse oxidativo 3.Sistema renina-angiotensina 4.Rim 5.Meios de contraste 6.Gadolínio 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-007/15

*Dedico esta tese a minha Mãe, Marli Machado Luchi,
a quem devo toda minha evolução e fé.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro**, serei eternamente grato pelo convívio que tivemos. Tenho grande admiração pelo senhor e sempre o mencionarei em minha caminhada, assim como o faz com seu orientador, Antonino dos Santos Rocha. O aprendizado foi imenso e o respeito que tenho pelo senhor é paternal. Professor, muito obrigado por fazer parte da minha vida!

À **Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu**, eu gosto muito de você! Lembro-me do primeiro dia que fui ao laboratório e você me acolheu com tanto carinho. Ali, naquele dia a dia, você me ensinando a fazer o experimento de clearance de inulina... a nossa amizade foi se construindo em verdade. Helô, quero te agradecer por tudo que você fez por mim e dizer que você também sempre estará comigo.

À **Dra. Daniele Canale**, ao **Dr. Pedro Henrique de França Goes**, à **Ms. Monique Silva Martines** e à **Ms. Daniela Ferreira**, obrigado por toda dedicação que tiveram com o meu projeto, e ao companheirismo e à amizade fora do ambiente da pós-graduação. Atlanta e Nova York nos renderam bons momentos felizes! Não poderia deixar de enfatizar o grande papel que a **Dra. Daniele Canale** tem nessa conquista, estando sempre presente nos momentos em que mais precisei, não importando dia ou horário! Ao **Dr. Rildo Volpini**, sou grato pela ajuda na realização da análise histológica e imuno-histoquímica.

À **Dra. Adriana Castello Costa Girardi**, a Senhora (risos) foi uma pessoa fundamental na minha vida e para o meu projeto. Obrigado pela sua dedicação na elaboração de parte dos meus dados experimentais e na construção do *paper*! Admiro sua inquietude como pesquisadora. Espero tê-la sempre como uma grande amiga! À todos os seus alunos, também deixo os meus agradecimentos!

Gostaria de mencionar todos os meus queridos amigos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, referências como profissionais médicos, e com quem compartilhei inesquecíveis e vividos momentos da minha vida durante a residência de clínica médica e nefrologia. Dentre eles, **Dr. Alcino Reis**

Mendes, Dr. Bruno Andraus Filardi, Dr. Gustavo Volpe, Dr. Gustavo Caires Novaes, Dr. Henrique Turim e todos os demais da família Colibri!

Aos meus irmãos, **Bethânia, Wellington, Wagner e Wanderson**, ao meu pai **Musolini** e a minha mãe **Marli**, gostaria de dizer que construí-me com qualidades e princípios de cada um de vocês para conseguir chegar até aqui. Orgulhem-se dessa conquista, pois ela também pertence a vocês!

Por fim, sentirei muitas saudades das estimulantes e inflamadas buscas pelo conhecimento da fisiologia renal com o meu orientador. Tenho absoluta certeza de que essa passagem pelo LIM-12 foi extremamente produtiva, me fez crescer como pessoa e profissionalmente, e dará bons frutos. Espero manter vocês sempre por perto, abraços!

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM12), Departamento de Nefrologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), por meio do auxílio à pesquisa (Proc. nº 306148/2013-7) e concessão da bolsa de estudos pela CAPES/PROEX (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa de Excelência Acadêmica).

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVO	7
3 MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 Protocolo experimental	9
3.2 Representação esquemática do protocolo experimental.....	11
3.3 Determinação da taxa de filtração glomerular: Clearance de Inulina	12
3.4 Análise da expressão proteica de renina, angiotensinogênio (AGT) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no tecido renal pela técnica de <i>Western Blotting</i>	13
3.5 Avaliação do estado redox: Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathione reduzida (GSH).....	16
3.6 Análise histomorfométrica e imuno-histoquímica	17
3.7 Análise estatística	17
4 RESULTADOS	20
4.1 Efeitos da deficiência de vitamina D nos ratos	20
4.2 Efeitos dos meios de contraste radiológicos nos ratos deficientes em vitamina D	22
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	36
7 REFERÊNCIAS	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

25(OH)D	25-hidroxivitamina D
AGT	Angiotensinogênio
CI	Diatrizoato 76%
DRC	Doença Renal Crônica
dVD	Deficiência de Vitamina D
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
Gd	Gadoterato de Meglumina
Grupo CI	Ratos alimentados com dieta padrão que receberam diatrizoato 76%
Grupo dVD ₃₀	Ratos alimentados com dieta livre de vitamina D por 30 dias
Grupo dVD ₃₀ +CI	Ratos dVD ₃₀ que receberam diatrizoato 76%
Grupo dVD ₃₀ +Gd	Ratos dVD ₃₀ que receberam gadoterato de meglumina
Grupo dVD ₆₀ +CI	Ratos alimentados com dieta livre de vitamina D por 60 dias que receberam diatrizoato 76%
Grupo dVD ₆₀ +Gd	Ratos alimentados com dieta livre de vitamina D por 60 dias que receberam gadoterato de meglumina
Grupo Gd	Ratos alimentados com dieta padrão que receberam gadoterato de meglumina
Grupo Sham	Ratos controle alimentados com dieta padrão que receberam soro fisiológico 0,9%
GSH	Glutathiona Reduzida
GSH _s	Glutathiona Reduzida Sérica
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-Eosina

IRA	Injúria Renal Aguda
L-NAME	L-Nitro-Arginina Metil Ester
NIC	Nefrotoxicidade Induzida por Contraste
NO	Óxido Nítrico
PAm	Pressão Arterial Média
PC	Peso Corporal
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
RVR	Resistência Vascular Renal
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SRA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBARS _u	Níveis Urinários de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.
TCA	Ácido Tricloroacético

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros funcionais, hemodinâmicos e bioquímicos e avaliação do estado redox sistêmico e urinário dos animais alimentados com dieta padrão (Sham) ou livre de vitamina D por 30 dias (dVD ₃₀).	20
Tabela 2	Efeito da infusão dos contrastes iodado e de gadolínio nos grupos Sham e dVD ₃₀ . Avaliação dos parâmetros funcionais e hemodinâmicos, e do estado redox sistêmico e urinário.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A deficiência de vitamina D aumenta a expressão proteica de renina no tecido renal. Densitometria e representação gráfica da análise por <i>immunoblotting</i> da expressão proteica relativa de renina no tecido renal de ratos alimentados com dieta padrão (Sham) ou livre de vitamina D por 30 dias (dVD ₃₀) 21
Figura 2	Efeito da infusão dos contrastes iodado e de gadolínio nos ratos Sham e dVD ₃₀ sobre o estado redox do tecido renal..... 24
Figura 3	Efeito da infusão do contraste iodado nos animais Sham e dVD ₃₀ sobre a expressão proteica de angiotensinogenio (AGT) e de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) do tecido renal Error! Bookmark not defined.
Figura 4	Efeito da infusão do contraste de gadolínio nos animais Sham e dVD ₃₀ sobre a expressão proteica de angiotensinogenio (AGT) e de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) do tecido renal 27
Figura 5	Escore de injúria tubular e quantificação da infiltração de macrófagos no tecido renal dos animais Sham e dVD ₃₀ após infusão dos contrastes iodado e de gadolínio. 28

RESUMO

Luchi WM. *A deficiência de vitamina D é um potencial fator de risco para nefrotoxicidade induzida por contraste* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A nefrotoxicidade induzida por contraste (NIC) é responsável por cerca de 11% de todas as causas de injúria renal aguda no ambiente hospitalar e tem sido atribuída exclusivamente aos contrastes iodados. Contudo, os contrastes à base de gadolínio recentemente estão sendo reportados como potenciais indutores de nefrotoxicidade em pacientes de alto risco. A fisiopatologia da NIC está relacionada à geração de hipóxia na medula renal vinculada à disfunção endotelial, e ao estresse oxidativo, alterações que têm sido fortemente associadas à deficiência de vitamina D (dVD), condição que encontra-se altamente prevalente na população atual, mesmo em países de clima tropical. O objetivo desse estudo foi testar a hipótese de que a dVD é um potencial fator de risco para NIC. Para isso, ratos Wistar foram mantidos em dieta padrão ou livre de vitamina D por 30 dias. A seguir, CI (diatrizoato 76%), Gd (gadoterato de meglumina) ou soro fisiológico 0,9% foram infundidos por via endovenosa. Seis grupos foram avaliados (n=12/grupo): Sham, CI, Gd, dVD₃₀, dVD₃₀+CI e dVD₃₀+Gd. Após 48h da infusão dos contrastes, os animais foram submetidos ao experimento de clearance de Inulina, para estimar o ritmo de filtração glomerular (RFG), a análise da expressão proteica no tecido renal de angiotensinogênio (AGT), renina e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e ao exame histológico. O estado redox foi avaliado por meio da medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, marcador de peroxidação lipídica), e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH, antioxidante endógeno) sistêmico e renal. Comparado ao grupo Sham, os animais dVD₃₀ apresentaram menores níveis séricos de 25(OH)D total (3,96±0,8 vs. 44,87±1,7 ng/mL, p<0,001), níveis semelhantes de cálcio e fósforo plasmáticos e aumento da expressão renal de AGT e renina. O RFG foi similar nos grupos Sham, CI e Gd. Entretanto, o RFG foi significativamente menor nos grupos dVD₃₀+CI e dVD₃₀+Gd e esta redução esteve associada ao aumento no tecido renal da expressão de AGT e à redução da eNOS, combinado à acentuada elevação da razão TBARS/GSH no tecido renal. Apesar da alteração na função renal com a infusão dos contrastes, a morfologia renal permaneceu preservada. Foram feitos dois grupos adicionais (n=5/grupo) mantidos em dVD por 60 dias. Após administração dos contrastes, uma maior queda do RFG foi observada, sugerindo que uma dVD mais prolongada agrava ainda mais a queda do RFG. Coletivamente, nossos resultados indicam que a dVD é um potencial fator de risco para NIC iodado e de gadolínio em consequência do desequilíbrio intrarrenal de substâncias vasoativas por meio da ativação do sistema renina-angiotensina e do estresse oxidativo.

Descritores: deficiência de vitamina D, estresse oxidativo, sistema renina-angiotensina, rim, meios de contraste, gadolínio, ratos Wistar.

SUMMARY

Luchi WM. *Vitamin D deficiency is a potential risk factor for contrast-induced nephropathy* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Contrast-induced nephropathy (CIN) account for about 11% of all causes of acute kidney injury in hospitalized patients and has been attributed exclusively to iodinated contrast media. However, gadolinium-based contrast agents are reported recently as potential inducers of nephrotoxicity in high risk patients. Pathophysiology of CIN is related to hypoxia in the renal medulla associated with endothelial dysfunction and oxidative stress, changes that have been strongly linked to vitamin D deficiency (VDD), condition that is highly prevalent in the current population, even in tropical countries. This study tested the hypothesis that VDD is a predisposing factor for iodinated and gadolinium contrast media nephrotoxicity. To this end, male Wistar rats were fed standard or vitamin D-free diet for 30 days (VDD₃₀). Then, IC (diatrizoate 76%), Gd (gadoterate meglumine) or saline were administered intravenously and six experimental groups were obtained: Sham, IC, Gd, VDD₃₀, VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd. Renal hemodynamics, redox status, histological and immunoblot analysis were evaluated 48h after contrast or vehicle infusion. Compared to Sham, VDD₃₀ rats presented lower levels of total 25(OH)D (3.96 ± 0.8 vs. 44.87 ± 1.7 ng/mL, $p < 0.001$), similar plasma levels of calcium and phosphorus and higher renal renin and angiotensinogen expression. Inulin clearance-based estimated glomerular filtration rate (GFR) was not different among Sham, IC and Gd groups. However, GFR was significantly reduced in VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd groups and this reduction was associated with higher renal angiotensinogen and lower eNOS abundance combined with higher kidney thiobarbituric acid reactive substances and lower glutathione levels. Conversely, worsening of renal function was not accompanied by abnormalities on kidney structure or increased infiltration of inflammatory cells. Rats on a VDD for 60 days displayed a greater fall in GFR after contrast administration, suggesting that the longer the period of VDD, the worst the impact of contrast media on renal function. Collectively, our findings suggest that VDD is a potential risk factor for contrast nephropathy due to imbalance in intrarenal vasoactive substances by renin-angiotensin system activation and oxidative stress.

Descriptors: vitamin D deficiency, oxidative stress, renin-angiotensin system, kidney, contrast media, gadolinium, Rats, Wistar.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A nefrotoxicidade induzida por meios de contraste radiológicos (NIC) tem sido considerada a terceira causa de injúria renal aguda (IRA) adquirida no ambiente hospitalar, respondendo por, aproximadamente, 11% dos casos. Em pacientes com fatores de risco, a incidência da IRA pode chegar de 20 a 30% dos casos.^{1,2} É definida, mais comumente, como o aumento da creatinina sérica em 0,5mg/dL ou em, pelo menos, 25% da creatinina de base dentro de 48 a 72 horas após a exposição ao contraste. O impacto na mortalidade é considerável, com relatos de aumento em 5,5 vezes o risco de morte, especialmente nos pacientes que evoluem com a necessidade de hemodiálise, o que pode chegar a 4% dos casos de NIC.^{3,4}

A injúria renal pelos contrastes também parece impactar na evolução da doença renal crônica (DRC). Em recente publicação, Abaci *et al.* demonstraram que pacientes com DRC expostos aos contrastes e que não desenvolveram IRA, conforme a definição acima, evoluíram com pior progressão na queda do ritmo de filtração glomerular (RFG), durante um seguimento de três anos, quando comparados a uma população semelhante não exposta aos contrastes, questionando o conceito aplicado à NIC como um fenômeno de “tudo ou nada”.^{5,6} Assim, mesmo não levando à IRA, os meios de contrastes radiológicos poderão contribuir para progressão da DRC. Diante disso, a abordagem da injúria renal pelo uso dos contrastes passa a ter uma nova preocupação em pacientes com fatores de risco relativa à progressão da DRC, impondo-se cautela adicional quanto ao seu uso.

Um outro ponto que merece ênfase atual, refere-se às características físico-químicas dos meios de contraste iodados. O potencial efeito nefrotóxico atribuído à alta osmolaridade não tem se confirmado de maneira convincente nas metanálises.⁷ Em contrapartida, a viscosidade, cada vez mais, têm sido enfatizada nas publicações como uma importante

propriedade que interfere na hemodinâmica renal, de modo que contrastes iso-osmolares (osmolaridade semelhante à do plasma), porém de elevada viscosidade, têm se mostrado mais nefrotóxicos do que aqueles com alta osmolaridade, contudo, de baixa viscosidade.⁸⁻¹⁰ A alta viscosidade dos contrastes eleva a viscosidade plasmática e urinária, e, conseqüentemente, reduz o fluxo sanguíneo na medula renal, aumenta a pressão hidrostática na cápsula de Bowman, reduzindo a pressão efetiva de filtração no glomérulo, e aumenta o tempo de exposição dos contrastes com as células tubulares.⁸ Assim, uma classificação dos meios de contraste iodados que também englobe a viscosidade, além da osmolaridade, tem sido sugerida.

A NIC tem sido atribuída, exclusivamente, aos meios de contraste iodados e, em pacientes de alto risco para desenvolver NIC, especialmente aqueles com DRC, os meios de contraste à base de gadolínio, considerados seguros, estão sendo utilizados em substituição aos contrastes iodados. A preocupação relacionada ao uso dos meios contendo gadolínio mantém-se voltada para o desenvolvimento da fibrose sistêmica nefrogênica e não a um potencial efeito nefrotóxico.^{11,12} Entretanto, esses agentes têm sido recentemente reportados como potenciais agravantes da piora de função renal em estudos experimentais e em populações de alto risco para NIC, questionando a literatura quanto ao inocente rótulo aplicado a esses contrastes.¹³⁻¹⁸ Em conformidade, comitês de segurança de sociedades de radiologia, ao revisarem os dados vigentes sobre a nefrotoxicidade associado ao uso do gadolínio, não recomendaram a substituição dos contrastes iodados pelos contrastes à base de gadolínio em pacientes com DRC, além de haver o risco da fibrose sistêmica nefrogênica nos pacientes com clearance de creatinina menor do que 30mL/min.^{19,20}

A fisiopatologia da NIC está relacionada ao desequilíbrio entre substâncias vasoconstrictoras, como a endotelina e a angiotensina II, e vasodilatadoras, como as prostaglandinas e o óxido nítrico (NO), na microcirculação da medula renal, resultando em vasoconstrição, hipóxia medular e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), somado a um efeito citotóxico direto nos túbulos renais.²¹ Adicionalmente, a carga

osmótica dos contrastes aumenta a pressão intratubular e intersticial, reduzindo a perfusão na vasa recta. Além disso, aumenta a carga de sódio que chega à porção espessa da alça de Henle, elevando o consumo de oxigênio, assim como desencadeia vasoconstricção na arteríola aferente por meio do mecanismo de *feedback* tubuloglomerular.²¹ Entretanto, para que ocorra esse desequilíbrio e o desenvolvimento da NIC, tanto em modelos experimentais quanto em humanos, é necessária a presença de fatores de risco que possam intensificar o agravo das alterações induzidas pelos contrastes e, assim, determinar a geração de disfunção endotelial, hipóxia e formação de ERO na medula renal suficientes para reduzir o RFG.²²

Os principais fatores de risco descritos para NIC são a DRC, o diabetes mellitus e a hipertensão, insuficiência cardíaca, estados de desidratação, hipotensão e instabilidade hemodinâmica, sepse, idade avançada, etc.^{20,23} De maneira similar, nos modelos experimentais, a presença de animais pré-condicionados antes da infusão dos contrastes, por meio de desidratação, uninefrectomia, uso de anti-inflamatórios e/ou inibidores da síntese de NO, é necessária para que eles sejam susceptíveis ao desenvolvimento da NIC.²² Neste contexto, têm surgido fortes evidências demonstrando que a deficiência de vitamina D (dVD) está associada à disfunção endotelial, ao estresse oxidativo e à ativação do sistema renina angiotensina intrarrenal, alterações substanciais à instalação da injúria renal após exposição aos contrastes.²⁴⁻²⁶

A vitamina D é um hormônio derivado do colesterol, que pode ser obtido, principalmente, por meio da exposição da pele à luz ultravioleta B ou pela ingestão de peixes gordurosos ou produtos enriquecidos. Para se tornar metabolicamente ativa, a vitamina D necessita sofrer hidroxilações no fígado e no rim. A partir de então, irá agir, via receptor nuclear, na manutenção do metabolismo mineral, cálcio e fósforo, e ósseo, especialmente no intestino, nos rins, ossos e paratireoides.²⁷ Não obstante, nas duas últimas décadas, foi demonstrada a presença tanto do receptor da vitamina D quanto da enzima 1 α -hidroxilase em diferentes tecidos, como o tecido imunológico (células B, T e macrófagos), coração, endotélio, etc., configurando a

existência de um sistema parácrino e autócrino, além da clássica formação endócrina de vitamina D no rim. A partir de então, diversas outras funções têm sido atribuídas à vitamina D, diferente daquelas vinculadas ao metabolismo do cálcio e fósforo, os chamados efeitos pleiotrópicos.²⁸ Dentre eles, podemos citar a inibição do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA), o efeito antiproliferativo e imunomodulador, e a proteção renal e cardiovascular. Assim, a vitamina D tornou-se alvo atual de intensas pesquisas, associando-se a sua deficiência a diferentes doenças, como a hipertensão arterial, câncer de mama e colorretal, diabetes, progressão da DRC, etc.²⁹

Ademais, é importante destacar a elevada prevalência da insuficiência/deficiência de vitamina D, caracterizada por níveis séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] entre 20-30ng/ml e menor que 20ng/ml, respectivamente, não somente em populações de risco, como nos portadores de insuficiência renal crônica, mas também na população em geral. Nos Estados Unidos, dados do III National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) revelaram que apenas 20-25% da população analisada apresentava níveis séricos de 25-hidroxivitamina D maiores do que 30ng/mL, enquanto 25-35% tinham uma clara dVD, níveis abaixo de 20ng/mL.³⁰ Unger e colaboradores, ao analisarem 603 funcionários saudáveis da Universidade de São Paulo, encontraram que 77,4% dos indivíduos apresentavam insuficiência de vitamina D após o inverno e 40% após o verão, indicando que, mesmo em um país de clima tropical como o Brasil, os níveis de vitamina D devem ser monitorados.³¹

Conforme o exposto, hipotetizamos que a dVD em ratos poderia ser uma condição que predisporia a NIC. Para isso, avaliamos a função renal 48h após a infusão de contrastes iodado e à base de gadolínio em ratos alimentados com dieta padrão ou livre de vitamina D por trinta dias. Adicionalmente, analisamos parâmetros sistêmicos e renais do estado redox, e a expressão proteica renal de renina, angiotensinogênio (AGT) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) para elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia da NIC.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi testar a hipótese de que a deficiência de vitamina D em ratos é um fator de risco para nefrotoxicidade induzida pelos meios de contraste iodado e à base de gadolínio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP - Processo N°. 228/12). Foram utilizados ratos Wistar machos, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório em temperatura ambiente ($23\pm1^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, e livre acesso ao consumo de água e ração. Os experimentos foram desenhados para avaliar se a dVD em ratos, induzida por dieta, seria uma condição que predisporia a nefrotoxicidade dos meios de contraste radiológicos.

Os ratos, inicialmente com 3 semanas de vida, foram colocados em gaiolas individuais e divididos para receberem a dieta padrão ou livre de vitamina D (*MP Biomedicals*, Irvine, CA, EUA) durante 30 dias. As dietas apresentam 0,4% Ca e 0,4 % P, e diferem-se pela presença ou ausência de 5 UI de vitamina D por grama de ração. Ao final desse período, os animais foram alocados para receberem a infusão dos contrastes diatrizoato 76% (contraste iodado de alta osmolaridade, dose de 6mL/kg) ou gadoterato de meglumina (contraste à base de gadolínio, osmolalidade 1350mOsm/kg^{-1} , dose de $1,5\text{mmol/kg}$) por meio da veia peniana, sob anestesia inalatória com isoflurano. Aos animais que não receberam contrastes, foi administrado volume equivalente de soro fisiológico 0,9%. A utilização em estudos experimentais de doses mais elevadas de contrastes, quando comparadas a de humanos, baseia-se em dois argumentos: 1) conforme a recomendação do FDA, a dose equivalente em ratos por metro quadrado é cerca de 6 a 8 vezes maior do que a de humanos; 2) esses contrastes são excretados por

via renal e a filtração por néfron de ratos é cerca de 5 vezes maior que a dos humanos (8 vs. 1.5mL/min/kg).³² Além disso, as doses utilizadas no atual projeto já foram utilizadas previamente em estudos conduzidos pelo nosso laboratório.^{18,33} Foram avaliados seis grupos conforme descrito abaixo:

- **Controle (Sham):** ratos que receberam dieta padrão por 30 dias e foram submetidos à injeção de soro fisiológico 0,9%.
- **CI:** ratos que receberam dieta padrão por 30 dias e foram submetidos à injeção do contraste iodado diatrizoato 76% (6mL/kg).
- **Gd:** ratos que receberam dieta padrão por 30 dias e foram submetidos à injeção do contraste à base de gadolínio gadoterato de meglumina (1,5mmol/kg).
- **dVD₃₀:** ratos que receberam dieta livre de vitamina D por 30 dias e foram submetidos à injeção de soro fisiológico 0,9%.
- **dVD₃₀+CI:** ratos que receberam dieta livre de vitamina D por 30 dias e foram submetidos à injeção do contraste iodado diatrizoato 76% (6mL/kg).
- **dVD₃₀+Gd:** ratos que receberam dieta livre de vitamina D por 30 dias e foram submetidos à injeção do contraste à base de gadolínio gadoterato de meglumina (1,5mmol/kg).

A seguir, cada grupo retornou às gaiolas individuais e, após 24 horas, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas. O clearance de inulina foi efetuado ao término desse período, 48 horas após a infusão do soro fisiológico ou dos contrastes, seguido pelo processo de perfusão e remoção de tecido renal. Após a finalização dos experimentos, os animais foram sacrificados pela injeção endovenosa de excesso de anestésico pentobarbital sódico. Esses foram descartados conforme as orientações da cartilha de descarte de resíduo do sistema HC/FMUSP.³⁴

3.2 Representação esquemática do protocolo experimental

3.3 Determinação da taxa de filtração glomerular: Clearance de Inulina

O estudo de clearance de inulina (RFG) foi desenvolvido sob anestesia com pentobarbital sódico (Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 50 mg/Kg de peso, via intraperitoneal. Para manutenção de boa ventilação, os animais foram entubados pela cateterização da traqueia com tubo de polietileno PE-240. A seguir, foi cateterizada a veia jugular, com PE-60 para infusão da solução de inulina a 10%, na dose inicial 100 mg/Kg, seguida infusão contínua durante todo o experimento, por meio de bomba de infusão, numa velocidade constante de 0,04 ml/min. A artéria carótida também foi cateterizada com PE-60 para coleta das amostras de sangue, em diferentes intervalos, e, também, para controle da pressão arterial média (PAm) e da frequência cardíaca, monitoradas por meio do *BIOPAC Systems, Inc, Model MP 100* (Santa Bárbara, Califórnia, EUA). A bexiga urinária foi cateterizada com PE-240. Foram coletadas três amostras de urinas a cada 30 minutos, e amostras de sangue no início e no fim do experimento. As concentrações de inulina no sangue e na urina foram determinadas pelo método colorimétrico da Antrona e os valores do clearance de inulina, expressos por 100g de peso corporal (PC), representam a média de três períodos do experimento.

Para a avaliação do fluxo sanguíneo renal (FSR), foi feita uma incisão mediana abdominal, o pedículo renal esquerdo, dissecado e a artéria renal, isolada. Cuidadosamente, uma sonda de fluxo ultrassônico foi acoplada na artéria renal para fazer a mensuração do fluxo sanguíneo renal em mL/min (T110; *Transonic Systems*, Bethesda, MD, EUA). A resistência vascular renal foi calculada dividindo-se a PAm pelo FSR e o resultado foi expresso em mmHg/mL/min.

Ao final do experimento de clearance, os animais mantidos sob anestesia foram submetidos a uma laparotomia mediana. A aorta abdominal foi clampeada temporariamente acima das artérias renais para inserção de um tubo de polietileno PE-60 logo abaixo das artérias renais. Foram coletadas amostras de sangue, momentos antes da perfusão renal, para as seguintes análises: dosagem de glutathiona reduzida (GSH) sérica, cálcio

iônico plasmático (ABL800 *Flex Analyzer - Radiometer*, Brønshøj, Denmark), fósforo plasmático (COBAS C111 *Analyzer - Roche®*, EUA) e para dosagem sérica da 25-hidroxivitamina D total (25OHD₂ e 25OHD₃) pelo método de ensaio imunoenzimático - ELISA (Rat 25OH *Vitamin D total ELISA Kit*, ALPCO®, Salem, NH, EUA).^{35,36} A concentração sérica de 25(OH)D total foi avaliada nos grupos Sham, e dVD₃₀ após 30 dias de consumo das dietas padrão e livre de vitamina D, respectivamente. Em seguida, após a perfusão com uma solução de tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4), os rins foram removidos. O rim direito foi congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para a análise da expressão de proteínas pela técnica de *Western blotting*. O rim esquerdo foi fixado em formalina tamponada 10% ou em solução de methacarn e mantido nestes mesmos fixadores por um período de 24 horas. Após esse período, os fixadores foram substituídos por álcool 70% e o tecido foi embebido em parafina e cortado em secções de 4 µm para estudos de histomorfometria e imuno-histoquímica.

Com o objetivo de avaliar se um período mais prolongado de dVD teria maior impacto no RFG, dois grupos adicionais foram mantidos em dieta livre de vitamina D por 60 dias (n=5/grupo) e, a seguir, submetidos apenas ao experimento de clearance de inulina 48h após a infusão de Cl e Gd (grupos dVD₆₀+Cl e dVD₆₀+Gd). Além disso, também foi realizado um experimento adicional para analisar se a alta osmolaridade dos contrastes utilizados teria influência sobre o RFG nos animais dVD₃₀. Para isso, o clearance de inulina foi mensurado 48h após a infusão de uma solução de manitol, com osmolaridade similar ao do contraste gadoterato (1.350 mOsm/kg⁻¹), em ratos dVD₃₀ (n=5).

3.4 Análise da expressão proteica de renina, angiotensinogênio (AGT) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no tecido renal pela técnica de *Western Blotting*

Para a realização da técnica de Western blotting foram utilizadas as amostras de tecido renal, previamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. A extração da proteína seguiu o protocolo descrito por Burnette, com pequenas modificações.³⁷ As amostras foram homogeneizadas (Polytron PT 10-35, *Power Control Unit*) em solução K-Hepes (20 mM Mannitol; 80 mM Hepes; 41 KOH, pH 7,5) com coquetel de inibidores de protease (*Cocktail Protease Inhibitor*, *Sigma Chemical Company*, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000g por 15 minutos a 4°C para remover núcleo, mitocôndrias e debris celulares, obtendo-se o homogenato renal. As proteínas totais dessas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando o *Kit Bio-Rad Protein Assay* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, EUA).³⁸

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE): após a quantificação de proteínas, as amostras do homogenato renal foram ressuspensas em 50 µL de tampão de amostra para eletroforese, constituído por: 62,5 mM Tris-HCl; 2,0% dodecil sulfato de sódio (SDS); 20% glicerol; 1,96% β-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol; pH 6,8. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi feita segundo Laemmli.³⁹ O gel de corrida foi constituído por 7,5% acrilamida; o de empilhamento 3% acrilamida e a espessura do gel era cerca de 1,5 mm. As amostras de proteínas renais, assim como um padrão de massa molecular de proteínas (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards*, *Bio-Rad*, CA, EUA) foram aplicados ao gel imerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM pH 7,3; glicina 192 mM). A separação das proteínas foi efetuada sob uma corrente contínua de, aproximadamente, 8 mA/gel. Quando a linha do corante azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel, a eletroforese foi interrompida.

Immunoblotting: após a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (*Immobilon-P Transfer Membrane*, *Millipore*, Billerica, MA, EUA), previamente tratada com metanol 100% por 2 minutos, água MilliQ por 2 minutos e equilibrada em tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM,

metanol 20%) por, pelo menos, 5 minutos. Para a transferência, utilizou-se um sistema tipo sanduíche (GE *Healthcare*, TE62) submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 350 mA, durante cerca de 8 horas, a 4°C. Em seguida, a membrana foi corada por 10 minutos com Ponceau (Ponceau S, Sigma) e descorada com água MilliQ até que as proteínas pudessem ser visualizadas. As posições correspondentes aos padrões de peso molecular foram marcadas para auxiliarem na identificação.

Após a transferência, a membrana foi colocada numa solução de bloqueio (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; 5% leite em pó desnatado, 0,1% Tween 20; pH 7,4) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo primário diluído em solução bloqueio: 1:1000 anti-AGT (Santa Cruz, *Biotechnology Inc.*, CA, EUA), 1:1000 anti-eNOS (BD *Transduction Laboratories*, San Jose, CA, EUA); 1:500 antirrenina (AnaSpec, Fremont, CA, EUA) ou 1:50000 antiactina (Santa Cruz, *Biotechnology Inc.*, CA, EUA), durante a noite, a 4 °C, sob leve agitação. Subsequentemente, foram feitas cinco lavagens, de 10 minutos cada, com solução bloqueio. A membrana foi, então, incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (*Life Technologies*) em solução bloqueio (1:2000) à temperatura ambiente. A membrana foi, novamente, lavada cinco vezes como acima descrito. Em seguida, adicionou-se tampão fosfato salina (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; pH 7,4) para retirar o excesso de solução bloqueio, 2 vezes durante 2 minutos e incubou-se a membrana durante 1 minuto, sob leve agitação, com ECL (reagente para imunodeteção por meio de quimiluminescência, GE *Healthcare*, *Buckinghamshire*, UK). Em seguida, a membrana foi colocada em um fotodocumentador (*ImageQuant LAS 4000*, GE *HealthCare*, Piscataway, NJ) para visualização das bandas e posterior análise dessas por densitometria utilizando o *software* IMAGEJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3.5 Avaliação do estado redox: Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis urinários e do tecido renal de TBARS, que são marcadores de peroxidação lipídica, foram determinados utilizando o ensaio do ácido tiobarbitúrico.⁴⁰ Para isso, utilizamos amostras de urina de 24h coletadas em gaiola metabólica e do tecido renal, após extração e quantificação das proteínas pelos métodos de Burnette modificado e Bradford. Essas amostras foram diluídas na proporção 1:20 (0,2mL de amostra diluída em 0,8mL de água destilada). Em seguida, foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético (TCA) a 17,5% e 1mL de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2). A solução foi levada a banho-maria por 20 minutos. Após o resfriamento em gelo, a mistura foi incubada por 20 minutos com 1mL de TCA a 70% e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. A densidade óptica do sobrenadante foi avaliada por meio da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 534 nm. A quantidade de TBARS foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os níveis urinários e do tecido renal de TBARS foram expressos em nmol/24horas e nmol/ μg de proteína, respectivamente.

A glutathiona reduzida (GSH), o principal antioxidante endógeno, foi determinada no sangue total e no tecido renal pelo método descrito por Sedlak e Lindsay (1968).⁴¹ O sangue total foi processado com a adição de ácido metafosfórico 5% e centrifugado a 14000g por 10 minutos. O ensaio consiste na reação do sobrenadante do sangue total com o reagente de Ellman, formando um pigmento amarelo que é mensurado no espectrofotômetro em 412nm. De maneira similar, uma amostra do tecido renal obtida após a extração e quantificação de proteínas foi utilizada para reação do ensaio acima. Os níveis da GSH sérica e do tecido renal foram quantificados pela média da curva padrão e expressos em $\mu\text{mol/mL}$ e $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ de proteína, respectivamente.

3.6 Análise histomorfométrica e imuno-histoquímica

Amostras de tecido renal embebidas em parafina e cortadas em secções de 4 μm foram coradas pela reação de hematoxilina-eosina (HE) para avaliação do escore de lesão tubular. Entre 40 a 60 campos medindo 0,245 mm^2 foram, sequencialmente, analisados sob microscopia de luz. Cada campo foi estratificado quanto ao percentual de injúria tubular baseado nos achados de edema celular, degeneração vacuolar, necrose e descamação, e divididos em escores que variavam de 0 a 4, de acordo com o seguinte critério: < 5% de injúria tubular, escore 0; 5-25%, escore I; 25-50%, escore II; 50-75%, escore III e > 75%, escore IV. O escore médio para cada rato foi calculado e o escore médio de cada grupo foi expresso em gráfico.

A análise imuno-histoquímica foi realizada para avaliar a infiltração de macrófagos no tecido renal por meio da marcação de células ED1 positivas. Os cortes parafinados de 4 μm do tecido renal foram incubados com anticorpo monoclonal para ED1 (1:100 overnight a 4°C; AbD Serotec, Oxford, UK). O produto dessa reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (*Vector Laboratories Burlingame, CA, EUA*) e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. Entre 40 a 60 campos de 0,087 mm^2 foram analisados sob microscopia de luz e a média do número de células ED1 positivas para cada animal foi calculada. O resultado foi expresso como a média do número de células ED1 positivas/ mm^2 por grupo.

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada pela análise de variância *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Quando apropriado, o teste t não pareado foi utilizado para comparar os grupos Sham e dVD₃₀. Todas as análises foram realizadas por meio do

programa *GraphPad Prism 5* e foram expressas em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da deficiência de vitamina D nos ratos

Não foram observadas diferenças no consumo diário de água e ração, assim como do peso corporal (PC) entre os ratos mantidos em dieta padrão ou livre de vitamina D após 30 dias de seguimento. Como exposto na Tabela 1, os ratos dVD₃₀ tiveram níveis séricos de 25(OH)D total (25OHD₂ e 25OHD₃) significativamente menor quando comparados aos animais do grupo Sham, demonstrando a efetividade do nosso modelo. Por outro lado, as concentrações plasmáticas de cálcio iônico e fósforo foram similar entre esses dois grupos. A Tabela 1 também mostra que, no grupo dVD₃₀, os níveis de PAm e RVR foram mais elevados, enquanto o RFG reduziu quando comparado ao grupo Sham.

Tabela 1 – Parâmetros funcionais, hemodinâmicos e bioquímicos e avaliação do estado redox sistêmico e urinário dos animais alimentados com dieta padrão (Sham) ou livre de vitamina D por 30 dias (dVD₃₀)

Grupos	Sham	dVD ₃₀	Valor P
Peso corporal (g)	278±5	279±4	0.92
RFG (mL/min/100gPC)	0,94±0,04	0,84±0,01	<0,05
PA _m (mmHg)	114±2	132±2	<0,001
RVR (mmHg/mL/min)	20,5±0,3	23,8±0,3	<0,001
GSH _s (μmol/min)	2,68±0,14	2,28±0,06	<0,05
TBARS _u (nmol/24h)	110±11	184±26	<0,05
Cálcio iônico plasmático (mg/dL)	4,15±0,1	4,0±0,1	0,23
Fósforo plasmático (mg/dL)	7,7±0,4	8,0±0,4	0,51
*Níveis séricos de 25(OH)D (ng/mL)	44,87±1,7	3,96±0,8	<0,001

RFG, ritmo de filtração glomerular; PAm, pressão arterial média; RVR, resistência vascular renal; GSH_s, níveis de glutathiona sérica; TBARS_u, níveis urinários de substâncias reativas ao

ácido tiobarbitúrico. Valores expressos em média $\pm$ EPM. n=12 ratos/grupo.*n=9 (Sham) e n=11 (dVD₃₀).

Os ratos alimentados com dieta livre de vitamina D apresentaram aumento da expressão proteica de renina (154 ± 10 vs. $100 \pm 8\%$, $p < 0.01$, Figura 1) e de AGT (128 ± 9 vs. $100 \pm 3\%$, $p < 0.05$) no tecido renal em relação ao Sham, confirmando estudos prévios que demonstraram que a vitamina D é um inibidor do sistema renina angiotensina intrarrenal.^{42,43}

Figura 1 – A deficiência de vitamina D aumenta a expressão proteica de renina no tecido renal. Densitometria e representação gráfica da análise por *immunoblotting* da expressão proteica relativa de renina no tecido renal de ratos alimentados com dieta padrão (Sham) ou livre de vitamina D por 30 dias (dVD₃₀). Amostras equivalentes do homogenato renal (150 μ g) foram adicionadas ao gel de SDS-PAGE e transferidas à membrana de PVDF. Os “blots” foram incubados com os anticorpos primários contra renina (1:1.000) ou actina (1:50.000). Valores expressos em média $\pm$ EPM. n=4 ratos/grupo. ^a $p < 0.01$ vs. Sham.

O desequilíbrio do estado redox, ou seja, a presença de estresse oxidativo, foi observado nos ratos dVD₃₀, visto que esses animais apresentaram menores níveis séricos da GSH e maiores níveis urinários de TBARS (Tabela 1). Além disso, no tecido renal, menores níveis da GSH e uma tendência ao aumento do TBARS ($p=0.1$ vs. Sham) foram encontrados nos ratos dVD₃₀ (Figura 2), elevando significativamente a razão TBARS/GSH.

4.2 Efeitos dos meios de contraste radiológicos nos ratos deficientes em vitamina D

Como observado na Tabela 2, o clearance de inulina no grupo CI não diferiu do grupo Sham, assim como a PAm e a RVR. O estado redox, analisado pelos níveis urinário e renal de TBARS, e pelos níveis sérico e renal da GSH foi similar entre os grupos Sham e CI (Tabela 2 e Figura 2A-B). Adicionalmente, a Figura 3A mostra que a expressão proteica no tecido renal de AGT também não variou, entretanto, a expressão renal da eNOS foi significativamente maior no grupo CI quando comparado ao Sham (Figura 3B). Diante disso, esses dados sugerem que os animais mantidos alimentados com dieta padrão não apresentaram alterações na hemodinâmica da medula renal após exposição ao diatrizoato 76%, preservando o RFG.

No grupo dVD₃₀+CI, entretanto, o RFG reduziu significativamente em relação aos animais dos grupos CI e dVD₃₀. Este resultado foi associado a um aumento mais acentuado dos níveis urinários de TBARS e a menores níveis da GSH sérica em relação aos encontrados no grupo dVD₃₀ (Tabela 2). De maneira similar, os níveis de TBARS no tecido renal também foram maiores nos ratos dVD₃₀+CI e os níveis da GSH tecidual mantiveram-se baixos (Figura 2A-B), demonstrando um pronunciado desequilíbrio da razão TBARS/GSH. Além disso, conforme observado na Figura 3A, a expressão renal de AGT aumentou marcadamente no grupo dVD₃₀+CI quando comparado aos grupos CI ($86\pm 19\%$, $p<0,001$) e dVD₃₀ ($64\pm 21\%$, $p<0,01$). Inversamente, a expressão proteica renal da eNOS foi menor no grupo

dVD₃₀+CI em relação aos grupos CI (64±15%, p<0,001) e dVD₃₀ (49±7%, p<0,001) (Figura 3B). O grupo dVD₃₀+CI apresentou PAm e RVR similares ao grupo dVD₃₀, porém maior quando comparado ao grupo CI (Tabela 2).

Um grupo adicional de animais mantidos em dieta livre de vitamina D por 60 dias foi estudado (dVD₆₀). Esses ratos demonstraram níveis séricos de 25(OH)D total de 3,48±0,35 ng/dL. A infusão do contraste iodado nos ratos dVD₆₀ induziu uma redução mais pronunciada do RFG comparada ao grupo dVD₃₀+CI (0,48±0,04 vs. 0,64±0,03 mL/min/100g PC, p<0,01), sugerindo que, quanto mais prolongada é a dVD, maior será o impacto do contraste na queda do clearance de inulina.

Tabela 2 – Efeito da infusão dos contrastes iodado e de gadolínio nos grupos Sham e dVD₃₀. Avaliação dos parâmetros funcionais e hemodinâmicos, e do estado redox sistêmico e urinário.

Grupos	RFG	PA _m	RVR	GSH _s	TBARS _u
	(mL/min/100gPC)	(mmHg)	(mmHg/mL/min)	(μmol/mL)	(nmol/24h)
Sham	0,94±0,04	114±2	20,5±0,3	2,68±0,14	110±11
CI	0,91±0,03	121±2	21,5±0,4	2,33±0,06	152±8
Gd	0,92±0,03	116±2	21,1±0,3	2,44±0,13	168±24
dVD₃₀	0,84±0,01	132±2	23,8±0,3	2,28±0,06	184±26
dVD₃₀+CI	0,64±0,03 ^{c i}	131±2 ^b	23,8±0,3 ^b	2,03±0,05 ^{a g}	303±52 ^{b h}
dVD₃₀+Gd	0,60±0,03 ^{f i}	132±2 ^h	24,1±0,3 ^h	2,04±0,05 ^d	310±42 ^{e h}

RFG, ritmo de filtração glomerular; PAm, pressão arterial média; RVR, resistência vascular renal; GSH_s, níveis de glutathiona sérica; TBARS_u, níveis urinários de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico dos ratos alimentados com dieta padrão (Sham) ou livre de vitamina D por 30 dias (dVD₃₀) após infusão dos contrastes iodado ou gadolínio. Valores expressos em média ± EPM. n=12 ratos/grupo. ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001 vs. CI; ^dp<0,05, ^ep<0,01, ^fp<0,001 vs. Gd; ^gp<0,05, ^hp<0,01, ⁱp<0,001 vs. dVD₃₀.

Figura 2 – Efeito da infusão dos contrastes iodado e de gadolínio nos ratos Sham e dVD30 sobre o estado redox do tecido renal. Concentração renal dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, marcador de peroxidação lipídica) e do antioxidante glutathione (GSH) após infusão dos contrastes iodado e de gadolínio nos ratos alimentados com dieta padrão ou livre de vitamina D por 30 dias. (A) Concentração de GSH e (B) de TBARS no homogenato renal após infusão do contraste iodado. (C) Concentração de GSH e (D) de TBARS no homogenato renal após infusão do contraste de gadolínio. Valores expressos em média $\pm$ EPM. $n = 8$ ratos/grupo. ^a $p < 0,01$ vs. Sham; ^b $p < 0,01$ vs. CI; ^c $p < 0,01$ vs. CI or dVD₃₀; ^d $p < 0,05$ vs. Sham; ^e $p < 0,05$ vs. Gd; ^f $p < 0,01$ vs. Gd ou dVD₃₀.

A infusão do contraste à base de gadolínio gadoterato não alterou o RFG, a PAm e a RVR, assim como o estado redox dos ratos alimentados com dieta padrão (Tabela 2 e Figura 2C-D). Ocorreu uma tendência ao aumento da expressão proteica de AGT no tecido renal no grupo Gd comparado ao Sham, entretanto, sem diferença estatística (138 ± 18 vs. $100 \pm 3\%$, Figura 4A). Por outro lado, a infusão do gadoterato aumentou de forma significativa a expressão renal da eNOS no grupo Gd ($139 \pm 11\%$ vs. $100 \pm 3\%$ no grupo Sham, $p < 0,05$) (Figura 4B).

No grupo dVD₃₀+Gd, o RFG reduziu significativamente comparado aos grupos dVD₃₀ e Gd. Essa redução do clearance de inulina foi vinculada a maiores níveis urinário e renal de TBARS, e a menores da GSH sérica (Tabela 2 e Figura 2D). A concentração renal da GSH, no grupo dVD₃₀+Gd, foi menor quando comparada ao grupo Gd, porém não diferiu dos animais dVD₃₀ (Figura 2C). Entretanto, o desequilíbrio da razão TBRAS/GSH foi acentuadamente elevada no grupo dVD₃₀+Gd. A expressão proteica de AGT no tecido renal aumentou nos ratos dVD₃₀+Gd comparados aos dVD₃₀ ($58\pm 29\%$, $p<0,05$) e Gd ($68\pm 26\%$, $p<0,05$) (Figura 4A). A expressão da eNOS, em contrapartida, reduziu nos animais dVD₃₀+Gd em relação aos grupos dVD₃₀ ($46\pm 14\%$, $p<0,05$) e Gd ($43\pm 16\%$, $p<0,01$) (Figura 4B).

A infusão do contraste à base de gadolínio em animais mantidos com dieta livre de vitamina D por 60 dias (dVD₆₀+Gd), de maneira similar ao ocorrido com o contraste iodado, acarretou uma queda mais acentuada no clearance de inulina ($0,46\pm 0,04$ vs. $0,64\pm 0,03$ mL/min/100g PC no grupo dVD₃₀+Gd, $p<0,01$).

Os animais dVD₃₀ também foram submetidos à infusão de uma solução de manitol, com osmolaridade similar ao contraste gadoterato de meglumina (1350mosm/kg^{-1}), porém, não houve alteração do clearance de inulina ($0,83\pm 0,05$ vs. $0,84\pm 0,01$ mL/min/100g PC no grupo dVD₃₀, $p=0,83$). Esse resultado inviabiliza a possibilidade da toxicidade osmótica estar relacionada às alterações funcionais e moleculares encontradas nos grupos dVD₃₀+Cl e dVD₃₀+Gd.

Figura 3 – Efeito da infusão do contraste iodado nos animais Sham e dVD₃₀ sobre a expressão proteica de angiotensinogênio (AGT) e de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) do tecido renal. Densitometria e representação gráfica da análise por *immunoblotting* da expressão proteica de (A) AGT e (B) eNOS nos ratos alimentados com dieta padrão (Sham) ou livre de vitamina D (dVD₃₀) após infusão do contraste iodado. Amostras equivalentes do homogenato renal (100 µg para AGT e 150 µg para eNOS) foram adicionadas ao gel de SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF. Os “blots” foram incubados com os anticorpos primários contra AGT (1:1.000) ou eNOS (1:500). A expressão de actina (1:50.000) foi utilizada como controle. Valores expressos em média ± EPM. n=6 ratos/grupo. ^ap<0,001 vs. CI; ^bp<0,01 vs dVD₃₀; ^cp<0,001, ^dp<0,01 vs. Sham; ^ep<0,001 vs. CI; ^fp<0,001 vs. dVD₃₀.

Figura 4 – Efeito da infusão do contraste de gadolínio nos animais Sham e dVD₃₀ sobre a expressão proteica de angiotensinogênio (AGT) e de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) do tecido renal. Densitometria e representação gráfica da análise por *immunoblotting* da expressão proteica de (A) AGT e (B) eNOS nos ratos alimentados com dieta padrão (Sham) ou livre de vitamina D (dVD₃₀) após infusão do contraste gadolínio. Amostras equivalentes do homogenato renal (100 µg para AGT ou 150 µg para eNOS) foram adicionadas ao gel de SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF. Os “blots” foram incubados com os anticorpos primários contra AGT (1:1.000) e eNOS (1:500). A expressão de actina (1:50.000) foi utilizada como controle. Valores expressos em média ± EPM. n=6 ratos/grupo. ^ap<0,05 vs. Gd or dVD₃₀; ^bp<0,05, ^cp<0,01 vs. Sham; ^dp<0,05 vs. Gd; ^ep<0,01 vs. dVD₃₀.

A histologia renal foi analisada para determinar se a redução no RFG, que ocorreu nos ratos dVD₃₀ após a infusão dos contrastes, foi acompanhada por alterações na morfologia renal. Como ilustrado na Figura 5A, o percentual de injúria tubular foi baixo em todos os grupos (<5% de lesão tubular, i.e. score 0) e não houve diferença estatística entre os seis grupos. Adicionalmente, o número de células ED1 positivas também não foi afetado pela infusão de ambos contrastes e/ou pela dieta livre de vitamina D (Figura 5B), sugerindo que a inflamação não esteve associada à injúria renal aguda nesse modelo experimental.

Figura 5 – Escore de injúria tubular e quantificação da infiltração de macrófagos no tecido renal dos animais Sham e dVD₃₀ após infusão dos contrastes iodado e de gadolínio. (A) Escore de injúria tubular. (B) Infiltrado de macrófagos no tecido renal representado pelo número de células ED1 positivas por mm². Valores expressos em média $\pm$ EPM. n=5-7 ratos/grupo.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos, pela primeira vez, que a dVD é um potencial fator de risco para nefrotoxicidade induzida por contrastes iodado e à base de gadolínio em ratos. Os resultados indicam que a redução do RFG nos animais dVD₃₀, após exposição aos contrastes, está acoplada a uma inter-relação entre o SRA, eNOS e o estresse oxidativo no tecido renal. Esses resultados têm grande relevância considerando uma possível aplicabilidade clínica, visto a frequente realização de exames radiológicos contrastados, a elevada prevalência atual da dVD na população em geral e a segurança atribuída aos contrastes à base de gadolínio.

Como citado anteriormente, a presença de animais pré-condicionados são essenciais para intensificar o insulto dos contrastes na medula renal, anulando os mecanismos compensatórios que preservariam o RFG. Uninefrectomia, depleção de sal, indução de hipercolesterolemia, desidratação e/ou administração de drogas que induzem vasoconstrição, como os anti-inflamatórios, ou que inibem a vasodilatação renal, como L-nitro-arginina metil ester (L-NAME), são as condições mais utilizadas para induzir NIC experimentalmente.^{21,22,33} Em animais saudáveis e na ausência dessas condições, não há alteração do RFG após exposição aos contrastes. Diante disso, é importante destacar que, em nosso modelo experimental, não utilizamos animais pré-condicionados e, mesmo assim, os ratos dVD₃₀ evoluíram com IRA após infusão dos contrastes, o que reforça a dVD como um fator predisponente à nefrotoxicidade.

A disfunção endotelial na vasa recta descendente da medula renal consiste no mecanismo-chave para a NIC.⁴⁴ O fluxo sanguíneo nessa região é dependente da interação de diversas substâncias vasoativas sobre células contráteis que permeiam as vasa recta, chamadas de pericitos. A endotelina, angiotensina II e as ERO exercem efeito vasoconstrictor sobre essas células enquanto o NO e as prostaglandinas exercem importante papel na

vasodilatação e oxigenação da medula renal, evitando a injúria pela hipóxia.⁴⁵⁻⁴⁷ A exemplo, uma inibição da eNOS no tecido renal, que tem se mostrado estar diretamente acoplada à ativação do SRA, desencadeia redução do fluxo sanguíneo renal associado ao aumento da RVR e consequente redução do RFG.⁴⁴ Assim, a injúria renal pelos contrastes se faz por meio do desequilíbrio entre as substâncias vasoativas na medula renal, favorecendo a vasoconstrição e hipóxia, associado à formação de ERO.^{21,22}

Neste cenário, vários estudos têm associado a dVD com a ativação do SRA, a hipertensão arterial, ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial.^{25,42,48,49} Tarcin *et al.* demonstraram, por meio da medida de dilatação mediada por fluxo e níveis séricos de TBARS, que a dVD está associada à disfunção endotelial e ao aumento da peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis.²⁴ Em cultura de células, a 1,25-dihidroxicolecalciferol induziu a produção de NO pelo aumento da atividade e da expressão do mRNA da eNOS.^{50,51} Outros estudos experimentais demonstraram que a vitamina D reduz a expressão da subunidade p22phox da NADPH oxidase e diminui o estresse oxidativo.^{48,52} Adicionalmente, a vitamina D aumenta a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da GSH, como a glutamato cisteína ligase e a glutatona redutase, além de estimular o sistema tioredoxin, participando, assim, da biossíntese do principal antioxidante endógeno.^{25,53}

Nossos resultados demonstram que os ratos dVD apresentam diferenças no estado basal em relação àqueles alimentados com dieta padrão. Foi observado que os animais dVD₃₀ têm maior PAm e RVR, e níveis mais elevados da expressão de renina e AGT no tecido renal, além de já esboçarem redução do RFG. Porém, os níveis plasmáticos de cálcio e fósforo foram similares entre os grupos Sham e dVD₃₀, reforçando os achados em estudos prévios de que a regulação do SRA intrarrenal pela vitamina D é independente dos níveis de cálcio, fósforo e paratormônio.^{43,54} Além disso, o grupo dVD₃₀ apresentou menor concentração da GSH renal e sérica, e maiores níveis de TBARS urinário, indicando o potente efeito

antioxidante da vitamina D. A elevação da expressão proteica da eNOS no grupo dVD₃₀ representa um provável mecanismo compensatório que é observado em situações de disfunção endotelial induzidas por hipertensão arterial e estresse oxidativo, com objetivo de contrabalancear uma redução da biodisponibilidade de NO.⁵⁵ Importante enfatizar que, nessas condições, a oxidação do cofator BH4 da eNOS, pelo peroxinitrito, pode desacoplar a redução do oxigênio na síntese de NO para a produção de superóxido, a chamada “eNOS desacoplada”, aumentando a formação de radicais superóxido.^{55,56} Portanto, observando essas alterações nos animais dVD, suponhamos que esses poderiam ser susceptíveis à injúria renal dos meios de contrastes.

Os animais alimentados com dieta padrão expostos aos contrastes diatrizoato e gadoterato não apresentaram um desequilíbrio do estado redox, aumentaram a expressão proteica renal da eNOS e, por fim, não alteraram o clearance de inulina quando comparados ao grupo Sham. Esses dados sugerem, fortemente, a necessidade de um insulto adicional ou um fator de risco para indução da nefrotoxicidade. Em contrapartida a esses resultados, os ratos dVD₃₀ desenvolveram uma IRA após a infusão dos meios de contrastes.

A queda do RFG nos grupos dVD₃₀+CI e dVD₃₀+Gd esteve associada com uma elevação da expressão de AGT renal, acompanhada por significativa redução da expressão renal da eNOS. Corroborando nosso achado, Goodman *et al.* também observaram redução da eNOS renal na IRA ocasionada pelo contraste iodado iotalamato de sódio em ratos uninefrectomizados.⁵⁷ Além disso, a hipóxia é um conhecido mecanismo que inibe a expressão da eNOS.⁵⁸ Portanto, a redução da expressão renal da eNOS encontrada nos grupos dVD₃₀+CI e dVD₃₀+Gd suportam a presença de hipóxia medular e IRA gerada pelos contrastes na condição de dVD. Adicionalmente, os animais mantidos em dieta livre de vitamina D por 60 dias e expostos a ambos os meios de contraste, apresentaram uma queda mais pronunciada do clearance de inulina quando comparado aos grupos dVD₃₀+CI e dVD₃₀+Gd. Os níveis séricos de 25(OH)D total dos animais

mantidos em dieta livre de vitamina D por 30 e 60 dias foram similares. Esses dados sugerem que, quanto mais prolongado o período da dVD, maior o impacto dos contrastes no RFG.

A geração de ERO favorece a vasoconstrição renal por estimular o SRA e diminuir a produção de NO, reduzindo o fluxo sanguíneo na medula renal, além de induzir toxicidade tubular direta.^{22, 59} Em acordo, encontramos um acentuado aumento dos níveis de TBARS urinário e renal nos grupos dVD₃₀+CI e dVD₃₀+Gd associado às reduzidas concentrações da GSH sérica e renal nesses grupos, determinando um marcado desequilíbrio do estado redox indicado pelo aumento da razão TBARS/GSH.

Importante ponto a ser ressaltado refere-se à redução do RFG observado nos ratos dVD₃₀ que receberam contraste à base de gadolínio, agentes que têm sido utilizados como originalmente seguros em relação à nefrotoxicidade. Porém, a diminuição do RFG após o uso desses agentes tem sido relatada em pacientes com alto risco para desenvolver NIC, especialmente aqueles que apresentam disfunção renal preexistente.^{60, 61} Esses achados estão em consonância com estudo prévio conduzido em nosso laboratório em que ficou demonstrado que ratos submetidos à nefrectomia 5/6 (um modelo experimental de DRC) desenvolveram NIC após uso de contraste com gadolínio.¹⁸ O resultado do presente trabalho enfatiza o potencial efeito nefrotóxico do gadolínio e sugere que a dVD pode ser um agravante no contexto desta injúria renal.

A existência de alterações na morfologia renal na NIC é variável e controversa. Muitos investigadores não têm encontrado alterações na histologia renal, enquanto outros demonstraram a presença de vacuolizações nas células do túbulo proximal que parecem não se correlacionar com o grau da disfunção renal.^{22,62-64} Em nosso estudo, o escore de injúria tubular, após a infusão dos contrastes iodado e à base de gadolínio, foi baixo em todos os grupos, enfatizando que a alteração na hemodinâmica renal é o mecanismo primário envolvido na queda do RFG. Além disso, a infiltração de macrófagos também foi similar entre os grupos,

sugerindo que a inflamação não contribuiu na IRA nesse modelo experimental.

Um outro questionamento foi avaliar se a alta osmolaridade dos contrastes utilizados estaria envolvida na redução do RFG dos animais dVD₃₀. O efeito da osmolaridade dos contrastes como uma propriedade que impactaria na redução do RFG tem sido questionada e não tem se confirmado de maneira convincente nas metanálises.⁷ Os estudos experimentais também são controversos. O impacto da alta osmolaridade no fluxo sanguíneo e na oxigenação da medula renal parece ser consistente apenas quando as soluções são infundidas diretamente na artéria renal.⁷ Entretanto, estudos com cultura de células renais não têm demonstrado alterações na viabilidade celular ou na indução de apoptose com soluções equivalentes de alta osmolaridade, além de outros experimentos não terem encontrado modificações do RFG com a infusão intravenosa dessas soluções, sugerindo, assim, toxicidade química.⁶⁵⁻⁶⁷ Em nosso experimento, o clearance de inulina não se alterou após infusão venosa de solução de manitol nos animais dVD₃₀, indicando que a redução do RFG nos grupos dVD₃₀+CI e dVD₃₀+Gd não esteve associada com a alta osmolaridade desses contrastes, corroborando com a injúria por quimiotoxicidade.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado, podemos demonstrar que a dVD em ratos é uma condição que predispõe à nefrotoxicidade de ambos contrastes, iodado e de gadolínio, em parte, devido ao estresse oxidativo e à ativação intrarrenal do SRA. Assim, seria aconselhável manter níveis adequados de vitamina D em pacientes candidatos a serem submetidos a exames radiológicos contrastados, inclusive com contrastes à base de gadolínio. Visando ao impacto que esses resultados teriam na prática clínica, a aplicabilidade translacional desse experimento para um estudo clínico seria de grande relevância.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- 1 Cronin RE. Contrast-induced nephropathy: pathogenesis and prevention. *Pediatr Nephrol*. 2010;25:191-204.
- 2 Golshahi J, Nasri H, Gharipour M. Contrast-induced nephropathy; A literature review. *J Nephropathol*. 2014;3:51-6.
- 3 Rihal CS, Textor SC, Grill DE, Berger PB, Ting HH, Best PJ, Singh M, Bell MR, Barsness GW, Mathew V, Garratt KN, Holmes DR Jr. Incidence and prognostic importance of acute renal failure after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2002;105:2259-64.
- 4 Nikolsky E, Mehran R, Turcot D, Aymong ED, Mintz GS, Lasic Z, Lansky AJ, Tsounias E, Moses JW, Stone GW, Leon MB, Dangas GD. Impact of chronic kidney disease on prognosis of patients with diabetes mellitus treated with percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2004;94:300-5.
- 5 Abaci O, Harmankaya O, Kocas B, Bostan C, Coskun U, Yildiz A, Ersanli M. Long-term follow-up of patients at high risk for nephropathy after contrast exposure. *Angiology*. 2014.
- 6 Katsiki N, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Contrast-induced nephropathy: an "all or none" phenomenon? *Angiology*. 2014.
- 7 Bucher AM, De Cecco CN, Schoepf UJ, Meinel FG, Krazinski AW, Spearman JV, McQuiston AD, Wang R, Bucher J, Vogl TJ, Katzberg RW. Is contrast medium osmolality a causal factor for contrast-induced nephropathy? *Biomed Res Int*. 2014;2014:931413.
- 8 Seeliger E, Flemming B, Wronski T, Ladwig M, Arakelyan K, Godes M, Möckel M, Persson PB. Viscosity of contrast media perturbs renal hemodynamics. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18: 2912-20.
- 9 Liss P, Persson PB, Hansell P, Lagerqvist B. Renal failure in 57 925 patients undergoing coronary procedures using iso-osmolar or low-osmolar contrast media. *Kidney Int*. 2006;70:1811-7.

- 10 Ueda J, Nygren A, Hansell P, Erikson U. Influence of contrast media on single nephron glomerular filtration rate in rat kidney. A comparison between diatrizoate, iohexol, ioxaglate, and iotrolan. *Acta Radiol.* 1992;33:596-9.
- 11 Perazella MA. Gadolinium-contrast toxicity in patients with kidney disease: nephrotoxicity and nephrogenic systemic fibrosis. *Curr Drug Saf.* 2008;3:67-75.
- 12 Perazella MA. Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:461-9.
- 13 Nyman U, Elmståhl B, Leander P. Suggesting gadolinium-based contrast media for CT in azotemic patients is not based on historical, clinical, and experimental data. *Radiology.* 2007;244:622-3.
- 14 Thomsen HS. Gadolinium-based contrast media may be nephrotoxic even at approved doses. *Eur Radiol.* 2004;14:1654-6.
- 15 Akgun H, Gonlusen G, Cartwright J, Suki WN, Truong LD. Are gadolinium-based contrast media nephrotoxic? A renal biopsy study. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:1354-7.
- 16 Elmståhl B, Nyman U, Leander P, Chai CM, Frennby B, Almén T. Gadolinium contrast media are more nephrotoxic than a low osmolar iodine medium employing doses with equal X-ray attenuation in renal arteriography: an experimental study in pigs. *Acad Radiol.* 2004;11:1219-28.
- 17 Nyman U, Elmståhl B, Nilsson M. The dogma that gadolinium contrast media are less nephrotoxic than iodine agents for X-ray angiography is a misconception. *Heart Vessels.* 2007;22:211-2; author reply 212-3.
- 18 Pereira LV, Shimizu MH, Rodrigues LP, Leite CC, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine protects rats with chronic renal failure from gadolinium-chelate nephrotoxicity. *PLoS One.* 2012;7:e39528.
- 19 Thomsen HS, Almén T, Morcos SK, (ESUR) CMSCOTESOUR. Gadolinium-containing contrast media for radiographic examinations: a position paper. *Eur Radiol.* 2002;12:2600-5.
- 20 Owen RJ, Hiremath S, Myers A, Fraser-Hill M, Barrett BJ. Canadian Association of Radiologists consensus guidelines for the prevention of contrast-induced nephropathy: update 2012. *Can Assoc Radiol J.* 2014;65:96-105.

- 21 Wong PC, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Int J Cardiol*. 2011.
- 22 Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:288-96.
- 23 Mehran R, Aymong ED, Nikolsky E, *et al*. A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1393-9.
- 24 Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, Toprak A, Yazici D, Sancak S, Deyneli O, Akalin S. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4023-30.
- 25 Argacha JF, Egrise D, Pochet S, Fontaine D, Lefort A, Libert F, Goldman S, van de Borne P, Berkenboom G, Moreno-Reyes R. Vitamin D deficiency-induced hypertension is associated with vascular oxidative stress and altered heart gene expression. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;58:65-71.
- 26 Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, Li YC. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288: E125-32.
- 27 Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39: 243-253, table of contents.
- 28 Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int*. 2010;78:140-5.
- 29 Wang C. Role of vitamin d in cardiometabolic diseases. *J Diabetes Res*. 2013;2013:243934.
- 30 Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:471-8.
- 31 Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MC, Sassaki AL, dos Reis LM, Jorgetti V, Moysés RM. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? *Clin Nutr*. 2010;29:784-8.

- 32 Haylor J, Schroeder J, Wagner B, Nutter F, Jestin G, Idée JM, Morcos S. Skin gadolinium following use of MR contrast agents in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Radiology*. 2012;263:107-16.
- 33 Andrade L, Campos SB, Seguro AC. Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: protective role of L-arginine. *Kidney Int*. 1998;53:1736-42.
- 34 Cartilha de Orientação de Descarte de Resíduo no Sistema FMUSP-HC. Available from: http://medicina.fm.usp.br/gdc/docs/grss_2_cartilha.pdf.
- 35 Refaat B, Ashour TH, El-Shemi AG. Ribavirin induced anaemia: the effect of vitamin D supplementation on erythropoietin and erythrocyte indices in normal Wistar rat. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7:2667-76.
- 36 Levy J, Teitelbaum SL, Gavin JR, Fausto A, Kurose H, Avioli LV. Bone calcification and calcium homeostasis in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by streptozocin. *Diabetes*. 1985;34:365-72.
- 37 Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112:195-203.
- 38 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- 39 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
- 40 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-8.
- 41 Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192-205.
- 42 Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;110:229-38.

- 43 Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2008;74:170-9.
- 44 Beierwaltes WH. Endothelial dysfunction in the outer medullary vasa recta as a key to contrast media-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304:F31-2.
- 45 Pallone TL, Zhang Z, Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284:F253-66.
- 46 Brezis M, Heyman SN, Dinour D, Epstein FH, Rosen S. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest.* 1991;88:390-5.
- 47 Cao C, Edwards A, Sendeski M, Lee-Kwon W, Cui L, Cai CY, Patzak A, Pallone TL. Intrinsic nitric oxide and superoxide production regulates descending vasa recta contraction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299:F1056-64.
- 48 Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J.* 2012.
- 49 Tare M, Emmett SJ, Coleman HA, Skordilis C, Eyles DW, Morley R, Parkinson HC. Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. *J Physiol.* 2011;589:4777-86.
- 50 Molinari C, Uberti F, Grossini E, Vacca G, Carda S, Invernizzi M, Cisari C. 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27:661-8.
- 51 Talmor Y, Golan E, Benchetrit S, Bernheim J, Klein O, Green J, Rashid G. Calcitriol blunts the deleterious impact of advanced glycation end products on endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:F1059-64.
- 52 Hirata M, Serizawa K, Aizawa K, Yogo K, Tashiro Y, Takeda S, Moriguchi Y, Endo K, Fukagawa M. 22-Oxacalcitriol prevents progression of endothelial dysfunction through antioxidative effects in rats with type 2 diabetes and early-stage nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:1166-74.

- 53 Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437:7-11.
- 54 Kong J, Qiao G, Zhang Z, Liu SQ, Li YC. Targeted vitamin D receptor expression in juxtaglomerular cells suppresses renin expression independent of parathyroid hormone and calcium. *Kidney Int*. 2008;74:1577-81.
- 55 Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;36:957-64.
- 56 Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch*. 2010;459:923-39.
- 57 Goodman AI, Olszanecki R, Yang LM, Quan S, Li M, Omura S, Stec DE, Abraham NG. Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Int*. 2007;72:945-53.
- 58 McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol*. 1994;267:H1921-7.
- 59 Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, Burnett JC. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 1990;258:F115-120.
- 60 Perazella MA. Gadolinium-contrast toxicity in patients with kidney disease: nephrotoxicity and nephrogenic systemic fibrosis. *Curr Drug Saf*. 2008;3:67-75.
- 61 Buhaescu I, Izzedine H. Gadolinium-induced nephrotoxicity. *Int J Clin Pract*. 2008;62:1113-8.
- 62 Barrett BJ. Contrast nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 1994;5: 125-37.
- 63 Katzberg RW, Pabico RC, Morris TW, *et al*. Effects of contrast media on renal function and subcellular morphology in the dog. *Invest Radiol*. 1986;21:64-70.

- 64 Vari RC, Natarajan LA, Whitescarver SA, Jackson BA, Ott CE. Induction, prevention and mechanisms of contrast media-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 1988;33:699-707.
- 65 Hardiek K, Katholi RE, Ramkumar V, Deitrick C. Proximal tubule cell response to radiographic contrast media. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:F61-70.
- 66 Romano G, Briguori C, Quintavalle C, Zanca C, Rivera NV, Colombo A, Condorelli G. Contrast agents and renal cell apoptosis. *Eur Heart J.* 2008;29:2569-76.
- 67 Yao K, Heyne N, Erley CM, Risler T, Osswald H. The selective adenosine A1 receptor antagonist KW-3902 prevents radiocontrast media-induced nephropathy in rats with chronic nitric oxide deficiency. *Eur J Pharmacol.* 2001;414:99-104.

MANUSCRITO SUBMETIDO

American Journal Physiology - Regulatory,
Integrative and Comparative Physiology

Vitamin D deficiency is a potential risk factor for contrast-induced nephropathy

Weverton M. Luchi^{1,2}, Maria Heloisa M. Shimizu¹, Daniele Canale¹, Pedro Henrique F. Gois¹, Ana Carolina de Bragança¹, Rildo A. Volpini¹, Adriana C.C. Girardi³ and Antonio C. Seguro¹.

¹Medical Investigation Laboratory 12 (LIM-12), Division of Nephrology, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil.

²Division of Nephrology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil.

³Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil.

Manuscript classification: Original Basic Research

Running Head: Vitamin D deficiency and Contrast-induced Nephropathy

Key Words: vitamin D deficiency; contrast-induced nephropathy; oxidative stress; renin-angiotensin system; gadolinium.

Address for reprint requests and other correspondence: WM Luchi, Division of Nephrology, Univ. of São Paulo School of Medicine, Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3310, CEP 01246-903, São Paulo, Brazil. Email: wmluchi@usp.br

Abstract

Vitamin D deficiency (VDD) is widespread in the general population. Iodinated (IC) and Gadolinium (Gd) contrasts may decrease renal function in high-risk patients. This study tested the hypothesis that VDD is a predisposing factor for IC and Gd contrast media nephrotoxicity. To this end, male Wistar rats were fed standard or vitamin D-free diet for 30 days (VDD₃₀). Then, IC (diatrizoate 76%), Gd (gadoterate meglumine) or saline were administered intravenously and six experimental groups were obtained: Sham, IC, Gd, VDD₃₀, VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd. Renal hemodynamics, redox status, histological and immunoblot analysis were evaluated 48h after contrast or vehicle infusion. Compared to Sham, VDD₃₀ rats presented lower levels of total serum 25(OH)D and higher renal renin and angiotensinogen protein expression. Inulin clearance-based estimated GFR was not different among Sham, IC and Gd groups. However, GFR was significantly reduced in VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd groups and this reduction was associated with higher renal angiotensinogen and lower eNOS abundance combined with higher kidney thiobarbituric acid reactive substances and lower glutathione levels. Conversely, worsening of renal function was not accompanied by abnormalities on kidney structure or increased infiltration of inflammatory cells. Rats on a VDD for 60 days displayed a greater fall in GFR after contrast administration, suggesting that the longer the period of VDD, the worst the impact of contrast media on renal function. Collectively, our findings suggest that VDD is a potential risk factor for contrast nephropathy

due to imbalance in intrarenal vasoactive substances by renin-angiotensin system activation and oxidative stress.

Introduction

Contrast-induced nephropathy (CIN) has been considered the third leading cause of hospital-acquired acute kidney injury, related entirely to iodinated contrast media (IC). However, originally thought to be safe, gadolinium-based contrast media (Gd) have recently been reported to induce a decrease in the glomerular filtration rate in high-risk populations (8, 33). It is well known that CIN depends upon the presence of risk factors. Frequently, those factors are associated with renal endothelial dysfunction and altered medullary microcirculation, resulting in medullary hypoxia and oxidative stress damage. Preexisting renal dysfunction, diabetes, congestive heart failure, volume depletion, hypercholesterolemia and old age are major risk factors demonstrated (15).

Apart from bone and mineral metabolism, a substantial amount of evidence demonstrates that vitamin D deficiency (VDD) is associated with endothelial dysfunction, oxidative stress and up-regulation of the renin-angiotensin system (RAS) (3, 27, 34). Studies have shown a widespread rate of hypovitaminosis D in the general population, even in tropical countries (29). In the United States, data from the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) revealed that only 20-25% of the assayed population has serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] level of at least 30ng/mL, whereas 25-35% has definite vitamin D deficiency (VDD), i.e.

25(OH)D<20ng/mL (1). In addition, VDD is highly prevalent and sometimes correlated with diseases that predispose CIN (32).

In light of the above, we hypothesized that VDD is a relevant condition that predisposes to contrast media nephrotoxicity. To this end, renal function was assessed 48 hours after IC and Gd administration in VDD rats and healthy control rats. Additionally, renal and systemic oxidative stress parameters, renal angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase expression were evaluated in order to elucidate the possible pathogenesis of CIN in VDD rats.

Materials and Methods

Animal protocols: All experimental procedures were approved by the local research ethics committee (CAPPesq, process no. 228/12) and developed in strict conformity with local institutional guidelines and with well-established international standards for manipulation and care of laboratory animals. Experiments were designed to evaluate the potential nephrotoxic effect of iodinated and gadolinium contrast media in VDD rats. Male Wistar rats 3 weeks old, provided by the University of São Paulo School of Medicine, were maintained on a standard or vitamin D-free diet for 30 days (MP Biomedicals, Irvine, CA). Animals had *ad libitum* access to food and water. Then, IC (76% Diatrizoate, a high-osmolality agent, 6mL/kg BW) or Gd (Gadoterate meglumine, osmolality 1350mOsm/kg⁻¹, 1.5mmol/kg BW) were given through the dorsal penile vein under isofluorane anesthesia. The use of these high doses is appropriate for studies in rats for two major reasons: First, FDA recommends the use of a 6-fold increase to obtain a human

equivalent drug dose for the rat. Second, these contrasts are excreted primarily by glomerular filtration and the rat has a higher GFR per unit body weight than man (8 vs. 1.5mL/min/kg) (14). Besides, these contrast media doses were used on previous studies (2, 24). Control and VDD₃₀ animals received the same volume of saline solution. We studied six groups (n = 12/group): saline control (Sham), IC, Gd, vitamin D deficiency for 30 days (VDD₃₀), VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd. After 24 hours of contrast media infusion, animals were housed in metabolic cages to collect 24h urine volume for measuring urinary thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Renal hemodynamics: 48 hours after contrast infusion, inulin clearance (GFR, mL/min/100g BW), mean arterial blood pressure (BP, mmHg), renal blood flow (RBF, mL/min) were assessed and renal vascular resistance (RVR, mmHg/mL/min) was calculated. To this end, animals were anesthetized intraperitoneally with pentobarbital (50mg/kg BW). A tracheostomy was performed and the rats were maintained breathing spontaneously. To control BP and allow blood sampling, a PE-60 catheter was inserted into the right carotid artery. BP was assessed using Biopac Systems Inc MP100 (Santa Barbara, CA). Jugular veins were cannulated with PE60 for the administration of inulin and fluids. In order to collect urine samples, a small abdominal incision was made, and the urinary bladder was cannulated with PE240 catheter. After the surgical procedure, inulin (100mg/kg BW) was injected as a loading dose, followed by a continuous infusion of 0.27mg/min. Next, after a 30-minute equilibration period, three urine collections and two blood samples were obtained at the beginning and

at the end. Blood and urine inulin were determined using the anthrone method. At the end of the experiment, a midline incision was performed, the left renal pedicle was carefully dissected and the renal artery was isolated. RBF was monitored by a perivascular ultrasonic flowmeter (T402; Transonic Systems, Bethesda, MD). RVR was calculated by dividing the BP by RBF. Then, the blood sample was collected from catheter inserted in the carotid artery to analyze serum GSH, plasma ionic calcium (ABL800 Flex, Radiometer, Brønshøj, Denmark) and phosphorus (Cobas C 111, Roche, Basel, Schweiz) and serum levels of total 25(OH)D [25(OH)D₂ and 25(OH)D₃], measured by enzyme immunoassay using a commercial kit (Rat 25OH *Vitamin D total ELISA Kit*, ALPCO®, Salem, NH). Finally, the distal abdominal aorta was cannulated with PE60 and kidneys perfused with phosphate buffered saline 0.1M, pH 7.4. The right kidney was removed and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Left kidney sections were fixed in 10% neutral-buffered formalin solution or methacarn solution for histological analyses.

In order to exclude the possibility that changes in GFR could be due to the high osmolality of the contrast media in VDD rats, an additional set (n=5) of inulin clearance experiments were performed by infusing a mannitol solution with an equivalent osmolality of the Gd contrast medium (1350 mOsm/kg⁻¹). To evaluate a longer period of VDD on CIN, two additional groups (n=5/group) were maintained on a vitamin D-free diet for 60 days and only GFR was assessed 48h after contrast infusion (VDD₆₀+IC and VDD₆₀+Gd groups).

Preparation of total kidney homogenates: The right kidney was homogenized using a Teflon pestle glass homogenizer (Schmidt and Co, Waldkraiburg, Germany) in an ice-cold buffer containing 200 mM mannitol, 80 mM HEPES and 41 mM KOH, pH 7.5, and protease inhibitor cocktail (Sigma). The homogenates were centrifuged at a low speed (3000rpm) for 15 min at 4°C to remove nuclei and cell debris. Protein concentration was determined using the Bradford assay method (Bio-Rad Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Electrophoresis and Immunoblotting: Kidney samples were run on 7.5% polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Milipore, Billerica, MA). Blots were blocked with 5% skim milk and 0.1% Tween 20 in phosphate-buffered saline for 1 hour and then incubated overnight with primary antibodies directed against eNOS (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA) AGT (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), renin (AnaSpec, Fremont, CA) or actin (Santa Cruz). Next, blots were washed and incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody diluted at 1:2,000. After 5 consecutive washes with the blocking solution, the membranes were rinsed in phosphate-buffered saline and then incubated with the enhanced chemiluminescence detection system ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The images were obtained using the ImageQuant LAS 4000 mini (GE HealthCare, Piscataway, NJ). The quantification of the visualized bands was performed using IMAGEJ (NIH, Bethesda, MD) densitometry software.

Histologic examination: Kidney embedded in paraffin was sectioned at 4 μm , stained with H&E and examined under light microscopy. Tubular damage was scored at 40-60 fields (0.245 mm^2 each; magnification, x400) by calculation of the percentage of tubules that displayed tubular epithelial swelling, vacuolar degeneration, necrosis and desquamation, as follows: 0, < 5%; I, 5-25%; II, 26-50%; III, 51-75%; and IV, >75%. To minimize bias, the observer was blinded to the treatment groups. Immunohistochemistry was performed to evaluate renal macrophage infiltration. Four- μm kidney paraffin sections were incubated with mouse monoclonal antibody to ED1 (1:100 overnight at 4°C; AbD Serotec, Oxford, UK). The reaction product was detected by avidin-biotin-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The color reaction was developed in 3,3-diaminobenzidine (Sigma), in the presence of hydrogen peroxide, and the sections were counterstained with Harris' hematoxylin. The number of ED1 positive cells was counted in 40-60 renal cortex fields (0.087-mm^2 each). Results were expressed as the average number of macrophage per mm^2 .

Redox status measurements: TBARS, a marker of lipid peroxidation, was measured in urine and kidney homogenates: In brief, 0.4mL urine or kidney samples were diluted in distilled water. Immediately, 1 ml of 17.5% trichloroacetic acid was added. Following the addition of 1 ml of 0.6% thiobarbituric acid, pH 2.0, samples were placed in a boiling water bath for 15 min, after which it was allowed to cool. Subsequently, 1 ml of 70% trichloroacetic acid was added, and the mixture was incubated for 20 min at room temperature. Samples were then centrifuged for 15 min at 2000 rpm.

Optical density of the supernatant was read at 534nm against a blank reagent using a spectrophotometer. Concentration of lipid peroxidation products was calculated as the malondialdehyde (MDA) equivalent using a molar extinction coefficient for the MDA-thiobarbituric acid complex of $1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}/\text{cm}^{-1}$. Urinary and kidney levels of TBARS were expressed as nmol/24hours and nmol/ μg of protein, respectively. GSH, the major endogenous antioxidant in cells, was determined in blood and kidney homogenates. Whole blood was processed by addition of 4 volumes of ice-cold 5% metaphosphoric acid (Sigma) and centrifuged at 4,000rpm for 10min at 4°C. This assay consists of the reaction of supernatants of the total blood or kidney homogenates samples with Ellman's reagent to produce a yellow pigment measured spectrophotometrically at 412 nm. The serum and kidney levels of GSH were quantified by means of the standard curve and reported as $\mu\text{mol}/\text{mL}$ and $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ of protein, respectively.

Statistical analysis: Data are expressed as mean $\pm$ SE. Differences among means of multiple parameters were analyzed by one-way ANOVA and the Student–Newman–Keuls post-test. When appropriate, comparisons between Sham and VDD₃₀ groups were performed with the unpaired *t* test. GraphPad Prism (version 5.01) was used and values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Effects of vitamin D deficiency in rats

No differences in food and water consumption, as well as body weight, were observed between rats fed a standard diet and a vitamin D-free diet for

30 days. As seen in Table 1, VDD₃₀ rats had significantly lower levels of total serum 25(OH)D than Sham group, demonstrating the effectiveness of the model. On the other hand, plasma ionic calcium and phosphorus were similar between these two groups. Table 1 also shows that VDD₃₀ rats display higher BP and RVR and lower GFR compared to Sham.

Rats fed vitamin D free-diet for 30 days had increased kidney renin (154 ± 10 vs. $100 \pm 8\%$, $p < 0.01$, Figure 1) and AGT expression (128 ± 9 vs. $100 \pm 3\%$, $p < 0.05$) compared to Sham, confirming previous reports that vitamin D is a negative endocrine regulator of the intrarenal RAS (20, 36).

Redox imbalance was seen in VDD₃₀ rats, since these animals presented lower levels of serum GSH and higher urinary TBARS (Table 1). In addition, VDD₃₀ rats had lower kidney GSH and a nonsignificant trend towards increased TBARS ($p = 0.10$ vs. Sham) (Figure 2).

Effects of contrast media in VDD₃₀ rats

As seen in Table 2, there was no difference in inulin clearance in IC group compared to Sham, as well as in BP and RVR. Besides, redox status analyzed by measuring kidney and urinary TBARS and kidney and serum GSH levels were also similar between Sham and IC groups (Table 2 and Figure 2A-B). Additionally, Figure 3A shows that renal AGT expression was not different between the IC group and Sham. Conversely, renal eNOS expression was significantly higher in the IC group vs. Sham (Figure 3B). In concert, these data suggest preservation of medullary hemodynamic

microcirculation and indicates that, at this dosage, diatrizoate 76% does not reduce GFR in healthy rats.

In VDD₃₀+IC group, GFR was significantly lower than IC and VDD₃₀ animals (Table 2). This result was associated with an even further increase of urinary TBARS and reduction of serum GSH than those induced by VDD₃₀ per se (Table 1). Similarly, high TBARS and persistent low levels of GSH were observed in the kidney tissue of VDD₃₀+IC rats (Figure 2A-B). Moreover, as show in figure 3A, AGT protein expression was remarkably increased in the kidneys of VDD₃₀+IC compared to IC ($86\pm19\%$, $p<0.001$) and VDD₃₀ ($64\pm21\%$, $p<0.01$). Conversely, renal eNOS expression was decreased in VDD₃₀+IC in comparison with IC ($64\pm15\%$, $p<0.001$) and VDD₃₀ ($49\pm7\%$, $p<0.001$) (Figure 3B). VDD₃₀+IC rats presented similar BP and RVR compared to VDD₃₀, but higher when compared to the IC group (Table 2).

An additional group of rats maintained on vitamin D-free diet for 60 days (VDD₆₀) was studied. These animals displayed total levels of serum 25(OH)D of 3.48 ± 0.35 ng/mL. Infusion of IC on VDD₆₀ rats induced a more pronounced fall in GFR than that of VDD₃₀+IC rats (0.48 ± 0.04 vs. 0.64 ± 0.03 mL/min/100g BW, $p<0.01$).

Gd infusion did not alter GFR, BP, RVR, kidney and systemic redox status in rats fed standard diet (Table 2 and Figure 2C-D). A tendency to increase in renal AGT protein expression was observed in Gd rats compared to Sham, however this difference has not reached statistical significance (138 ± 18 vs. $100\pm3\%$, Figure 4A). On the other hand, Gd infusion significantly

enhanced eNOS protein expression in the kidneys ($139\pm 11\%$ vs. $100\pm 3\%$ in Sham, $p<0.05$) (Figure 4B).

In VDD₃₀+Gd, GFR was significantly reduced compared to VDD₃₀ and Gd rats. Lower GFR was associated with higher kidney and urinary levels of TBARS and lower serum GSH (Table 2 and Figure 2D). Renal concentration of GSH was lower in VDD₃₀+Gd than in Gd but did not differ from VDD₃₀ rats (Figure 2C). AGT protein expression increased in VDD₃₀+Gd rats compared to VDD₃₀ ($58\pm 29\%$, $p<0.05$) and Gd ($68\pm 26\%$, $p<0.05$) (Figure 4A). Conversely, eNOS was reduced in VDD₃₀+Gd compared to VDD₃₀ ($46\pm 14\%$, $p<0.05$) and Gd ($43\pm 16\%$, $p<0.01$) (Figure 4B). Similarly to the iodinated contrast, a longer VDD even worsened GFR in VDD₆₀+Gd group (0.46 ± 0.04 vs. 0.64 ± 0.03 mL/min/100g BW in VDD₃₀+Gd, $p<0.01$).

VDD₃₀ rats were also infused with a mannitol solution that contained the same osmolarity of the Gd contrast media (1350 mOsm/kg⁻¹) and no difference in the inulin clearance of VDD₃₀ rats was observed (0.83 ± 0.05 vs. 0.84 ± 0.01 mL/min/100g BW in VDD₃₀ group, $p=0.83$). These results exclude the possibility that the abovementioned functional and molecular changes in the kidneys were due to osmototoxicity.

Renal histology was assessed to determine whether reduced GFR in contrast media VDD₃₀ rats was accompanied by kidney morphological injury. As illustrated in Figure 5A, the percentage of tubular damage was low in all groups ($< 5\%$ of tubular damage, i.e. score 0) and there was no significant difference among the six groups of rats. Additionally, the number of ED1 positive cells was not affected by contrast media infusion and/or 30-day

vitamin D free-diet (Figure 5B), suggesting that inflammation does not contribute to renal impairment under these experimental conditions.

Discussion

In this study, we demonstrated for the first time that VDD is a risk factor for iodinated and gadolinium contrast media nephrotoxicity in rats. Our results indicate that reduction of GFR in VDD rats after contrast infusion is associated with an intricate interplay among renal RAS, eNOS and oxidative stress. These results have great relevance for clinical practice considering the frequent use of radiologic examinations employing contrast media, the current high prevalence of VDD in general population and the safety attributed to gadolinium-based contrast.

Pathophysiology mechanisms of CIN involve imbalance between vasodilator and vasoconstrictor factors, hypoxia and generation of reactive oxygen species (ROS) in medullary microcirculation. The vasodilation and oxygenation to the medulla is dependent on NO and prostaglandins, that play an important role in the control of renal blood flow and prevention of hypoxic injury (7). Conversely, vasoconstrictor substances such as angiotensin II and endothelin mediate descending vasa recta contraction by pericytes, reducing blood flow in the renal medulla and predisposing to acute kidney injury (23). Nitric oxide synthase inhibition reduces renal blood flow with coupled decreases in GFR and increased renal vascular resistance, and these changes have been shown to be directly linked to RAS activation (6, 9). Thus, endothelial dysfunction in the medullary vasa recta is key to CIN. In this

scenario, for clinical or experimental CIN development will be necessary the presence of predispose conditions capable of aggravating the insult on medullary microcirculation triggered for contrast media, disrupting the compensatory mechanism that preserves GFR. Likewise, healthy experimental animals do not develop CIN unless preconditioning is undertaken, i.e. uninephrectomy, salt-depletion and/or administration of drugs that induce renal vasoconstriction or inhibit vasodilation (2, 15, 33). VDD has never been described as a risk factor for CIN before. In the present study, preconditioning was not carried out, underscoring the potential role of VDD as a risk factor for CIN in rats.

Several studies report a linkage between VDD and up-regulation of RAS, oxidative stress and endothelial dysfunction (3, 10, 20, 28). By means of flow mediated dilation and serum TBARS in asymptomatic subjects, Tarcin et al have shown that VDD is associated with endothelial dysfunction and increased lipid peroxidation (27). In cultured endothelial cells, 1,25-dihydroxycholecalciferol induces NO production by increasing eNOS activity and mRNA expression (22, 26). In turn, experimental studies have demonstrated that vitamin D reduces the expression of the NADPH oxidase subunit p22phox and decreases oxidative stress (10, 16). Moreover, vitamin D upregulates the expression of enzymes involved in GSH metabolism, namely glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and stimulates the thioredoxin system, therefore catalyzing the biosynthesis of a major endogenous antioxidant (3, 17).

Our data show that rats with VDD are different in the basal state compared to sham. They display higher blood pressure, renal vascular resistance and greater renal renin and AGT protein expression. Plasma levels of calcium and phosphorus were similar between Sham and VDD₃₀ groups, strengthening the notion that inhibition of intrarenal RAS by vitamin D is independent of calcium, phosphorus or parathyroid hormone (19, 36). Also, VDD₃₀ rats have lower kidney and serum GSH and higher urinary TBARS, indicating the powerful antioxidant effect of vitamin D. In VDD₃₀ rats, elevation of eNOS protein expression probably represents a compensatory mechanism that is observed in endothelial dysfunction induced by hypertension and oxidative stress, in order to counterbalance the reduction in NO bioavailability (31). It is important to emphasize that under these conditions, oxidation of the eNOS cofactor BH₄ by peroxynitrite, may uncouple oxygen reduction from NO synthesis and convert eNOS to a superoxide-producing enzyme, the so-called “eNOS uncoupling”, then, increasing superoxide (11, 31).

We have found that healthy rats exposed to IC or Gd contrast media do not display an imbalance in renal redox status, have an increase on eNOS expression in the kidney and unaltered inulin clearance when compared to Sham. These data strongly suggest that an additional insult or risk factor is necessary to induce CIN. As opposed to healthy animals, VDD₃₀ rats develop acute kidney injury after contrast infusion. The GFR fall in VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd rats was associated with an elevation of renal AGT protein expression that was accompanied by a significant reduction of eNOS.

In this context, Goodman *et al* have demonstrated that eNOS expression is reduced in acute kidney injury of uninephrectomized rats exposed to sodium iothalamate (12). Noteworthy, hypoxia is a known mechanism of inhibition of eNOS expression (21). Thereby, the reduction of renal eNOS expression found in VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd groups supports the presence of medullary hypoxia and renal injury generated by contrast media in condition of vitamin D deficiency. Furthermore, a more pronounced reduction of inulin clearance was detected in VDD₆₀+IC and VDD₆₀+Gd groups. This data suggests that the longer the period of the VDD is, the worst the impact of contrast media is on inulin clearance.

Renal generation of ROS favors vasoconstriction by stimulating RAS and decreasing NO and directly induces tubular toxicity (4, 15). Indeed, we have found that VDD₃₀+IC and VDD₃₀+Gd groups generate a remarkable amount of renal and systemic TBARS whereas the renal and systemic production of GSH is impaired, causing imbalance of the redox state by markedly elevating the TBARS/GSH ratio.

Its important to emphasize that reduction of the GFR was observed in rats with VDD that received Gd, a contrast media that is originally thought to be safe in terms of nephrotoxicity. In this regard, gadolinium-based contrast media have been reported to induce a decrease of the glomerular filtration rate in a high-risk population group, especially in patients with altered baseline renal function (8). These findings are in line with a previous study from our laboratory, in which we have demonstrated that 5/6 nephrectomized rats develop CIN after Gd contrast infusion (24). The results of the present

study suggest that VDD might be a novel risk factor for gadolinium nephrotoxicity.

The existence of abnormalities on kidney morphology in CIN is variable and controversial. Most investigators have not found changes in renal morphology while others only encountered vacuolization of the proximal tubular cells that were not correlated with kidney dysfunction (5, 15, 18, 30). Our experimental models exhibit low tubular injury score after IC or Gd contrast infusion, underscoring that renal hemodynamics is the primary alteration that leads to GFR fall. Additionally, macrophage infiltration was similar in all groups, suggesting that inflammation does not contribute to renal impairment under these experimental conditions.

It is worthy mentioning that the effect of contrast media on GFR in VDD₃₀ rats occurred independently of the osmotic load of these agents, since no difference in inulin clearance was observed in response to a mannitol infusion, suggesting the chemotoxicity effects of contrast media, as observed in other studies (13, 25, 35).

In summary, this study demonstrates that vitamin D deficiency is a potential condition that may predispose to both iodinated and gadolinium contrast media nephrotoxicity in rats, at least in part due to oxidative stress and by intrarenal RAS activation. In view of these results, clinical studies are necessary and it would be advisable to maintain adequate levels of vitamin D in patients who will undergo radiologic examinations employing contrast media, inclusive gadolinium-based contrast.

Acknowledgments: This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant 306148/2013-7) to ACS and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2012/10146-0) to ACCG.

Disclosures of Conflicts of Interest: No relevant conflicts of interest to disclose for all authors.

References

1. **Adams JS and Hewison M.** Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 471-478, 2010.
2. **Andrade L, Campos SB, and Seguro AC.** Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: protective role of L-arginine. *Kidney Int* 53: 1736-1742, 1998.
3. **Argacha JF, Egrise D, Pochet S, Fontaine D, Lefort A, Libert F, Goldman S, van de Borne P, Berkenboom G, and Moreno-Reyes R.** Vitamin D deficiency-induced hypertension is associated with vascular oxidative stress and altered heart gene expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 58: 65-71, 2011.
4. **Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, and Burnett JC.** Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol* 258: F115-120, 1990.
5. **Barrett BJ.** Contrast nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 5: 125-137, 1994.
6. **Beierwaltes WH.** Endothelial dysfunction in the outer medullary vasa recta as a key to contrast media-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F31-32, 2013.
7. **Brezis M, Heyman SN, Dinour D, Epstein FH, and Rosen S.** Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest* 88: 390-395, 1991.
8. **Buhaescu I and Izzedine H.** Gadolinium-induced nephrotoxicity. *Int J Clin Pract* 62: 1113-1118, 2008.
9. **Cao C, Edwards A, Sendeski M, Lee-Kwon W, Cui L, Cai CY, Patzak A, and Pallone TL.** Intrinsic nitric oxide and superoxide production regulates descending vasa recta contraction. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1056-1064, 2010.
10. **Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, and Huang Y.** Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J*, 2012.
11. **Förstermann U.** Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 459: 923-939, 2010.
12. **Goodman AI, Olszanecki R, Yang LM, Quan S, Li M, Omura S, Stec DE, and Abraham NG.** Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Int* 72: 945-953, 2007.
13. **Hardiek K, Katholi RE, Ramkumar V, and Deitrick C.** Proximal tubule cell response to radiographic contrast media. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F61-70, 2001.
14. **Haylor J, Schroeder J, Wagner B, Nutter F, Jestin G, Idée JM, and Morcos S.** Skin gadolinium following use of MR contrast agents in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Radiology* 263: 107-116, 2012.

15. **Heyman SN, Rosen S, and Rosenberger C.** Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 288-296, 2008.
16. **Hirata M, Serizawa K, Aizawa K, Yogo K, Tashiro Y, Takeda S, Moriguchi Y, Endo K, and Fukagawa M.** 22-Oxacalcitriol prevents progression of endothelial dysfunction through antioxidative effects in rats with type 2 diabetes and early-stage nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 28: 1166-1174, 2013.
17. **Jain SK and Micinski D.** Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 437: 7-11, 2013.
18. **Katzberg RW, Pabico RC, Morris TW, Hayakawa K, McKenna BA, Panner BJ, Ventura JA, and Fischer HW.** Effects of contrast media on renal function and subcellular morphology in the dog. *Invest Radiol* 21: 64-70, 1986.
19. **Kong J, Qiao G, Zhang Z, Liu SQ, and Li YC.** Targeted vitamin D receptor expression in juxtaglomerular cells suppresses renin expression independent of parathyroid hormone and calcium. *Kidney Int* 74: 1577-1581, 2008.
20. **Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, and Cao LP.** 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110: 229-238, 2002.
21. **McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, and Kourembanas S.** Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 267: H1921-1927, 1994.
22. **Molinari C, Uberti F, Grossini E, Vacca G, Carda S, Invernizzi M, and Cisari C.** 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 27: 661-668, 2011.
23. **Pallone TL, Zhang Z, and Rhinehart K.** Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F253-266, 2003.
24. **Pereira LV, Shimizu MH, Rodrigues LP, Leite CC, Andrade L, and Seguro AC.** N-acetylcysteine protects rats with chronic renal failure from gadolinium-chelate nephrotoxicity. *PLoS One* 7: e39528, 2012.
25. **Romano G, Briguori C, Quintavalle C, Zanca C, Rivera NV, Colombo A, and Condorelli G.** Contrast agents and renal cell apoptosis. *Eur Heart J* 29: 2569-2576, 2008.
26. **Talmor Y, Golan E, Benchetrit S, Bernheim J, Klein O, Green J, and Rashid G.** Calcitriol blunts the deleterious impact of advanced glycation end products on endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1059-1064, 2008.
27. **Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, Toprak A, Yazici D, Sancak S, Deyneli O, and Akalin S.** Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 4023-4030, 2009.
28. **Tare M, Emmett SJ, Coleman HA, Skordilis C, Eyles DW, Morley R, and Parkington HC.** Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. *J Physiol* 589: 4777-4786, 2011.

29. **Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MC, Sassaki AL, dos Reis LM, Jorgetti V, and Moysés RM.** Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? *Clin Nutr* 29: 784-788, 2010.
30. **Vari RC, Natarajan LA, Whitescarver SA, Jackson BA, and Ott CE.** Induction, prevention and mechanisms of contrast media-induced acute renal failure. *Kidney Int* 33: 699-707, 1988.
31. **Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, and Trnavsky-Hobbs DL.** Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* 36: 957-964, 2000.
32. **Wang C.** Role of vitamin d in cardiometabolic diseases. *J Diabetes Res* 2013: 243934, 2013.
33. **Wong PC, Li Z, Guo J, and Zhang A.** Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Int J Cardiol* 158: 186-192, 2012.
34. **Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, and Li YC.** Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E125-132, 2005.
35. **Yao K, Heyne N, Erley CM, Risler T, and Osswald H.** The selective adenosine A1 receptor antagonist KW-3902 prevents radiocontrast media-induced nephropathy in rats with chronic nitric oxide deficiency. *Eur J Pharmacol* 414: 99-104, 2001.
36. **Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, and Miao D.** Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney Int* 74: 170-179, 2008.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Table 1 – Renal function, hemodynamics, serum and urinary redox status, plasma calcium and phosphorus and vitamin D levels of rats fed standard (Sham) or maintained 30 days on vitamin D-free diet (VDD₃₀).

GFR, glomerular filtration rate; BP, mean arterial pressure; RVR, renal vascular resistance; GSH_s, serum glutathione; TBARS_u, urinary thiobarbituric acid reactive substances. Values are expressed as mean $\pm$ SE. n=12 rats/group. *n=9 for Sham group and n=11 for VDD₃₀ group.

Table 2 – Effect of Iodinated or Gadolinium contrast infusion on renal function, hemodynamics and serum and urinary redox status of Sham and VDD rats.

GFR, glomerular filtration rate; BP, mean blood pressure; RVR, renal vascular resistance; GSH_s, serum glutathione and TBARS_u, urinary thiobarbituric acid reactive substances in rats fed standard (Sham) or a vitamin-D free diet for 30 days (VDD₃₀) infused or not with Iodinated (IC) or Gadolinium contrast (Gd). Values are expressed as mean $\pm$ SE. n = 12/group.

^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 vs. IC; ^dp<0.05, ^ep<0.01, ^fp<0.001 vs. Gd; ^gp<0.05, ^hp<0.01, ⁱp<0.001 vs. VDD₃₀.

Figure 1 – Vitamin D deficiency increases rat renal renin expression.

Immunoblotting and graphical representation of the relative expression levels of renin in kidney homogenates of rats fed standard (Sham) or a vitamin-D free diet for 30 days (VDD₃₀). Equal amounts of kidney homogenates (150

µg) were subjected to SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Blots were then incubated overnight with primary antibodies against renin (1:1,000) or actin (1:50,000). Values are expressed as mean $\pm$ SE. n = 4 rats/group. ^ap < 0.01 vs. Sham.

Figure 2 - Effect of Iodinated or Gadolinium contrast infusion on renal redox status of Sham and VDD rats. Renal concentrations of antioxidant and prooxidant markers in rats fed standard (Sham) or a vitamin-D free diet for 30 days (VDD₃₀) infused or not with Iodinated (IC) or Gadolinium contrast (Gd). **(A)** Concentrations of Glutathione (GSH) and **(B)** Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in kidney homogenates isolated from Sham and VDD₃₀ rats infused or not with IC. **(C)** Concentrations of GSH and **(D)** TBARS in kidney homogenates isolated from Sham and VDD₃₀ rats infused or not with Gd. Values are expressed as mean $\pm$ SE. n = 8 rats/group. ^ap < 0.01 vs. Sham; ^bp < 0.01 vs. IC; ^cp < 0.01 vs. IC or VDD₃₀; ^dp < 0.05 vs. Sham; ^ep < 0.05 vs. Gd; ^fp < 0.01 vs. Gd or VDD₃₀.

Figure 3 – Effect of Iodinated contrast infusion on renal expression of angiotensinogen (AGT) and NO synthase (eNOS) in control and VDD₃₀ rats. Immunoblotting and graphical representation of the relative rat renal expression levels of **(A)** AGT and **(B)** eNOS in rats fed standard (Sham) or a vitamin-D free diet for 30 days (VDD₃₀) infused or not with iodinated contrast (IC). Equal amounts of kidney homogenates (100 µg for AGT or 150 µg for eNOS) were subjected to SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane.

Blots were then incubated overnight with primary antibodies against AGT (1:1,000) or eNOS (1:500). Actin was used as loading control (1:50,000). Values are expressed as mean $\pm$ SE. n = 6 rats/group. ^ap<0.001 vs. IC; ^bp<0.01 vs VDD₃₀; ^cp<0.001, ^dp<0.01 vs. Sham; ^ep<0.001 vs. IC; ^fp<0.001 vs. VDD₃₀.

Figure 4 – Effect of Gadolinium contrast infusion on renal expression of angiotensinogen (AGT) and NO synthase (eNOS) in Sham and VDD₃₀ rats. Immunoblotting and graphical representation of the relative rat renal expression levels of **(A)** AGT and **(B)** eNOS in rats fed standard (Sham) or a vitamin-D free diet for 30 days (VDD₃₀), infused or not with Gadolinium contrast (Gd). Equal amounts of kidney homogenates (100 μ g for AGT or 150 μ g for eNOS) were subjected to SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Blots were then incubated overnight with primary antibodies against AGT (1:1,000) or eNOS (1:500). Actin was used as loading control (1:50,000). Values are expressed as mean $\pm$ SE. n = 6 rats/group. ^ap<0.05 vs. Gd or VDD₃₀; ^bp<0.05, ^cp<0.01 vs. Sham; ^dp<0.05 vs. Gd; ^ep<0.01 vs. VDD₃₀.

Figure 5 – Tubular injury and quantitation of renal macrophage infiltration in rats fed a standard or a vitamin D free diet for 30 days and infused or not with Iodinated or Gadolinium contrast media. (A) Tubular injury score. **(B)** The number of infiltrating macrophages in to the kidneys is expressed as ED1 positive cells per mm². Values are expressed as mean $\pm$ SE. n=5-7 rats/group.

Tabela 1

Grupos	Sham	dVD ₃₀	Valor P
Peso corporal (g)	278±5	279±4	0,92
RFG (mL/min/100gPC)	0,94±0,04	0,84±0,01	P<0,05
PAm (mmHg)	114±2	132±2	P<0,001
RVR (mmHg/mL/min)	20,5±0,3	23,8±0,3	P<0,001
GSH _s (μmol/mL)	2,68±0,14	2,28±0,06	P<0,05
TBARS _u (nmol/24h)	110±11	184±26	P<0,05
Cálcio iônico plamático (mg/dL)	4,15±0,1	4,0±0,1	0,23
Fósforo plamático (mg/dL)	7,7±0,4	8,0±0,4	0,51
*Níveis séricos de 25(OH)D (ng/mL)	44,87±1,7	3,96±0,8	P<0,001

Tabela 2

Grupos	RFG (mL/min/100gPC)	PAm (mmHg)	RVR (mmHg/mL/min)	GSH _s (μmol/mL)	TBARS _u (nmol/24h)
Sham	0,94±0,04	114±2	20,5±0,3	2,68±0,14	110±11
CI	0,91±0,03	121±2	21,5±0,4	2,33±0,06	152±8
Gd	0,92±0,03	116±2	21,1±0,3	2,44±0,13	168±24
dVD ₃₀	0,84±0,01	132±2	23,8±0,3	2,28±0,06	184±26
dVD ₃₀ +CI	0,64±0,03 ^{c i}	131±2 ^b	23,8±0,3 ^b	2,03±0,05 ^{a g}	303±52 ^{b h}
dVD ₃₀ +Gd	0,60±0,03 ^{f i}	132±2 ^h	24,1±0,3 ^h	2,04±0,05 ^d	310±42 ^{e h}

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5