**ESCOLA DE ENFERMAGEM
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE IODADO E O
DIABETES MELLITUS: MODELO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

São Paulo

2013

CASSIANE DEZOTI DA FONSECA

**NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE IODADO E O
DIABETES MELLITUS: MODELO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Enfermagem na Saúde do Adulto

Linha de pesquisa:

Tecnologia na Saúde do Adulto

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Maria de Fatima Fernandes Vattimo

São Paulo

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____

Data: __/__/____

Catálogo na Publicação (CIP)
Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Fonseca, Cassiane Dezoti da
Nefropatia induzida por contraste iodado e o diabetes mellitus: modelo experimental em ratos / Cassiane Dezoti da Fonseca.-São Paulo, 2013.
89 p.

Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria de Fatima Fernandes Vattimo

1. Insuficiência renal aguda 2. Estresse oxidativo
3. Diabetes mellitus 4. Contraste - efeito adverso I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CASSIANE DEZOTI DA FONSECA

Título: NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE IODADO E O
DIABETES MELLITUS: MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do
Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus, por sua bondade e misericórdia infinita, que por meio do Seu Espírito Santo trouxe luz, discernimento e força para a realização desse sonho.

À minha família, Fabrício, Beatriz e Guilherme, pelo o amor e carinho vivenciados dia a dia.

Aos meus pais, Arnaldo e Irany, pelo amor, alegria e a valorização do saber.

Às minhas irmãs, Cristiane e Claudiane, pelo amor e incentivo.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria de Fatima Fernandes Vattimo, conselheira, amiga e grande mestre. No decorrer desses anos, aprendi o quão infinita é a sua inteligência e persistência. Te admiro muito. Muito obrigada pela confiança.

À minha amiga Dr.^a Mirian Watanabe, pela contribuição inestimável na elaboração deste trabalho. Agradeço pelo incentivo, sugestões e imensa ajuda nos experimentos.

À Neusa, amiga e companheira em todos os momentos no laboratório. Obrigada pelo carinho e cuidado com os animais utilizados nesse estudo.

À Dr.^a Flávia Gomes Machado, pela orientação para padronizar o modelo do diabetes.

Ao Prof. Dr. Roberto Zatz e Dra Clarice Fujihara, pela atenção e colaboração.

Ao Prof. Milton Ginoza, pela colaboração e auxílio na realização da Albuminúria.

À Ellen Ptílovanciv, pela orientação para administrar a estreptozotocina.

Ao Dr. Rildo Volpini, pela colaboração na análise histológica.

À aluna, amiga e parceira Sheíla Marques Fernandes, pela colaboração e parceria em todas as etapas deste estudo.

Aos amigos do LEMA, Espedito, Fábio, Franciele, Mariana, Juliana, Gabriela, Sílvane, pelo apoio na coleta de dados deste trabalho.

Aos meus familiares, Carlos, Sílvia, Flávia, Michel, Paula, Tiago, Caio, Bruna, Bianca, Bernardo, Rodrigo e Alexandre.

Às amigas, Cláudia Akemi, Luciana Neiva, Carolina Martins e Mariana Alvina.

Aos amigos bolsistas da pós-graduação, pela convivência alegre no decorrer desses quatro anos na EEUSP.

Às enfermeiras especialistas, Vanessa, Síhone, Eliane, Carla, Rosely e Verónica pela atenção e ajuda no PAE.

À Prof. Dr.^a Rita de Cassia Gengo e Silva, pela atenção e colaboração no PAE.

À secretária da pós-graduação, pela atenção e orientação.

Fonseca CD. Nefropatia induzida por contraste iodado e o diabetes mellitus: modelo experimental em ratos. [tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2013.

RESUMO

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma lesão renal aguda (LRA) tóxica, que consiste em vasoconstrição intra-renal, toxicidade tubular direta com liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A NIC está diretamente associada a doenças crônicas que comprometem a oxigenação da região da medula renal, como a disfunção renal preexistente, o Diabetes Mellitus (DM) e insuficiência cardíaca congestiva. Esse estudo investigou os mecanismos fisiopatológicos que caracterizam a NIC em ratos diabéticos. Foram utilizados ratos Wistar, adultos e machos. No protocolo DM foi realizada a nefrectomia unilateral esquerda (Nefré) no 1º dia, para potencializar o efeito tóxico da hiperglicemia crônica no rim. O DM foi induzido pela administração intravenosa (i.v.) de 65 mg/kg de estreptozotocina (STZ, diluída com citrato) no 20º dia, e o contraste iodado (CI) ioxitalamato de meglumina, 6 ml/kg, foi administrado (intraperitoneal, i.p.) no 85º dia. Foram realizados os seguintes grupos: Citrato (controle); Nefré+Citrato; DM; Nefré+DM; DM+CI; Nefré+DM+CI. Foram avaliados parâmetros fisiológicos (ingestão de ração e água, peso, glicemia capilar, peso do rim e peso relativo do rim); a albuminúria (método de imunodifusão), a função renal (FR) (*clearance* de creatinina, método de Jaffé), a lesão oxidativa (peróxidos urinários-PU, FOX-2; substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico-TBARS, tióis no tecido renal) e análise histológica renal (lesão tubulointersticial). Observou-se que os grupos diabéticos apresentaram polifagia, polidipsia, hiperglicemia e redução do peso corporal ($p<0,05$), além de redução do *clearance* de creatinina com elevação de PU e TBARS, manutenção de tióis e elevação da albuminúria. O tratamento com CI nos animais diabéticos determinou redução da FR, elevação dos PU e TBARS e redução dos tióis. Quanto à histologia renal, demonstrou-se que apenas o grupo Nefré+DM+CI apresentou lesão tubulointersticial. Os achados dessa investigação confirmaram o efeito tóxico do CI dose única sobre a função renal de ratos com hiperglicemia crônica, pressupondo que o DM seja fator de risco para essa nefropatia.

PALAVRAS-CHAVE: Contraste (efeito adverso), Estresse Oxidativo, Diabetes Mellitus, Insuficiência Renal Aguda.

Fonseca CD. Iodine contrast-induced nephropathy and diabetes mellitus: experimental model in rats. [thesis]. São Paulo (SP), Brasil: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2013.

ABSTRACT

Contrast-Induced Nephropathy (CIN) is a toxic acute kidney injury (AKI) that consists in intrarenal vasoconstriction, direct tubular toxicity with generation of reactive oxygen species (ROS). The CIN is associated with the decreased tissue oxygen tension in renal medulla in preexisting renal dysfunction, Diabetes Mellitus (DM) and congestive heart failure. This study investigated the pathophysiologic mechanisms in the CIN in diabetic rats. Adult, male, Wistar rats were used. It was performed left uninephrectomy (Nx) on the 1st day in the DM group to potentialize the toxic effect of the chronic hyperglycemia. The DM was induced by a single dose of intravenous streptozotocin (65mg/kg i.v.) in sodium citrate buffer, on the 20th day and the iodine contrast (IC) meglumine ioxithalamate 6 ml/kg was administrated (intraperitoneal, i.p.) on the 85th day. Animals were divided into the following groups: Citrate (control); Nx+Citrate; DM; Nx+DM; DM+IC; Nx+DM+IC. Physiological parameters (water and food intake, body weight, blood glucose, kidney weight and relative kidney weight); renal function (creatinine clearance, Jaffé method); urine albumin (imunodifusion method); oxidative injury (urinary peroxides, FOX-2, tiobarbituric acid reactive substances-TBARS and thiols in renal tissue) and kidney histological analysis (tubulointerstitial injury) were evaluated. In the diabetic groups, polyphagia, polydipsia, increased blood glucose and reduced body weight were observed ($p<0.05$). The relative kidney weight was increased in the Nx and IC animals ($p<0.05$). The renal function was reduced; urinary peroxides and TBARS were increased in the diabetic and IC animals. The decrease in thiols levels in the diabetic and IC groups demonstrated the endogenous substrate consumption. The Nx animals that received IC presented tubular cells vacuolization and edema with moderate injury. The data has described the pathophysiology of CIN in diabetic rats involving oxidative injury that resulted of association of chronic high blood glucose and IC toxicity, suggesting that DM can be pointed out as a risk factor for CIN.

KEYWORDS: Contrast (adverse effect), Oxidative Stress, Diabetes Mellitus, Acute Renal Failure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de lesão renal na NIC.....	24
Figura 2. Descrição do protocolo experimental.....	33
Figura 3. Ilustrações da gaiola metabólica.....	34
Figura 4. Gráfico referente aos resultados da glicemia dos grupos: <i>Citrato</i> , <i>Nefré+Citrato</i> , <i>DM</i> , <i>Nefré+DM</i> , <i>DM+CI</i> , <i>Nefré+DM+CI</i>	44
Figura 5. Gráfico referente aos resultados do peso corporal dos grupos: <i>Citrato</i> , <i>Nefré+Citrato</i> , <i>DM</i> , <i>Nefré+DM</i> , <i>DM+CI</i> , <i>Nefré+DM+CI</i>	44
Figura 6. Fotos do aspecto macroscópico dos rins sem e com nefrectomia após 3 meses de diabetes. Fotos rins DM (1A e 2A) e fotos rins Nefré+DM (1B e 2B).....	46
Figura 7. Gráfico dos resultados dos Peróxidos Urinários dos grupos: <i>Citrato</i> , <i>Nefré+Citrato</i> , <i>DM</i> , <i>Nefré+DM</i> , <i>DM+CI</i> , <i>Nefré+DM+CI</i>	58
Figura 8. Gráfico dos resultados dos Tióis solúveis não proteicos no tecido renal dos grupos: <i>Citrato</i> , <i>Nefré+Citrato</i> , <i>DM</i> , <i>Nefré+DM</i> , <i>DM+CI</i> , <i>Nefré+DM+CI</i>	58
Figura 9. Gráfico dos resultados dos TBARS urinários dos grupos: <i>Citrato</i> , <i>Nefré+Citrato</i> , <i>DM</i> , <i>Nefré+DM</i> , <i>DM+CI</i> , <i>Nefré+DM+CI</i>	58
Figura 10. Fotos dos cortes histológicos para avaliação da área tubulointersticial (aumento 400x) dos grupos: <i>Citrato</i> (A), <i>Nefré+Citrato</i> (B), <i>DM</i> (C), <i>Nefré+DM</i> (D), <i>DM+CI</i> (E), <i>Nefré+DM+CI</i> (F).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Resultados dos parâmetros fisiológicos dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>43</i>
Tabela 2 -	<i>Resultados de peso do rim e da relação peso do rim/peso do animal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>45</i>
Tabela 3 -	<i>Resultados de função global renal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>48</i>
Tabela 4 -	<i>Resultados de albuminúria dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>50</i>
Tabela 5 -	<i>Resultados de peróxidos urinários dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>52</i>
Tabela 6 -	<i>Resultados dos Tióis solúveis não proteicos no tecido renal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>54</i>
Tabela 7 -	<i>Resultados de TBARS urinários dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>56</i>
Tabela 8 -	<i>Resultados das alterações tubulointersticiais no tecido renal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI, São Paulo-2013.....</i>	<i>60</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

cap.	Capítulo (referente à publicação)
ed.	Edição
et al	e colaboradores
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
vs.	versus
p.	página
v.	volume

LISTA DE SIGLAS

AINEs	anti-inflamatórios não esteroides
AMP	adenosina monofosfato
AS-IV	astragaloside IV
AT-1	angiotensina-1
ATP	adenosina trifosfato
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CI	contraste iodado
DM	diabetes mellitus
DM-1	diabetes tipo 1
DM-2	diabetes tipo 2
DSL	D-Saccharic 1,4 lactone
ECA	enzima conversora da angiotensina
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
ETA ₁	endotelina A ₁
FOX-2	xilenol laranja versão-2
FR	função renal
FSR	fluxo sanguíneo renal
GSH	glutathione
GSSG	glutathione oxidada
ICC	insuficiência cardíaca congestiva
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IRC	insuficiência renal crônica
LEMA	Laboratório Experimental de Modelos Animais
LRA	lesão renal aguda
MDA	malondialdeído
MPO	mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato

Na/KATPase	sódio potássio ATPase
ND	nefropatia diabética
NIC	nefropatia induzida por contraste
nNOS	óxido nítrico sintase neural
NO	óxido nítrico
PGE ₁	prostaglandina E ₁
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGI ₂	prostaglandina I ₂
PMB	polimixina B
PU	peróxidos urinários
SCE	superfície da camada endotelial
SOD	superóxido dismutase
STZ	estreptozotocina
TBARS	substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico
TGF	taxa de filtração glomerular
TXA ₂	tromboxane A ₂
UTI	unidade de terapia intensiva
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	graus centígrados
dl	decilitro
g	grama
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
=	igual
+	mais
<	menor
M	molar
μl	microlitro
μm	micromolar
μmol	micromol
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milimolar
N	normal
n	número de animais estudados
Nm	nanômetro
nmol	nanomol
nmolg/Cr	nanomol por grama de creatinina
ONOO^-	peróxido nitrito
p	nível de significância do resultado estatístico
%	porcentagem
ROO^-	radical peroxil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Materiais.....	31
3.2 Procedimentos.....	32
3.3 Métodos.....	35
3.4 Local.....	40
3.5 Análise Estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Parâmetros fisiológicos.....	42
4.2 Função renal.....	47
4.3 Albuminúria.....	49
4.4 Metabólitos oxidativos.....	51
4.5 Análise histológica do tecido renal.....	59
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS.....	89

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma lesão renal aguda (LRA) tóxica que consiste em vasoconstrição intra-renal, toxicidade tubular direta com liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A NIC está diretamente associada a doenças crônicas que comprometem a oxigenação da região da medula renal, como a disfunção renal preexistente, o Diabetes Mellitus (DM) e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ^(1,2). A NIC foi relatada pela primeira vez em pacientes com mieloma múltiplo em 1954 ⁽³⁾.

A NIC é clinicamente definida como a elevação da creatinina sérica para $\geq 0,5$ mg/dl ou $\geq 25\%$ entre 48-72 horas após a injeção do contraste. É uma LRA não-oligúrica, com pico de disfunção 3 a 5 dias após o contraste, retornando ao basal de 7 a 10 dias. A urinálise pode revelar restos granulares, com células epiteliais renais e discreta proteinúria ^(4,5,6).

A LRA tóxica por contraste envolve inúmeros fatores intrínsecos, alguns não modificáveis como idade avançada, gênero, hipertensão, IRC, ICC, mieloma múltiplo e fatores modificáveis como desidratação, volume de contraste iodado (CI) infundido, hipotensão, uso concomitante com agentes nefrotóxicos, choque e sepse ^(1,7). O DM pode ser considerado um fator de risco modificável para NIC, dependendo do controle da hiperglicemia crônica, contudo esse aspecto será discutido posteriormente. Pacientes com doenças cardíacas internados em unidades de terapia intensiva (UTI) são particularmente de risco, visto que 49% das NICs ocorrem após cateterização cardíaca e angioplastia coronária, nas quais injeções repetidas de CI são frequentemente requeridas ^(5,8). Já foi demonstrado que o uso indiscriminado dos CIs prolonga a permanência hospitalar e contribui para altos índices de morbidade e mortalidade, sendo essa nefropatia considerada a terceira causa de LRA adquirida em ambientes hospitalares, com 12% dos casos, e podendo evoluir para a necessidade de terapia de substituição renal em 1% dos pacientes ^(1,9).

Embora a fisiopatologia da NIC seja inconclusiva, a hipóxia medular é considerada o principal mecanismo, resultante da toxicidade tubular direta, redução do fluxo sanguíneo renal (FSR) e a geração de EROs. A vasoconstrição

resultante dos insultos nefrotóxicos nas células tubulares induz a formação de moléculas de adesão que facilitam a interação leucócito-endotélio, ativando mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e eicosanoides ^(2,10,11).

Foi demonstrado que o desenvolvimento da NIC depende da osmolaridade, da viscosidade e do volume infundido do CI. A alta concentração desses agentes pode estimular o seu depósito nos túbulos renais e aumentar as pressões tubulares, diminuindo a taxa de filtração glomerular (TFG) e FSR. Com intuito de reduzir a “osmotoxicidade” do contraste, recomenda-se o uso de agente de iso ou baixa osmolaridade, principalmente em pacientes com risco para lesão renal ^(2,5).

No entanto, alguns estudos descreveram que contrastes iso-osmolares apresentam alta viscosidade e estimulam a agregação plaquetária e vacuolização das células tubulares, o que pode comprometer a microcirculação renal e desencadear desequilíbrio entre vasoconstritores como a endotelina, angiotensina II, tromboxane A₂ (TxA₂), leucotrieno C₄, adenosina e vasodilatadores, como as prostaglandina E₁ (PGE₁), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂) e o óxido nítrico (NO) ^(5,7). Por outro lado, os contrastes hiperosmóticos induzem intensa diurese e natriurese, que estimulam a vasoconstrição da arteríola aferente e bloqueio dos cotransportadores Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ na membrana luminal das células tubulares e a ativação do *feedback* tubuloglomerular, obstruindo o fluxo na microcirculação renal, resultando em LRA tóxica por contraste ^(2,5,11).

Alguns mecanismos celulares e vasomotores foram apontados na NIC. Já foi descrito que a mácula densa contém um grupamento celular que interage na junção da alça ascendente espessa e no túbulo contorcido distal do néfron, descansando entre as arteríolas eferentes e aferentes no glomérulo. Quando os cotransportadores de Na⁺, K⁺ e 2 Cl⁻ da mácula densa elevam a concentração de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ no fluído tubular, ocorre a geração de AMP cíclico por meio da quebra do ATP. O AMP deixa a célula e membrana para ser convertido em adenosina no interstício ^(2,11,12). A adenosina intersticial ativa os receptores A₁ das células mesangiais extraglomerulares, causando a junção das células da musculatura lisa da arteríola aferente, destinadas a contrair e reter as células granulares para a liberação de renina, resultando em vasoconstrição da arteríola aferente e redução da TFG ^(2,13).

Em estudo animal, observou-se que a vasoconstrição foi dominante quando a adenosina foi aplicada seletivamente ao redor das arteríolas aferentes. No entanto, a infusão intravenosa de adenosina resultou em vasodilatação. Isto sugere que o efeito vasoconstritor do receptor de adenosina A₁ foi principalmente dirigido às arteríolas aferentes, mas não à medula renal, onde o efeito de vasodilatação do receptor de adenosina A₂ foi dominante ⁽¹⁴⁾.

Além da adenosina, a endotelina também é importante percussora na LRA por contraste. Níveis plasmáticos de endotelina aumentam cinco minutos após a infusão de contraste e retornam ao normal por 30 minutos, ocorrendo simultaneamente aumento transitório do FSR e diurese. A endotelina induz vasoconstrição por meio da ativação do receptor da endotelina A₁ (ETA₁) e vasodilatação por meio do receptor da endotelina A₂ ^(2,6). Estudos mostraram que antagonistas seletivos da ETA₁ preveniram a redução na TFG e da perfusão renal em rins de ratos tratados com CI. Os antagonistas de ETA₁ podem reduzir a tensão de oxigênio na medula externa, sem elevar o fluxo sanguíneo local pelo efeito da estimulação do ETA₁ na atividade da Na⁺ K⁺ ATPase ^(15,16).

Adicionalmente, ocorre um mecanismo de toxicidade tubular direta mediada por EROs, que aumentam a atividade de transporte das células tubulares, subsequente maior consumo de oxigênio e indução da lesão endotelial (Fig. 1) ^(17,18).

Um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, leva a disfunção redox, sinalizando e mediando a lesão molecular ⁽¹⁹⁾.

A geração de EROs durante a hipóxia envolve a redução de equivalentes, enzimas catalisadoras, metais de transição e carreadores de elétrons. Dentre esses metais de transição estão o Fe⁺³ e o Cu⁺² que reagem com o não radical peróxido de hidrogênio (H₂O₂), desligando-se de suas proteínas, catalisando e formando o radical hidroxila (OH[·]), que é altamente tóxico (reação de Fenton) (equação 1) ^(20,21).

A outra forma de geração do radical hidroxil é pela reação de Haber-Weiss, onde o O₂ reage com o intermediário H₂O₂ (equação 2) ⁽¹⁹⁾.

O edema mitocondrial é o sinal mais precoce do estresse oxidativo renal demonstrado pela geração do radical livre superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que resulta na perda do gradiente de sódio córtico medular, acompanhado pela redução da TFG. O excedente celular resultante dos efeitos da hipóxia com a lesão oxidativa mediada por EROs afeta o DNA mitocondrial e nuclear, a membrana lipídica e as proteínas celulares, incorrendo em apoptose e necrose celular localizadas entre a alça espessa ascendente medular e o segmento S₃ do túbulo proximal na medula externa, bem como nas estruturas papilares ^(19,22).

O H_2O_2 tem alta habilidade de penetrar nas membranas biológicas, sendo um sinalizador intracelular de moléculas. Uma vez produzido em excesso, o H_2O_2 ativa o sistema enzimático antioxidante, que é representado pelas enzimas antioxidantes endógenas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD) para a eliminação do radical $O_2^{\cdot-}$ (equação 3), a catalase e a glutathiona peroxidase, que são relacionadas com a eliminação do H_2O_2 e peróxidos orgânicos (equações 4 e 5) ^(19,22).

A glutathiona peroxidase é considerada uma enzima de alta efetividade entre as enzimas antioxidantes, pois atua contra peróxidos lipídicos e o H_2O_2 utilizando a NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato), sendo utilizada como espécie redutora. A glutathiona peroxidase é conhecida como o antioxidante endógeno de maior peso molecular de citoplasma com presença significativa no rim ⁽²⁰⁾. Estudo experimental *in vivo* demonstrou redução no nível das enzimas antioxidantes e aumento dos níveis de malondealdeído (MDA) após exposição do tecido renal ao diatrizoato de meglumina (contraste hiperosmolar) ⁽²³⁾.

Uma diagramação dos possíveis mecanismos celulares envolvidos na lesão renal pelos contrastes iodados está apresentada na figura 1 ⁽¹⁸⁾.

Figura 1: Mecanismo de lesão renal na NIC – A administração do contraste iodado altera a atividade do transporte tubular, que resulta em vasoconstrição intra-renal e hipóxia. Consequentemente, a hipóxia medular intensifica a geração de EROs, a disfunção endotelial e tubular.

A NIC em pacientes diabéticos consiste no modelo de lesão renal de origem nefrotóxica, acometendo até 29,4% dos pacientes que recebem esse agente ^(1,2,9). O DM pode ser induzido por toxicidade química, endocrinopatias e desordens nos receptores de insulina, em associação com a doença exócrina

pancreática. É clinicamente caracterizado por hiperglicemia resultante da insuficiência insulínica crônica e aguda. As duas maiores formas clínicas do DM são o tipo 1 (DM-1) e tipo 2 (DM-2) ^(24,25).

O DM-1 resulta da interação dos fatores genéticos e ambientais levando a destruição autoimune das células β pancreáticas nas ilhotas de Langerhans, prejudicando a produção de insulina. Por esse motivo, portadores do DM-1 são dependentes da administração da insulina exógena ⁽²⁵⁾.

O DM-2 corresponde a 85% dos casos de DM. Caracteriza-se por resistência insulínica e está associado a fatores ambientais e obesidade ⁽²⁵⁾. Na clínica, tem sido demonstrado que os efeitos tóxicos dos CIs são potencializados quando o paciente apresenta disfunção renal pré-existente derivada de doenças crônicas como o DM (nefropatia diabética, ND) ^(6,26).

Estudo de Bartholomew et al. (2004) sobre fatores clínicos na NIC formularam modelo para mensuração de risco para sua ocorrência. Foi demonstrado que a creatinina sérica elevada, a existência prévia de IRC e o DM corresponderam a 75% do modelo preditivo durante o procedimento. Outros fatores que contribuíram menos significativamente para a análise foram a necessidade de procedimentos de urgência e emergência, uso de dispositivo vascular como balão intra aórtico, idade acima de 80 anos e sexo feminino ⁽²⁷⁾. Dentre os fatores mencionados, o DM pode se configurar como fator de risco modificável na maioria dos casos. O controle glicêmico pode ser considerado estratégia de proteção para complicações advindas do DM.

Os pacientes portadores de DM apresentam alterações na microvasculatura, decorrentes da hiperglicemia crônica, que induzem alterações hemodinâmicas, disfunção endotelial e ativação de processos inflamatórios, que resultam em desequilíbrio metabólico e lesão oxidativa em rins, olhos, nervos, fígado, sistema vascular, imunológico e gastrointestinal ^(25,28). A hiperglicemia crônica determina hiperfiltração glomerular resultante da vasodilatação da arteríola aferente em relação à arteríola eferente, que se reflete como aumento da pressão hidrostática e maior passagem de fluídos pelo glomérulo. Trata-se de disfunção endotelial e hemodinâmica mediada pelo aumento de vasodilatadores prostanoídes e NO, aumento da reabsorção nos túbulos distais que resultam no

aumento da TFG, diurese osmótica e hipertrofia tubular⁽²⁸⁾. A disfunção glomerular é evidenciada pela albuminúria decorrente do aumento do catabolismo e síntese de macromoléculas da membrana basal, como o colágeno e os proteoglicanos, que evoluem para o espessamento da membrana basal do glomérulo. A expansão da matriz extracelular da área mesangial é um sinal clássico e preditor da ND, associada à diminuição da TFG e redução da área de filtração na superfície glomerular^(25,28).

Em condições fisiológicas, o FSR é resultante da influência de vasodilatadores e vasoconstritores locais mediados pelos sistemas NO, prostaglandinas, adenosina e a endotelina^(12,17). Na presença da NIC e ND, o NO – potente vasodilatador e modulador do mecanismo de lesão renal – é liberado na presença de acetilcolina, bradicinina, endotelina, angiotensina II e hipóxia⁽²⁹⁾. O NO reduz a reabsorção de sódio em todos os segmentos tubulares, incluindo túbulo proximal, alça espessa ascendente, túbulo distal e ducto coletor cortical, com isso diminui o consumo de oxigênio das células epiteliais e os riscos de hipóxia medular. A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintase neural (nNOS) são responsáveis pela geração de NO em pequenas concentrações por curtos períodos para desempenho de funções fisiológicas. Em contrapartida, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), na presença de processos inflamatórios ou de citocinas pró-inflamatórias, mantém altas concentrações de NO, que resultam em lesão celular^(30,31,32).

Adicionalmente, o NO pode interagir com o radical $O_2^{\cdot -}$ e formar o peróxido nitrito ($ONOO^-$), que reage com as proteínas e induz a oxidação do grupamento tiol. A presença do radical $O_2^{\cdot -}$ em tecidos de órgãos isquêmicos, representada pela reação $O_2^{\cdot -} + NO \longrightarrow ONOO^-$, inativa a ação do NO e reduz a biodisponibilidade dessa molécula⁽³⁰⁾.

Portanto, os efeitos deletérios da NIC são potencializados na presença de patologias que reduzem a capacidade funcional das células renais, sendo a hiperglicemia crônica e a ND focos desse estudo. Considerando dados divulgados anteriormente, que descreveram a nefrotoxicidade isolada do CI como episódio menos frequente e que, em modelos animais, exige dose mais alta desse agente⁽³³⁾, a hipótese desse estudo é que em animais submetidos à hiperglicemia

crônica, a dose única de CI pode representar insulto nefrotóxico e desencadear LRA.

Mudanças no comportamento e estilo de vida da população mundial durante o último século resultaram no dramático aumento da incidência de DM associada ao envelhecimento. As doenças crônicas exigem desenvolvimento de medidas preventivas específicas pela comunidade científica, com o objetivo de otimizar os cuidados com o paciente. Considerando que as terapêuticas invasivas – como cinecoronariografias e exames de imagens diagnósticos – são imprescindíveis na prática clínica do século XXI, elucidar os mecanismos envolvidos com as nefropatias de origem nefrotóxica causadas pelo CI é de extremo interesse para a saúde do indivíduo, das organizações hospitalares privadas e governamentais e da comunidade em geral.

A utilização de modelos experimentais com animais, resguardados os princípios éticos para o manuseio das espécies, representa alternativa viável para o estudo de variáveis isoladas que participam da fisiopatologia da NIC em ambientes de hiperglicemia crônica e ND.

Os resultados desses investimentos podem contribuir para a elucidação da doença, para a busca de terapêutica, para o sucesso da terapia e, por fim, para a redução da morbimortalidade dessa população.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Caracterizar os parâmetros fisiológicos, função renal, perfil oxidativo e histologia renal da ND e da NIC em ratos diabéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar em grupos de animais diabéticos, com e sem nefrectomia, submetidos ao tratamento com CI:
 - Parâmetros fisiológicos;
 - A função renal por meio do *clearance* de creatinina;
 - Albuminúria;
 - O perfil oxidativo da lesão renal;
 - Histologia renal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema Nanopure da Bransead.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico da marca Sigma-EUA, exceto quando especificado no texto.

3.1.2 Lista de abreviaturas de reagentes e soluções

BHT	2[6] – di-ter-butil-p-cresol
DTNB	5,5' - ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico)
DTPA	dietilnotriamina – N,N,N',N' – pentaacetato
TCA	ácido tricloroacético
Xilenol-Laranja	ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3'' bis (metilamino) ácido diacético)

3.1.3 Animais

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA – e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA (**Anexo A**).

Foram utilizados ratos da raça Wistar machos, adultos, pesando entre 250-310 g. Os animais dos diversos grupos foram mantidos com livre acesso à água e alimentos e permaneceram em condições térmicas com ciclos alternados de dia e noite.

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Nefrectomia unilateral esquerda

Os animais foram anestesiados com Thiopentax® (Cristália, Brasil) (tiopental sódico: 40-50 mg/kg), intraperitoneal (i.p.) e submetidos a laparotomia. O pedículo renal esquerdo foi clampeado e feito ligadura com fio cirúrgico. Em seguida, foi realizada a ressecção do rim E. Os animais foram avaliados até a recuperação anestésica, permanecendo em camas cirúrgicas térmicas. Após, foram devolvidos ao biotério, onde permaneceram por 20 dias para a recuperação do ato cirúrgico em gaiolas coletivas.

3.2.2 Indução do Diabetes por estreptozotocina

A estreptozotocina (STZ) é um glicosídeo nitroso natural isolado do *Streptomyces achromogene*, a qual estimula a produção de radicais livres, levando à destruição e disjunção das células beta da ilhota de Langherans⁽³⁴⁾. Após o período de 20 dias depois da nefrectomia, os animais foram submetidos a indução do DM com STZ.

A STZ foi diluída em tampão citrato 0,01M pH4,2, na dose 65 mg/kg⁽³⁵⁾. Os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v) na veia caudal, após serem anestesiados com Thiopentax® (tiopental sódico: 40-50 mg/kg), intraperitoneal (i.p.).

Após o período de 48 horas, foi verificada a glicemia por hemoglicoteste, por meio de tiras Advantage® (Advantage – Roche, Brasil). Foram selecionados para os grupos diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dl. Durante o período de 12 semanas (85 dias), o peso corporal do animal e a glicemia foram controlados semanalmente. Foi administrada diariamente 0,5-2 U de insulina NPH (Lilly, Brasil) para manutenção da glicemia entre 300-500 mg/dl.

3.2.3 Administração do contraste iodado

Os animais receberam uma dose de 6 ml/kg i.p. de CI – ioxitalamato de meglumina e sódio (Telebrix® 300 mg/ml-Guerbet, Brasil) ⁽³⁶⁾ no 85º dia do protocolo.

3.2.4 Apresentação dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- **Citrato (controle)**: administração do tampão citrato;
- **Nefrectomia+Citrato**: animais submetidos à nefrectomia e administração do tampão citrato;
- **DM**: indução do DM por meio da administração da STZ;
- **Nefrectomia+DM**: animais submetidos à nefrectomia e administração da STZ;
- **DM+CI**: administração da STZ no 1º dia, e após 12 semanas, administração do CI no 85º dia;
- **Nefrectomia+DM+CI**: animais submetidos à nefrectomia e administração da STZ, após 12 semanas a administração de CI no 85º dia.

3.2.5 Protocolo experimental

Figura 2. Descrição do protocolo experimental.

3.2.6 Gaiola metabólica

Ao final do protocolo, os animais dos diversos grupos foram colocados em gaiolas metabólicas para mensuração do volume urinário, ingestão hídrica e alimentar de 24 horas e amostra urinária para realização de estudos de função renal e estresse oxidativo (Fig. 3).

Figura 3. Ilustrações da gaiola metabólica.

3.2.7 Coleta de amostra e preparo do tecido renal

Após a retirada das gaiolas metabólicas, os animais foram anestesiados novamente com, Thiopentax® (tiopental sódico: 40-50 mg/kg) i.p. e submetidos à laparotomia para coleta de sangue, por meio da punção da aorta abdominal, para estudos de função renal.

O rim direito foi retirado e uma alíquota foi imersa em solução de metilcarmo, sendo resfriada a -4°C por 24 horas. Após esse período, o tecido renal foi acondicionado em álcool 70%, desidratado e embebido em parafina para cortes histológicos. A coloração do tecido renal foi realizada com hematoxilina-eosina e montagem final das lâminas para posterior análise histológica. A outra alíquota foi imediatamente resfriada e acondicionada a -80°C para estudos posteriores de mensuração das enzimas antioxidantes.

Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia do animal, segundo as normas éticas para manuseios de animais em laboratório de pesquisa.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Função Renal

3.3.1.1 Clearance de Creatinina

A TFG foi avaliada por meio da metodologia do *clearance* de creatinina a partir da dosagem das creatininas sérica e urinária. A dosagem de creatinina urinária e plasmática foi determinada por colorimetria pelo método de Jaffé.

O *clearance* de creatinina foi calculado através da fórmula (1) ⁽³⁷⁾:

$$\text{Clearance de Creatinina} = \frac{\text{Creatinina urinária} \times \text{fluxo urinário}}{\text{Creatinina sérica}} \quad (1)$$

Os valores do *clearance* de creatinina por 100 gramas foram expressos por ml/min.

3.3.2 Determinação da Albuminúria

A albuminúria foi avaliada por meio do método de imunodifusão radial, baseado na reação e precipitação de anticorpo de coelho anti-albumina de rato, com albumina presente na urina dos ratos. Foram construídas duas curvas padrão, uma de alta e outra de baixa concentração de anticorpos ⁽³⁸⁾.

3.3.2.1. Determinação da curva padrão

Utilizaram-se placas de ágar-gel contendo anticorpo anti-albumina de rato, onde foram feitos poços com capacidade para 10 microlitros, que foram preenchidos com albumina de rato em concentrações conhecidas e crescentes. A reação antígeno-anticorpo causou uma precipitação ao redor do poço, formando um halo, cujo diâmetro foi proporcional à quantidade de albumina presente. A leitura foi realizada após 48 horas da reação, sendo determinado um valor numérico, e então foi construída uma curva, resultante dos pontos de intersecção entre o diâmetro do halo e a concentração de albumina. Duas curvas padrões foram preparadas, uma para placa de baixa (título de 1/160) e outra placa de alta (título de 1/40) concentração de anticorpos de coelho anti-albumina de rato. As faixas de segurança de leitura foram determinadas pela menor e maior concentração de albumina usada, permitindo uma larga margem de leitura.

3.3.2.2. Albuminúria

A albuminúria das diferentes amostras foi inicialmente determinada em placas de alta concentração, para amostras de volume abaixo de 50ml/24h e em placas de baixa concentração para volumes maiores, já estas últimas eram mais diluídas. Colocou-se em cada poço 10 microlitros de urina de rato. Nas primeiras 24 horas, verificou-se a presença ou não de halo, e quarenta e oito horas depois foi realizada a leitura definitiva. Com o valor do diâmetro do halo, leu-se nas curvas padrões correspondentes o valor da albuminúria em microgramas/ml. Este valor foi multiplicado por 24h e dividido por 1000, obtendo-se a dosagem da albuminúria em mg/24h.

3.3.3 Estresse Oxidativo

3.3.3.1 Método FOX-2 para peróxidos urinários

Os peróxidos são encontrados em todos os fluídos corporais, especialmente na urina. Alterações de seus níveis são consideradas como marcadores de geração de H_2O_2 ou preditores da extensão da lesão oxidativa *in vivo* ⁽³⁹⁾. A mensuração direta de peróxidos pode ser realizada através do método de análise FOX-2 ⁽⁴⁰⁾.

O método FOX-2 consiste na determinação dos níveis de peróxido pelo método ferro-xilenol laranja. Os peróxidos são considerados como potenciais indicadores da formação ou resultantes das moléculas reativas de oxigênio ⁽⁴¹⁾.

Os peróxidos oxidam o íon Fe^{2+} para íon Fe^{3+} quando diluídos em solução ácida, como descrita na reação abaixo:

O xilenol laranja apresenta alta seletividade para o íon Fe^{3+} , produzindo um complexo de coloração azul-arroxeados ($\alpha = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ⁽⁴¹⁾.

A preparação da solução obedeceu à seguinte ordem para realização do método de xilenol laranja versão 2 (FOX-2):

- 90 ml de metanol e 10 ml de água bidestilada;
- 100 μM de xilenol laranja;
- 4 mM de BHT;
- 25 mM da solução de ácido sulfúrico;
- 250 μM de sulfato ferroso de amônio (Vetec Química – RJ, Brasil).

A resultante da somatória dos reagentes acima consistiu na solução FOX. Na etapa seguinte, 100 μl da amostra urinária fresca foi acrescentada em 900 μl da solução FOX-2. A solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 560 nm, após a retirada de resíduos de proteínas ou outros materiais da centrifugação ^(41,42).

Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos/grama creatinina ⁽⁴²⁾.

3.3.3.2 Análise de tióis solúveis não proteicos no tecido renal

O mais relevante composto tiólico presente em sistemas biológicos é a glutathiona (GSH). A GSH está presente em todas as células e se constitui em principal tampão redox, onde suas funções biológicas estão centradas no grupamento tiól, presente na cadeia lateral que passa por repetidos ciclos de oxidação e redução. Dessa forma, a GSH se alterna entre sua forma reduzida (GSH – o tiól encontra-se na forma sulfidríla livre) e a sua forma oxidada (GSSG – os tióis de duas moléculas de GSH condensam por uma ligação de dissulfeto). As altas concentrações de GSSG indicam desequilíbrio redox ou presença de lesão oxidativa. Portanto, a mensuração de tióis foi utilizada como indicador de estresse oxidativo, considerando o seguinte princípio: quanto maior o grau de estresse oxidativo, maiores serão os níveis de tióis oxidados e menores concentrações de tióis no tecido renal ⁽⁴³⁾.

A quantificação dos tióis seguiu com a homogeneização do tecido renal dos animais dos diferentes grupos com 1ml de solução 10 nM de acetato de sódio, 0,5% tween-20 e 100 μ M DTPA em pH 6,5. O homogenato foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C para retirada de debris teciduais. Uma alíquota foi reservada para imediata mensuração de proteínas totais. A segunda alíquota foi precipitada com ácido tricloroacético a 10% (1:1) e novamente centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração de tióis totais.

O volume de 400 μ l das amostras precipitadas e diluídas foram homogeneizadas em 200 μ l da solução com 1mM de DTNB e 100 nM de tampão Tris em pH 8,0. Após 10 minutos em temperatura ambiente, a quantidade de tióis foi determinada pela média da absorbância demonstrada em 412 nm ($\alpha=13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A leitura foi realizada em espectrofotômetro ⁽⁴⁴⁾.

O equacionamento da mensuração de tióis solúveis foi ajustado para a contagem de proteínas total presentes no tecido renal, que exigiu a mensuração

de proteínas por meio do uso do kit Bio Rod, baseado no método Brad-ford, utilizando a albumina sérica bovina como padrão ⁽⁴⁵⁾.

Todos os valores obtidos foram estabilizados em nmol por mg de proteínas totais ⁽⁴⁵⁾.

3.3.3.3 Dosagem de TBARS (Substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico na urina)

O MDA é um dos aldeídos frequentemente analisados em métodos analíticos quantitativos e qualitativos para determinação dos índices de peroxidação lipídica e pode ser detectado por vários métodos, dentre eles por meio da luz ultravioleta em sistema de cromoterapia de alta pressão (HPLC), e também com o uso do ácido tiobarbitúrico, ao qual reage com várias substâncias, dentre elas o MDA ⁽⁴⁶⁾.

A dosagem de TBARS na urina consistiu na adição de 0,4 ml da amostra de urina com 0,6 ml de H₂O. Foram acrescentados nessa diluição 1,0 ml de TCA 17,5% e 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2), sendo que todos os tubos de ensaio com a solução foram mantidos no gelo durante essa primeira etapa do processo. A solução foi homogeneizada e depois colocada em água fervente (banho-maria) durante 20 minutos para reação com ácido tiobarbitúrico.

Na etapa seguinte a solução foi retirada do banho-maria, resfriada em gelo e adicionado 1,0 ml de TCA 70%. A solução foi homogeneizada e incubada por 20 minutos em tubo de ensaio tampado. Ao final, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3.000 rpm e a leitura foi realizada em espectrofotometria em absorbância de 534 nm ⁽⁴⁷⁾.

A quantidade de MDA apresentada em nanomoles foi calculada usando o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Os valores foram expressos por nmol de TBARS/grama de creatinina urinária.

3.3.4 Análise histológica do tecido renal

3.3.4.1 Área de lesão túbulointersticial

As alterações tubulointersticiais foram definidas como presença de edema das células epiteliais, degeneração vacuolar, necrose e descamação das células tubulares. As quantificações da lesão tubulointersticial foram graduadas pelo seguinte critério: 0,5= menos do que 5% das áreas focais; 1= envolvimento de menos de 5-25% do córtex renal; 2= envolvimento de menos de 25-50% do córtex renal; 3= envolvimento de 50-75% do córtex renal e 4= envolvimento de mais de 75% do córtex renal ⁽⁴⁸⁾.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

3.4 LOCAL

Os experimentos descritos acima foram desenvolvidos no Laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo – EEUSP, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Maria de Fatima Fernandes Vattimo – e no Laboratório de Investigação Médica-16, da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Zatz.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o método ANOVA, uma análise de variância a um fator, com comparações pareadas entre os grupos pelo método de Tukey. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os valores $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Conforme demonstrados na Tabela 1, os animais dos grupos DM, Nefré+DM, DM+CI e Nefré+DM+CI apresentaram variabilidade significativa da ingestão de água e ração por 24 horas em relação aos grupos Citrato e Nefré+Citrato (Água: DM: 116 ± 34 ; Nefré+DM: 113 ± 35 ; DM+CI: 112 ± 34 ; Nefré+DM+CI: 198 ± 39 vs Citrato: 23 ± 5 ; Nefré+Citrato: 24 ± 6 ; Ração: DM: 26 ± 4 ; Nefré+DM: 25 ± 8 ; DM+CI: 23 ± 5 ; Nefré+DM+CI: 36 ± 8 vs Citrato: 14 ± 5 ; Nefré+Citrato: 13 ± 5 ; $p<0,05$).

As Figuras 4 e 5 representam a evolução da glicemia e do peso dos animais de todos os grupos por 12 semanas. Ambas confirmam diferenças significativas entre os grupos diabéticos em relação aos controles ($p<0,001$).

Na Tabela 2 observa-se que os grupos de animais que foram submetidos à nefrectomia apresentaram elevação significativa no peso do rim quando comparados com os animais sem nefrectomia (Nefré+Citrato: $2,6\pm0,5$; Nefré+DM: $3,0\pm0,4$; Nefré+DM+CI: $3,0\pm0,3$ vs Citrato: $1,4\pm0,1$; DM: $1,5\pm0,1$; DM+CI: $1,6\pm0,2$; $p<0,001$).

Na relação peso do rim com o peso do animal, os grupos Nefré+DM+CI e Nefré+DM apresentaram aumento significativo quando comparados com os grupos DM, Nefré+Citrato e Citrato (Nefré+DM+CI: $0,91\pm0,08$; Nefré+DM: $0,78\pm0,07$ vs DM: $0,42\pm0,05$; Nefré+Citrato: $0,52\pm0,13$; Citrato: $0,28\pm0,02$; $p<0,001$).

A Figura 6 representa o aspecto visual dos rins de animais sem e com nefrectomia. É possível observar hipertrofia renal nos animais nefrectomizados em comparação com os animais diabéticos.

Tabela 1 - Resultados dos parâmetros fisiológicos dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.

Grupos	N	Água (ml/24h)	Ração (g/24h)
Citrato	7	23±5	14±5
Nefré+Citrato	6	24±6	13±5
DM	6	116±34 ^{ab}	26±4 ^{ab}
Nefré+DM	6	113±35 ^{ab}	25±8 ^{ab}
DM+CI	7	112±34 ^{ab}	23±5 ^{ab}
Nefré+DM+CI	6	198±39 ^{abcde}	36±8 ^{abcde}

^ap <0,05 vs Citrato

^bp <0,05 vs Nefré+Citrato

^cp <0,05 vs DM

^dp <0,05 vs Nefré+DM

^ep <0,05 vs DM+CI

Os valores representam média ± desvio padrão.

Figura 4. Gráfico referente aos resultados da glicemia dos grupos: *Citrato*, *Nefré+Citrato*, *DM*, *Nefré+DM*, *DM+CI*, *Nefré+DM+CI*.^a $p < 0,001$ vs Citrato; ^b $p < 0,01$ vs Nefré+Citrato. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão.

Figura 5. Gráfico referente aos resultados do peso corporal dos grupos: *Citrato*, *Nefré+Citrato*, *DM*, *Nefré+DM*, *DM+CI*, *Nefré+DM+CI*.^a $p < 0,001$ vs Citrato; ^b $p < 0,001$ vs Nefré+Citrato. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 2 - Resultados do peso do rim e da relação peso do rim/peso do animal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.

Grupos	N	Peso do Rim D (gramas)	Peso do rim/Peso do animal (%)
Citrato	7	1,4±0,1	0,28±0,02
Nefré+Citrato	6	2,6±0,5 ^a	0,52±0,13 ^a
DM	6	1,5±0,1 ^b	0,42±0,05 ^a
Nefré+DM	6	3,0±0,4 ^{ac}	0,78±0,07 ^{abc}
DM+CI	7	1,6±0,2 ^{bd}	0,65±0,07 ^a
Nefré+DM+CI	6	3,0±0,3 ^{ace}	0,91±0,08 ^{abce}

^ap <0,001 vs Citrato

^bp <0,001 vs Nefré+Citrato

^cp <0,001 vs DM

^dp <0,001 vs Nefré+DM

^ep <0,001 vs DM+CI

Os valores representam média ± desvio padrão.

Figura 6. Fotos do aspecto macroscópico dos rins sem e com nefrectomia após 3 meses de diabetes. Fotos rins DM (1A e 2A) e fotos rins Nefré+DM (1B e 2B).

4.2. FUNÇÃO RENAL

4.2.1 *Clearance* de Creatinina

Quanto aos parâmetros globais, observou-se tendência ao aumento do fluxo urinário nos grupos em que o DM foi induzido, contudo não se constatou diferença estatisticamente significativa, com exceção do grupo Nefré+DM+CI que demonstrou fluxo urinário superior aos outros grupos tratados com CI.

Quanto às medidas de creatinina urinária e sérica, observou-se que os animais diabéticos apresentaram redução significativa da unidade urinária quando comparados com o controle citrato (DM: $20,4 \pm 14,6$; Nefré+DM: $12,2 \pm 2,7$; DM+CI: $13,1 \pm 1,5$ e Nefré+DM+CI: $6,8 \pm 2,0$ vs Citrato: $52,8 \pm 14,1$ e Nefré+Citrato: $69,2 \pm 7,6$; $p < 0,001$). Observou-se também aumento significativo na creatinina sérica nas mesmas comparações (DM: $0,55 \pm 0,18$; Nefré+DM: $0,64 \pm 0,05$; DM+CI: $0,83 \pm 0,15$; Nefré+DM+CI: $0,87 \pm 0,16$; vs Citrato: $0,22 \pm 0,04$ e Nefré+Citrato: $0,29 \pm 0,04$; $p < 0,001$). Destaque-se a diferença significativa nesses parâmetros quando o CI foi administrado.

A função renal derivou dos parâmetros acima, uma vez que foi mensurada por meio do *clearance* de creatinina. Os grupos Citrato e Nefré+Citrato apresentaram resultados de função renal que foram considerados referência de normalidade (Citrato: $0,54 \pm 0,14$; Nefré+Citrato: $0,51 \pm 0,08$).

Apesar de a nefrectomia ter sido realizada para potencializar o efeito tóxico da hiperglicemia sobre o rim, não se observou diferença significativa entre o grupo Nefré e o grupo DM+Nefré quanto à função renal. Por outro lado, a indução do Diabetes induziu redução significativa nos valores do *clearance* de creatinina em relação aos grupos controles (DM: $0,33 \pm 0,09$; Nefré+DM: $0,32 \pm 0,05$ vs Citrato: $0,54 \pm 0,14$; Nefré+Citrato: $0,51 \pm 0,08$; $p < 0,001$).

Adicionalmente, observou-se que os animais diabéticos que receberam CI apresentaram redução da função renal quando comparados com os grupos DM e Nefré+DM (DM+CI: $0,15 \pm 0,04$; Nefré+DM+CI: $0,23 \pm 0,03$ vs DM: $0,33 \pm 0,09$; Nefré+DM: $0,32 \pm 0,05$; $p < 0,001$).

Tabela 3- *Resultados da função global renal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.*

Grupos	N	Fluxo Urinário (ml/min)	CrU (mg/dl)	CrS (mg/dl)	Clcr/100g (ml/min)
Citrato	7	0,01±0,02	52,8±14,1	0,22±0,04	0,54±0,14
Nefré+Citrato	6	0,01±0,02	69,2±7,6	0,29±0,04	0,51±0,08
DM	6	0,04±0,03	20,4±14,6 ^{ab}	0,55±0,18 ^{ab}	0,33±0,09 ^{ab}
Nefré+DM	6	0,06±0,01	12,2±2,7 ^{abc}	0,64±0,05 ^{ab}	0,32±0,05 ^{ab}
DM+CI	7	0,06±0,01	13,1±1,5 ^{abc}	0,83±0,15 ^{abcd}	0,15±0,04 ^{abcd}
Nefré+DM+CI	6	0,09±0,01 ^{abc}	6,8±2,0 ^{abcde}	0,87±0,16 ^{abcd}	0,23±0,03 ^{abcde}

Sendo CrU - creatinina urinária; CrS - creatinina sérica; Clcr - *clearance* de creatinina.

^ap <0,001 vs Citrato

^bp <0,001 vs Nefré+Citrato

^cp <0,001 vs DM

^dp <0,001 vs Nefré+DM

^ep <0,001 vs DM+CI

Os valores representam média ± desvio padrão.

4.3. ALBUMINÚRIA

Apesar de ter sido identificada elevação nos valores de albuminúria no grupo Nefré+Citrato, que é um grupo controle, não foi identificada diferença estatística significativa entre ele e o grupo Citrato (Citrato: $0,75 \pm 0,30$ e Nefré+Citrato: $1,64 \pm 0,48$) (Tabela 4).

No grupo DM sem nefrectomia, apesar de demonstrar variação significativa desse parâmetro em relação ao grupo Citrato, não se constatou significância estatística (DM: $3,02 \pm 1,95$; Citrato: $0,75 \pm 0,30$). Os animais dos grupos com nefrectomia e com indução do DM apresentaram elevação significativa da albuminúria em relação ao seu grupo controle (Nefré+DM: $12,37 \pm 3,63$ vs Nefré+Citrato: $1,64 \pm 0,48$; $p < 0,001$). Adicionalmente, o grupo Nefré+DM apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo DM (Nefré+DM: $12,3 \pm 3,6$ vs DM: $3,02 \pm 1,9$; $p < 0,001$).

A administração de CI não demonstrou alteração na excreção urinária de albumina nos animais com nefrectomia (Nefré+DM+CI: $9,8 \pm 4,5$; Nefré+DM: $12,3 \pm 3,6$) e sem (DM+CI: $4,89 \pm 1,58$; DM: $3,02 \pm 1,9$).

Tabela 4- *Resultados da albuminúria dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.*

Grupos	N	Albuminúria (mg/24h)
Citrato	7	0,75±0,30
Nefré+Citrato	6	1,64±0,48
DM	6	3,02±1,95
Nefré+DM	6	12,37±3,63 ^{abc}
DM+CI	7	4,89±1,58 ^{abd}
Nefré+DM+CI	6	9,80±4,54 ^{abce}

^ap <0,001 vs Citrato

^bp <0,001 vs Nefré+Citrato

^cp <0,001 vs DM

^dp <0,001 vs Nefré+DM

^ep <0,001 vs DM+CI

Os valores representam média ± desvio padrão.

4.4. METABÓLITOS OXIDATIVOS

4.4.1. Peróxidos Urinários

O H_2O_2 está presente em todos fluídos corporais, especialmente na urina. A mensuração dos níveis de peróxidos é considerada como biomarcador da geração de H_2O_2 e preditor da extensão de estresse oxidativo em modelos experimentais *in vivo* ⁽⁴²⁾.

Na Tabela 5 é possível verificar que os grupos Citrato e Nefré+Citrato apresentaram resultados que foram considerados referência de normalidade para este parâmetro (Citrato: $7,0 \pm 2,8$; Nefré+Citrato: $9,2 \pm 2,7$).

Os grupos DM, Nefré+DM, DM+CI e Nefré+DM+CI, apresentaram elevação significativa nos valores dos peróxidos urinários quando comparados aos grupos Controle (DM: $32,9 \pm 11,6$; Nefré+DM: $46,2 \pm 21,8$; DM+CI: $44,6 \pm 10,0$ e Nefré+DM+CI: $45,4 \pm 10,2$ vs Citrato: $7,0 \pm 2,8$ e Nefré+Citrato: $9,2 \pm 2,7$; $p < 0,001$).

Por outro lado, à exceção da comparação mencionada acima, não foi constatada diferença significativa na excreção de peróxidos urinários entre os demais grupos.

Tabela 5- *Resultados de peróxidos urinários dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.*

Grupos	N	Peróxidos Urinários (nmol/g creatinina urinária)
Citrato	7	7,0±2,8
Nefré+Citrato	6	9,2±2,7
DM	6	32,9±11,6 ^{ab}
Nefré+DM	6	46,2±21,8 ^{ab}
DM+CI	7	44,6±10,0 ^{ab}
Nefré+DM+CI	6	45,4±10,2 ^{ab}

^ap <0,001 vs Citrato

^bp <0,001 vs Nefré+Citrato

Os valores representam média ± desvio padrão.

4.4.2 Tióis solúveis não proteicos no tecido renal

Existem vários mecanismos antioxidantes de defesa determinados por enzimas, destacando-se a família da glutathione peroxidase. A GSH é um simples tripeptídeo com grupamento tiol localizado na sua cadeia lateral, onde suas funções biológicas são centradas. A GSH está presente em todas as células e se constitui como principal tampão redox. O grupamento tiol passa por repetidos ciclos de redução (GSH – o grupamento tiol encontra-se na forma de sulfidrila livre) e oxidação (GSSG – o grupamento tiólico de duas moléculas de GSH condensam através de uma ligação de dissulfeto) ⁽⁴³⁾.

Conforme demonstrado na Tabela 6, os grupos Citrato e Nefré+Citrato apresentaram altos níveis de tióis no tecido renal e foram considerados referência de normalidade (Citrato: $18,8 \pm 4,9$; Nefré+Citrato: $12,4 \pm 4,6$).

O consumo de tióis, que caracteriza lesão, só foi observado quando pelo menos dois insultos renais foram associados (Nefré+DM: $7,4 \pm 2,9$; DM+CI: $6,2 \pm 2,3$; Nefré+DM+CI: $5,5 \pm 1,9$ vs Citrato: $18,8 \pm 4,9$ e DM: $18,5 \pm 5,9$; $p < 0,001$).

Tabela 6- *Resultados dos Tióis solúveis não proteicos no tecido renal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.*

Grupos	N	Tióis
		(nmol/mg de proteínas totais)
Citrato	4	18,8±4,9
Nefré+Citrato	5	12,4±4,6
DM	6	18,5±5,9
Nefré+DM	5	7,4±2,9 ^{ab}
DM+CI	6	6,2±2,3 ^{ab}
Nefré+DM+CI	5	5,5±1,9 ^{ab}

^ap <0,001 vs Citrato

^bp <0,001 vs DM

Os valores representam média ± desvio padrão.

4.4.3 Dosagem de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) na urina

O MDA é um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica e pode ser detectado indiretamente através da dosagem de TBARS urinário, no qual o ácido tiobarbitúrico reage com várias substâncias, dentre elas o MDA ⁽⁴⁹⁾.

Conforme demonstrado na Tabela 7, os grupos Citrato e Nefré+Citrato foram considerados com valores de normalidade (Citrato: $0,24 \pm 0,07$; Nefré+Citrato: $0,26 \pm 0,07$).

Os grupos DM e Nefré+DM apresentaram elevação significativa de TBARS urinários quando comparados com os grupos controles (DM: $1,61 \pm 0,37$; Nefré+DM: $2,22 \pm 0,61$ vs Citrato: $0,24 \pm 0,07$; Nefré+Citrato: $0,26 \pm 0,07$; $p < 0,001$).

A administração de CI induziu elevação adicional dos TBARS urinários (DM+CI: $3,54 \pm 0,51$ e Nefré+DM+CI: $4,22 \pm 1,04$ vs Nefré+DM: $2,22 \pm 0,61$ e DM: $1,61 \pm 0,37$; $p < 0,001$).

Tabela 7- *Resultados de TBARS urinários dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.*

Grupos	N	TBARS urinários (nmol/g de creatinina urinária)
Citrato	7	0,24±0,07
Nefré+Citrato	6	0,26±0,07
DM	6	1,61±0,37 ^{ab}
Nefré+DM	6	2,22±0,61 ^{ab}
DM+CI	7	3,54±0,51 ^{abc}
Nefré+DM+CI	6	4,22±1,04 ^{abcd}

^ap <0,001 vs Citrato

^bp <0,001 vs Nefré+Citrato

^cp <0,001 vs DM

^dp <0,001 vs Nefré+DM

Os valores representam média ± desvio padrão.

4.4.4 Lesão oxidativa

As Figuras 7, 8 e 9 ilustram as tabelas 5, 6 e 7, demonstrando o perfil oxidativo no modelo de NIC em animais diabéticos.

A oxidação é caracterizada por aumento da geração de EROs (Figura 7), redução da atividade enzimática antioxidante ou o consumo do substrato para a formação de antioxidante (Figura 8) e liberação de metabólitos da peroxidação lipídica (Figura 9).

O aumento dos peróxidos de hidrogênio nos grupos diabéticos acompanha o padrão de elevação da variável TBARS. No entanto, como o TBARS caracteriza a peroxidação lipídica, observou-se um aumento adicional nos grupos que receberam contraste iodado.

Inversamente proporcional, o nível dos tióis no tecido renal (Figura 8) demonstrou o consumo da reserva antioxidante endógena pelos grupos Nefré+DM, DM+CI e Nefré+DM+CI ($p<0,001$), justamente aqueles em que a lesão estabelecida foi mais agressiva.

Figura 7. Gráfico dos resultados dos Peróxidos Urinários dos grupos: *Citrato*, *Nefré+Citrato*, *DM*, *Nefré+DM*, *DM+CI*, *Nefré+DM+CI*. ^ap<0,001 vs Citrato; ^bp<0,001 vs Nefré+Citrato. Os valores representam média ± desvio padrão.

Figura 8. Gráfico dos resultados dos Tióis solúveis não proteicos no tecido renal dos grupos: *Citrato*, *Nefré+Citrato*, *DM*, *Nefré+DM*, *DM+CI*, *Nefré+DM+CI*. ^ap<0,001 vs Citrato; ^bp<0,001 vs DM. Os valores representam média ± desvio padrão.

Figura 9. Gráfico dos resultados dos TBARS urinários dos grupos: *Citrato*, *Nefré+Citrato*, *DM*, *Nefré+DM*, *DM+CI*, *Nefré+DM+CI*. ^ap<0,001 vs Citrato; ^bp<0,001 vs Nefré+Citrato; ^cp<0,001 vs DM; ^dp<0,001 vs Nefré+DM. Os valores representam média ± desvio padrão.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL

4.5.1. Análise de lesão tubulointersticial

A lesão tubulointersticial foi avaliada por meio dos seguintes escores de lesão de 0 a 4. A Tabela 8 apresenta o grau de lesão tubulointersticial dos diversos grupos.

Os grupos Citrato e Nefré+Citrato apresentaram valores próximos a 0 e foram considerados sem lesão tubulointersticial (Citrato: $0,04 \pm 0,03$; Nefré+Citrato: $0,08 \pm 0,10$).

O grupo DM, curiosamente, demonstrou quantificação das alterações tubulointersticial semelhante à dos grupos controle.

Os grupos Nefré+DM e DM+CI, apesar de demonstrarem elevação no índice de lesão, não apresentaram variabilidade estatística para esse parâmetro. O grupo Nefré+DM+CI apresentou aumento significativo da área de lesão tubulointersticial na comparação com os seus grupos controle (Nefré+DM+CI: $0,50 \pm 0,03$ vs DM: $0,07 \pm 0,03$; Nefré+Citrato: $0,08 \pm 0,10$; Citrato: $0,04 \pm 0,03$; $p < 0,05$).

Tabela 8- *Resultados das alterações tubulointersticiais no tecido renal dos grupos: Citrato, Nefré+Citrato, DM, Nefré+DM, DM+CI, Nefré+DM+CI. São Paulo-2013.*

Grupos	N	Quantificação das alterações tubulointersticiais (%)
Citrato	7	0,04±0,03
Nefré+Citrato	6	0,08±0,10
DM	6	0,07±0,03
Nefré+DM	6	0,33±0,15
DM+CI	7	0,30±0,10
Nefré+DM+CI	6	0,50±0,03 ^{abc}

^ap <0,01 vs Citrato

^bp <0,05 vs Nefré+Citrato

^cp <0,05 vs DM

Os valores representam média ± desvio padrão.

A Figura 10 ilustra as alterações tubulointersticiais dos grupos Citrato (A), Nefré+Citrato (B), DM (C), Nefré+DM (D), DM+CI (E), Nefré+DM+CI (F).

Os grupos Nefré+DM e DM+CI apresentaram discretas alterações de característica segmentar e focal.

O grupo Nefré+DM+CI apresentou lesões em 5% da área tubulointersticial.

Figura 10. Fotos dos cortes histológicos para avaliação da área tubulointersticial (aumento 400x) dos grupos: *Citrato* (A), *Nefré+Citrato* (B), *DM*(C), *Nefré+DM*(D), *DM+CI*(E), *Nefré+DM+CI* (F).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Com o aumento do uso de CI em procedimentos diagnósticos invasivos nos últimos 30 anos, a NIC tornou-se a terceira causa mais comum de LRA adquirida em ambiente hospitalar, seguida por hipoperfusão renal e outros medicamentos nefrotóxicos como antibióticos e anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ⁽⁵⁰⁾. A fisiopatologia da NIC consiste na combinação da isquemia renal e toxicidade direta nas células tubulares. O paciente que desenvolve a NIC apresenta maior tempo de permanência hospitalar com consequências onerosas para o panorama da saúde pública.

Aproximadamente 150.000 pacientes desenvolvem NIC a cada ano e pelo menos 1% necessita de terapia de substituição renal (ex. diálise). Os custos estimados com a diálise, por ano, nos EUA, são de \$32 milhões, e no Brasil, R\$1,4bilhões ^(50,51). Adicionalmente, pacientes que desenvolvem a NIC apresentam elevadas taxas de mortalidade, em torno de 22% a 45,2% ⁽⁵²⁾. A ND é a causa mais significativa para a terminalidade da doença renal, contribuindo para morte em todo o mundo. A hiperglicemia crônica tem demonstrado ser o fator determinante da ND.

O termo nefropatia diabética se refere à combinação de lesões que ocorrem de forma concorrente no rim diabético. Nesse contexto, o prognóstico desfavorável dessas patologias estimula a comunidade científica para a busca por modelos experimentais de caracterização da fisiopatologia da NIC e da ND para posteriormente propor estratégias preventivas com o objetivo de melhorar esse cenário.

Considerando os achados clínicos que revelam a incidência geral da NIC de até 50% em pacientes com condições de múltiplas comorbidades como DM-1 ou DM-2 e IRC ⁽¹⁾, o estudo ora apresentado objetivou caracterizar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no modelo animal de LRA por contraste na existência de lesão renal prévia no DM.

Constatou-se o estágio inicial da ND em animais com nefrectomia em que foi induzida o DM. A indução do DM deu-se por meio da STZ – um quimioterápico que degenera as células β do pâncreas, comprometendo a

produção de insulina. Instala-se um quadro hiperglicêmico crônico, característico do DM. Histologicamente, a ND é caracterizada por uma progressiva expansão da matriz mesangial glomerular, principalmente pelo acúmulo extracelular do colágeno IV, laminina, fibronectina e proteoglicanos ^(53,54).

A perda progressiva de peso corporal foi observada nos grupos DM, em consequência da hiperglicemia crônica, sendo esse achado compatível com dados já consolidados com a literatura ^(53,55). Esse fato se justifica pela incapacidade de as células endoteliais modularem as taxas de transporte de glicose, levando ao seu acúmulo no espaço intracelular. A perda de peso corporal é um dos indicadores gerais de regulação metabólica no DM. A gluconeogênese é estimulada para compensar os níveis reduzidos de glicose em função da indisponibilidade da insulina, levando ao comprometimento da composição corporal total ⁽²⁵⁾. Esse resultado é característico do DM e já foi demonstrado por diversos estudos ^(56,57).

Nesse estudo, a manutenção do estado glicêmico foi necessária para contribuir na sobrevivência dos animais submetidos ao DM, visto que o modelo por STZ induz lesões agressivas que podem resultar em alta mortalidade dos animais. A mensuração da glicemia capilar semanal permitiu controlar a glicemia entre 400-500 mg/d, que foi realizada por meio da administração da NPH diária. O estado de hiperglicemia crônica consiste em uma síndrome metabólica relacionada à resistência insulínica, associada à hipertensão arterial, elevação do LDL e triglicérides e redução do HDL, com aumento de risco para obesidade e susceptibilidade a doenças cardiovasculares ^(58,59).

Teles et al. (2009) demonstraram que o controle da glicemia com insulina NPH associada a um inibidor de enzima conversora de angiotensina II, um bloqueador de receptor angiotensina-1 (AT-1) e um supressor do sistema renina-angiotensina no animal diabético por 10 meses promoveu regressão da expansão mesangial e redução da esclerose glomerular na ND ⁽⁶⁰⁾. Em pacientes com DM-1, o uso dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) reduziram o nível da albuminúria e a taxa de progressão da doença renal ⁽⁶¹⁾. Esses achados se confirmam nos estudos em que a terapêutica com insulinas exógenas, anti-hipertensivos, hipoglicemiantes orais e atividade física favorecem o prolongamento e a qualidade de vida do paciente diabético ^(62,63,64).

Em consequência ao desequilíbrio energético do diabético, a intensa lipólise, associada ao enfraquecimento dos transportadores de sódio e glicose nas células tubulares renais resultou, no estudo ora apresentado, em aumento da ingestão de água e ração no rato em que o DM foi induzido. Modelos experimentais mostram dados semelhantes aos encontrados no presente estudo ^(53,65,66).

Os animais nefrectomizados demonstraram aumento do peso relativo renal (peso do rim/peso corporal), manifestação característica da ND. A hiperplasia e hipertrofia resultam do aumento da massa do túbulo proximal, favorecendo intensa reabsorção proximal. O aumento da área tubular favorece a reabsorção do ultrafiltrado glomerular e menores volumes e concentrações de eletrólitos, como Na^+ , Cl^- e K^+ , que alcançam a área da mácula densa e a porção final da alça de Henle e elevam a TFG por meio da ação fisiológica normal do sistema *feedback* tubuloglomerular. Portanto, a hipertrofia tubular causa hiperfiltração glomerular via hiper-reabsorção ⁽⁶⁷⁾. Estudos *in vivo* demonstram que a hipertrofia renal se define como o estágio inicial da ND ^(68,69).

Estudos sobre terapêuticas para intervir no aumento relativo do peso renal ainda são inconclusivos. Wang et al. (2008) demonstraram que o tratamento com cilostazol não melhorou esse parâmetro em ratos com DM pela STZ ⁽³⁴⁾. Por outro lado, o tratamento com o ácido D-Saccharic 1,4 lactone (DSL), um antioxidante presente em frutas cítricas, maçãs e alguns vegetais reduziu o parâmetro nas mesmas circunstâncias ⁽⁷⁰⁾.

No presente estudo, o aumento no fluxo urinário (poliúria) dos animais DM com nefrectomia que receberam CI ressaltou efeito adicional do radiocontraste na ND. A hiperglicemia crônica estimula a síntese de citocinas, como o fator de crescimento β e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), implicados nos mecanismos de fibrose e aumento da permeabilidade glomerular a macromoléculas. Com isso, ocorre elevação da reabsorção mediada pelos cotransportadores de Na^+ - glicose, principalmente nos túbulos proximais, resultando em alteração na hemodinâmica e hiperfiltração glomerular, associada com a dilatação arteriolar aferente, sendo essa última mediada pelo aumento na produção de prostanoídes vasodilatadores e NO ⁽²⁴⁾.

Nos animais DM nefrectomizados que receberam CI, a administração desse agente tóxico pode ter desencadeado desequilíbrio hemodinâmico na microcirculação renal, com elevação dos níveis de cálcio intracelular e alterações na polaridade das células. Essas alterações levam à redução no transporte de Na^+ e água, culminando com a nefrose osmótica. Portanto, a administração do CI pode agravar a hipóxia fisiológica da medula externa, causando acentuada atividade metabólica e consumo de oxigênio com aumento da diurese osmótica e da carga de Na^+ no túbulo distal ^(11,71,72).

Estudo de fisiologia baseado no modelo renal computacional revelou que o uso de ioxitalamato favoreceu o aumento do fluxo urinário consequente da alta osmolaridade do CI ⁽⁷³⁾. Barlak et al. (2010) demonstraram aumento no fluxo urinário em animais que receberam ioxitalamato de sódio (Hexabrix®), após 24 horas de restrição de água e administração de furosemida com redução da TFG ⁽⁷⁴⁾.

No presente estudo, a redução do *clearance* de creatinina nos animais diabéticos com e sem nefrectomia demonstrou a ação deletéria da associação dos fatores metabólicos e hemodinâmicos envolvidos na ND. A alta carga de glicose filtrada nas células tubulares é potencializada, após um insulto tóxico resultante da hiper osmolaridade (1000 mOsm/kg) do CI, que é maior que a do sangue (275 a 299 mOsm/kg). Portanto, ocorre a liberação de substâncias vasoativas, como endotelina, adenosina e tromboxanes, iniciando-se a fase vasoconstritora da NIC, com redução FSR e da TFG, confirmada por dados histológicos com intensa vacuolização do túbulo proximal ^(2,5,71).

Solomon et al. (1994) demonstraram a indução da NIC pelo uso de contraste com baixa osmolaridade em 78 pacientes, sendo 53% diabéticos. Nesse modelo, a NIC foi caracterizada pelo aumento de 0,5 mg/dl da creatinina sérica em 48 horas após a infusão do contraste ⁽⁷⁵⁾. No modelo animal pré-condicionado com isquemia, a indução da NIC foi resultado da administração de alta dose (10 g/l/kg) do CI iopromide, que revelou um aumento da creatinina sérica e da fração de excreção de sódio após 48 horas da infusão do contraste ⁽⁷⁶⁾. Por outro lado, está demonstrado que 24 horas após a administração de CI em ratos

diabéticos, ocorre redução significativa do *clearance* de creatinina e aumento do sódio sérico ⁽⁷⁷⁾.

Na clínica, o cuidado em identificar o paciente de risco para NIC por meio dos valores da creatinina sérica tem sido incorporado. Alguns estudos mostraram que a creatinina sérica maior que 1,5 mg/dl ou valores de TFG menores que 60 ml/min/1,73 m² são fatores de risco para a NIC, sendo contraindicado o uso do CI. Nesses casos, quando constatado a pré-existência de doença renal, outros recursos diagnósticos devem ser recomendados ⁽⁵⁰⁾.

A albuminúria foi outra variável avaliada nesse estudo. No estágio inicial da ND, a albuminúria é manifestada pela incapacidade de filtração glomerular por alterações na síntese e catabolismo de várias macromoléculas, como colágeno IV e proteoglicanos, o que leva ao espessamento da membrana basal glomerular ⁽⁵³⁾.

Estudo de microscopia confocal em ratos demonstrou que a perda do glicocálix endotelial está relacionada com a albuminúria e disfunção vascular, a qual se deve por um defeito na superfície da camada endotelial (SCE). No DM, a redução da SCE representa uma consequência específica da fisiopatologia da ND ⁽⁷⁸⁾.

O aumento da albuminúria nos animais diabéticos nefrectomizados reforçou a importância da nefrectomia para acelerar a progressão da ND e se confirmou como modelo amplamente utilizado em inúmeros trabalhos experimentais ^(35,55,68).

Na ausência da nefrectomia, a ND exige um tempo maior para se desenvolver. O ser humano desenvolve ND ao longo de 10 a 20 anos após a instalação do quadro hiperglicêmico. A sua evolução para estágio final da doença renal requer a implementação de terapias de substituição renal (ex. hemodiálise ou transplante renal) ⁽⁷⁹⁾. No animal, o tempo de evolução desse quadro é de aproximadamente 12 meses para que se atinja o estágio inicial da ND ⁽⁶⁰⁾. Portanto, associar a ND à nefrectomia contribui para a progressão da albuminúria e fibrose, auxiliando em estudos sobre novos tratamentos neste modelo de lesão renal.

No presente estudo, a administração do CI nos ratos diabéticos sem nefrectomia revelou que, apesar do animal não estar no estágio inicial da ND,

visto pela baixa taxa da albuminúria, a função renal foi equivalente aos animais diabéticos nefrectomizados que receberam o CI com elevada taxa de albuminúria. Se comparados esses resultados com outros estudos sobre nefrotoxicidade isolada do CI, em que doses bem mais elevadas desses agentes tiveram que ser administradas, constata-se que a simples coexistência de outro fator de risco como a hiperglicemia crônica é suficiente para predispor a ocorrência de LRA nefrotóxica mista.

Na clínica essa situação é observada entre pacientes que desenvolvem DM-2 que não apresentam alteração na proteinúria de 24 horas, sendo classificados como pré-diabéticos ou em diabetes inicial. Um estudo observacional prospectivo em que a angiografia cardíaca foi utilizada indicou que a hiperglicemia crônica favoreceu a NIC em 42% dos pacientes, em comparação com 5,3% dos pacientes que eram normoglicêmicos e não desenvolveram NIC⁽⁸⁰⁾.

Esse comportamento se deve ao fato de que 95% da administração intravascular de CI são facilmente excretadas pela filtração glomerular, sendo as células tubulares consideradas o principal alvo para a toxicidade⁽⁷⁶⁾. Dessa forma, semelhante ao fator de risco DM, o modelo *in vivo* de pré-tratamento com L-name favoreceu a combinação da inibição do NO e a síntese de PG, que foi suficiente para predispor os ratos à severa injúria do radiocontraste⁽⁸¹⁾.

Goodman et al. (2007) demonstraram que a administração do ioxitalamato de sódio induziu a NIC em animais com nefrectomia após a depleção de volume, com a inibição da cascata de prostaglandina e a restrição de sódio pela dieta⁽⁸²⁾.

Estudos da NIC demonstram ainda que a combinação da hipóxia e lesão parenquimatosa renal tóxica são mediadas por EROs. No insulto tóxico ocorre disfunção endotelial com a formação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios que representam uma resposta de adaptação ao desequilíbrio entre os fatores vasoconstritores e vasodilatadores. Ocorre vasoconstrição local que favorece ao edema celular, com o aumento da expressão de moléculas de adesão e consequente ativação leucócito-endotelial. A despolarização celular induz a expressão de inúmeras espécies vasoativas e manifesta uma reatividade vascular

aberrante, com aumento do tônus basal e prejuízo na autorregulação do FSR, prevalecendo a ação de vasoconstritores como a endotelina ^(11,17,83).

Adicionalmente, a viscosidade dos CIs dentro do leito vascular medular pode aumentar, contribuindo para a hipóxia medular e aumentar a liberação de radicais livres ⁽¹¹⁾.

A hiperglicemia crônica elucida a participação das EROs no mecanismo de lesão da ND, que está associada com a toxicidade tubular direta do CI. Há inúmeros efeitos deletérios na célula, como peroxidação lipídica, oxidação das proteínas celulares e lesão no DNA. Esses efeitos podem resultar em perda da membrana plasmática e integridade da membrana mitocondrial, piorando a função proteica inibindo a proliferação e o reparo celular ^(20,22).

Nesse modelo de NIC em ratos diabéticos foi possível observar um aumento dos níveis de peróxidos urinários nos animais diabéticos com e sem nefrectomia, e nos tratados com CI. Os peróxidos caracterizam-se por apresentar alta penetração nas membranas biológicas, sendo um sinalizador intracelular de moléculas. Uma vez produzidos em excesso, eles desencadeiam a produção do OH^- , o qual é responsável pelo edema mitocondrial, com liberação de toxinas que contribuem para a persistente hipóxia da região medular, evoluindo para a necrose tubular aguda ^(39,42).

Pinto et al. (2008) demonstraram redução nos peróxidos urinários após o tratamento com N-acetilcisteína (NAC) e hidratação em ratos submetidos a NIC ⁽³³⁾. Outros estudos, como o modelo de toxicidade celular pelo sulfato de polimixina B (PMB) e o modelo de isquemia renal 30 minutos com o tratamento do indutor da heme oxigenase-1, também conferiram dados semelhantes ^(84,85).

Para melhor compreensão da fisiopatologia oxidativa na LRA por contraste em modelo diabético, este estudo avaliou o perfil oxidativo da NIC com a mensuração dos tióis no tecido renal.

Os tióis representam a atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase, portanto, na situação de estresse há um consumo desequilibrado da reserva protetora oxidativa endógena, predominantemente representada pelas enzimas catalase, SOD e glutathione peroxidase ⁽²²⁾.

No presente estudo, a redução dos níveis dos tióis nos animais diabéticos e os animais nefrectomizados com diabetes que receberam CI demonstraram a participação das EROs nesse mecanismo de lesão, com intensa degradação do substrato protetor endógeno. Assim, pode se pressupor que a ativação de enzimas antioxidantes potencializou a redução da reserva antioxidante endógena. Nesse contexto, a produção de $O_2^{\cdot -}$ também pode intensificar o aumento da resposta vasoconstritora da arteríola aferente e eferente e a indução da iNOS no tecido cortical renal dos ratos diabéticos que receberam CI.

A administração do CI iohexol em ratos pré-condicionados com glicerol e restrição de água por 24 horas demonstrou a redução dos níveis de glutathione e NO com elevação do TBARS e a atividade da mieloperoxidase (MPO) ⁽⁸⁶⁾.

Adicionalmente, a elevação do TBARS demonstrou o efeito deletério oxidativo adicional do CI nos ratos diabéticos. Os TBARS mensuram indiretamente o MDA. No processo de peroxidação lipídica, o ferro catalisado resulta na formação do radical peroxil ($ROO^{\cdot}$). Uma vez formado, o $ROO^{\cdot}$ participa da liberação de endoperoxídeos, resultando no produto final, conhecido como MDA ⁽⁸⁷⁾.

O MDA pode reagir com as bases guanina, adenina e citosina do DNA para formar os adutos M_1G , M_1A , M_1C , que são nocivos para o parênquima renal ⁽⁸⁷⁾.

Hsu et al. (2011) demonstraram um aumento do MDA e da MPO do tecido renal em ratos pré-condicionados durante cinco dias por gentamicina e que receberam dose única do CI ioxitalamato de meglumina ⁽⁸⁸⁾.

Outro modelo *in vivo* de NIC detectou elevação dos níveis de MDA. O tratamento com o alopurinol melhorou este parâmetro. O alopurinol é um antioxidante que inibe a enzima xantina oxidase, que é precursora da peroxidação lipídica na membrana celular ⁽⁸⁹⁾. Kodama et al. (2013) demonstraram, pelos parâmetros H_2O_2 e MDA, que o tratamento com a proteína tireodoxina 1 em animais com NIC suprimiu o estresse oxidativo, favorecendo a viabilidade celular ⁽⁹⁰⁾. Adicionalmente Oskan et al. (2012) revelaram redução do MDA e apoptose celular pelo tratamento com um antioxidante polifenólico ⁽⁹¹⁾.

No presente estudo, a alteração histológica observada nos animais nefrectomizados diabéticos que receberam CI foi característica da associação das duas patologias, ND e NIC.

Na ND, os ratos diabéticos manifestam mais depósito de glicogênio e fibras de colágeno no mesangio glomerular e membrana basal, caracterizando mudanças típicas de glomeroesclerose e fibrose tubulointersticial, evidenciada com expansão mesangial, depósito da matriz extracelular, injúria tubulointersticial e apoptose via podócitos ⁽⁹²⁾.

Gui et al. (2013) demonstraram o efeito antioxidante da astragaloside IV (AS-IV), uma saponina purificada da raiz do *Astragalus membranaceus*, na prevenção da apoptose de podócitos em animais diabéticos. A AS-IV restaurou a expressão da Bax e Bcl₂ no RNA mitocondrial e nas proteínas do córtex renal, inibindo a ativação da caspase-3 ⁽⁹³⁾. Adicionalmente, em modelos *in vivo* de DM, observou-se hipertrofia glomerular, fibrose intersticial e discreta lesão tubular ^(53,94). Utimura et al. (2003) e Teles et al. (2009) demonstraram que a DM induzida por STZ não estava associada com a lesão tubulointersticial ^(35,60).

No presente estudo, as mudanças histológicas dos animais diabéticos encontram ressonância na literatura e informam alterações tubulointersticiais leves, segmentares e focais.

Por outro lado, os achados histológicos dos animais que receberam CI se caracterizam por vacuolização epitelial tubular, congestão luminal, edema e achatamento das células epiteliais, com formação de castas intratubulares e presença de infiltrado intersticial na arquitetura celular renal. As mudanças histológicas são focais, acometendo 5% das células tubulares renais.

Na NIC, um dos mecanismos primários de lesão é a aparente hiperemia medular, que se forma com intuito de prevenir a hipóxia, o que leva a uma liberação local de substâncias vasodilatadoras em resposta ao CI e a hipóxia ⁽⁸¹⁾.

Nos modelos experimentais da NIC, além da hiperemia medular, foi possível observar extensa necrose das células tubulares, mudanças vacuolares no citoplasma, formação de castas intratubulares e congestão luminal ^(75,77,95). Essas alterações histológicas focais refletem a redução da TFG com alteração da hemodinâmica renal e disfunção tubular, que podem levar à ativação do

mecanismo *feedback* tubuloglomerular ⁽⁹⁶⁾. Nesse contexto, a administração do CI confirmou o potencial tóxico renal desse agente na histologia dos rins dos animais diabéticos, que podem ser considerados como o fator de risco para a NIC.

Sumariamente, nesse estudo a administração da STZ induziu o DM em animais com e sem nefrectomia, evidenciado pela redução do peso corporal, hiperglicemia, polifagia, polidipsia, aumento do peso relativo renal e poliúria. Nos animais com nefrectomia, a elevação da albuminúria confirmou o estágio inicial da ND e abreviou a manifestação dessa síndrome.

A administração do CI em dose única induziu a NIC em animais diabéticos com e sem nefrectomia, demonstrado pela redução do *clearance* de creatinina, desequilíbrio redox e alterações histológicas moderadas.

Aplicado para a clínica, quando no manuseio do paciente diabético sem alteração da função renal confirmada por proteinúria; os resultados desse estudo reforçaram que a simples coexistência do fator DM representa risco absoluto para a toxicidade de medicamentos, destacando-se os CIs, que são utilizados em doses únicas, muitas vezes abusivas, como o que foi reproduzido nesse modelo. Lembrando que não incomum, pacientes sem diagnóstico médico de disfunção renal são preteridos de protocolos profiláticos para toxicidade de contrastes para exames de imagem.

Segundo as estimativas mundiais, em 2030 aproximadamente 366 milhões de pessoas desenvolverão DM, principalmente do DM-2, associada a hipertensão e dislipidemia, aumentando o risco para morbidade de IRC, aterosclerose, doenças coronarianas e isquemia cerebral ^(58,97). Esse panorama desfavorável corrobora para os estudos elucidativos do mecanismo de hiperglicemia como fator de risco para o desenvolvimento de lesões celulares e funcionais nos sistemas renal, cardiovascular, neurológico e pulmonar.

Esse estudo destacou a fragilidade do sistema renal frente à associação dos insultos tóxicos do CI e metabólicos da hiperglicemia crônica e ND em modelo experimental animal. Além disso, esses achados alertam a comunidade científica para o reconhecimento precoce dos pacientes vulneráveis a NIC, sendo necessária a elaboração de novos protocolos diferenciados de identificação do paciente para a

equipe multidisciplinar e estratégias preventivas inovadoras visando reverter os efeitos adversos da fisiopatologia da NIC.

Considerando que a hiperglicemia crônica e seus efeitos sobre a função renal são passíveis de intervenção, esse quadro pode se caracterizar fator de risco modificável para a toxicidade de contraste, dependendo da abordagem clínica implementada.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ A resposta funcional, oxidativa e histológica dos ratos com e sem nefrectomia em que o DM foi induzido confirmou-se como modelo de lesão por hiperglicemia crônica e lesão renal crônica.
- ✓ Os parâmetros fisiológicos se mostraram como característicos do DM e da ND, como polifagia, polidipsia, redução do peso corporal e hipertrofia renal.
- ✓ A administração do CI demonstrou a ação deletéria adicional desse agente na função renal, lesão oxidativa e na histologia renal dos animais diabéticos com e sem nefrectomia. O DM foi considerado fator de risco para NIC.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. McCullough PA, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, Stacul F, et al. Risk prediction of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol*. 2006; 98(6A): 27k-36k.
2. Wong PC, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Int J Cardiol*. 2012; 158(2): 186-92.
3. Bartels ED, Brun GC, Gammeltoft A, Gjorup PA. Acute anuria following intravenous pyelography in a patient with myelomatosis. *Acta Med Scand*. 1954; 150(4): 297-302.
4. McCullough PA. Radiocontrast-induced acute kidney injury. *Nephron Physiol*. 2008; 109(4): 61-72.
5. Solomon R. The role of osmolality in the incidence of contrast-induced nephropathy: a systematic review of angiographic contrast media in high risk patients. *Kidney Int*. 2005; 68(5): 2256-63.
6. Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R. Clinical and experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast media. *J Pharmacol Sci*. 2005; 97(4): 473-88.
7. Pannu N, Wiebe N, Tonelli M. Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy. *JAMA*. 2006; 295(23): 2765-79.
8. Traub SJ, Kellum JA, Tang A, Cataldo L, Kancharla A, Shapiro NI. Risk factors for radiocontrast nephropathy after emergency department contrast-enhanced computerized tomography. *Acad Emerg Med*. 2013; 20(1): 40-5.
9. Wood SP. Contrast-induced nephropathy in critical care. *Crit Care Nurse*. 2012; 32(6): 15-23.
10. Drager LF, Andrade L, Barros de Toledo JF, Laurindo FR, Machado César LA, Seguro AC. Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19(7): 1803-07.

11. Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée JM, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. *Invest Radiol*. 2010; 45(4): 188-95.
12. Vallon V. Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci*. 2003; 18(4): 169-74.
13. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res*. 2009; 77(1): 4-7.
14. Hansen PB, Hashimoto S, Oppermann M, Huang Y, Briggs JP, Schermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the mouse kidney due to preferential activation of A₁ or A₂ adenosine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 315(3): 1150-7.
15. Liss P, Carlsson PO, Nygren A, Palm F, Hansell P. Et-A receptor antagonist BQ123 prevents radiocontrast media-induced renal medullary hypoxia. *Acta Radiol*. 2003; 44(1): 111-7.
16. Bird JE, Giancarli MR, Megill JR, Durham SK. Effects of endothelin in radiocontrast-induced nephropathy in rats are mediated through endothelin-A receptors. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7(8): 1153-7.
17. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int*. 2004; 66(2): 496-9.
18. Ferenbach DA, Kluth DC, Hughes J. Hemeoxygenase-1 and renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2010; 115(3): e33-7.
19. McCord JM. The evolution of free radical and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 108(8): 652-9.
20. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(11): 1287-312.
21. Brandy HR, Brenner BM, Clarkson MR, Liberthal W. Acute Renal Failure. In: Brenner BM editors. *Brenner & Rector's the kidney*. Philadelphia: Elsevier; 2004. v.1.p.1215-92.
22. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*. 2000; 109(8): 665-78.

23. Colbay M, Yuksel S, Uslan I, Acarturk G, Karaman O, Bas O, et al. Novel approach for the prevention of contrast nephropathy. *Exp Toxicol Pathol*. 2010; 62(1): 81-9.
24. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002; 288(20): 2579-88.
25. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013; 93(1): 137-88.
26. Xue-chao W, Xiang-hua F, Yan-bo W, Xin-wei J, Wei-li W, Xin-shun G, et al. Prediction of contrast-induced nephropathy in diabetics undergoing elective percutaneous coronary intervention: role of ratio of contrast medium volume to estimated glomerular filtration rate. *Chin Med J*. 2011; 124(6): 892-96.
27. Bartholomew BA, Harjai KJ, Dukkupati S, Boura JA, Yerkey MW, Glazier S, et al. Impact of nephropathy after percutaneous coronary intervention and a method for risk stratification. *Am J Cardiol*. 2004; 93(12): 1515-9.
28. Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol*. 2012; 74: 351-75.
29. Salom MG, Arregui B, Carbonell LF, Ruiz F, Gonzáles-Moura JL, Fenoy FJ. Renal ischemia induces an increase in nitric oxide levels for tissue stores. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol*. 2005; 289(5): R1459-66.
30. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int*. 2002; 61(3): 855-61.
31. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2002; 61(3): 862-71.
32. Pessoa EA, Convento MB, Ribas OS, Tristão VR, Reis LA, Borges FT, et al. Preconditioning induced by gentamicin protects against

- acute kidney injury: the role of prostaglandins but not nitric oxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 253(1): 1-6.
33. Pinto CF, Vattimo MFF, Watanabe M. Hydration and n-acetylcysteine in acute renal failure caused by iodated contrast: an experiment in rats. *J Nephrol.* 2008; 21(5): 783-8.
 34. Wang F, Li M, Cheng L, Zhang T, Hu J, Cao M, et al. Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2008; 83(25-26): 828-35.
 35. Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 2003; 63(1): 209-16.
 36. Sochman J, Peregrin JH, Burgelová M, Kopkan L, Kramer HJ, Cervenka L. N-acetylcysteine attenuates iodine contrast agent-induced nephropathy in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Blood Press Res.* 2010; 33(2): 149-56.
 37. Dorea EL, Yu L, De Castro I, Campos SB, Ori M, Vaccari EM, et al. Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8(9): 1415-22.
 38. Mancini G, Carbonara AO, Hermans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry.* 1965; 2(3): 235-54.
 39. Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Urinary hydrogen peroxide: a probably marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta.* 2003; 334 (1/2): 205-9.
 40. Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydrogen peroxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem.* 1999; 273(2): 149-55.
 41. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 182-89.
 42. Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 262(3): 605-9.

43. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signally and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(5-6): 1057-64.
44. Akerboom TPM, Sies H. Assay glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981; 77: 373-82.
45. Read SM, Northcote DH. Minimization of the response to different protein of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* 1981; 116(1): 53-64.
46. Shimizu MHM, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Libório AB, Sanches TRC, et al. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23(10): 3067-73.
47. Walker PD, Shah SV. Reactive oxygen metabolites in endotoxin-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 1990; 38(6): 1125-32.
48. Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A. Role of increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(5): 900-8.
49. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci.* 2001; 37(3): 293-303.
50. Jorgensen AL. Contrast-induced nephropathy: pathophysiology and preventive strategies. *Crit Care Nurse.* 2013; 33(1): 37-46.
51. Sesso RCC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR, et al. Diálise crônica no Brasil- Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2011. *J Bras Nefrol.* 2012; 34(3): 272-77.
52. Barreto R. Prevention of contrast-induced nephropathy: the rational use of sodium bicarbonate. *Nephrol Nurs J.* 2007; 122(6): 29-40.
53. Sun H, Ge N, Shao M, Cheng X, Li Y, Li S, et al. Lumbrokinase attenuates diabetic nephropathy through regulating extracellular matrix degradation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013; 100(1): 85-95.

54. Adler S. Structure-Function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 1994; 5(5): 1165-72.
55. Lopes GS, Lemos CCS, Mandarim de Lacerda CA, Bregman R. Effect of unilateral nephrectomy on renal function of diabetic rats. *Histol Histopathol.* 2004; 19(4): 1085-8.
56. Osorio H, Coronel I, Arellano A, Pacheco U, Bautista R, Franco M, et al. Sodium-glucose cotransporter inhibition prevents oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 542042. Epub 2012 Nov 20.
57. Menne J, Shushakova N, Bartels J, Kiyan Y, Laudeley R, Haller H, et al. Dual inhibition of classical protein kinase C- α and protein kinase C- β isoforms protects against experimental murine diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2013; 62(4): 1167-74.
58. Dorhofer L, Lammert A, Krane V, Gorski M, Banas B, Wanner C, et al; DIACORE Study Group. Study design of DIACORE (DIAbetes COHoRtE) - a cohort study of patients with diabetes mellitus type 2. *BMC Med Genet.* 2013; 14: 25. Epub 2013 Feb 14.
59. Chen HM, Shen WW, Ge YC, Zhang YD, Xie HL, Liu ZH. The relationship between obesity and diabetic nephropathy in China. *BMC Nephrol.* 2013; 14(1): 69. Epub 2013 Mar 25.
60. Teles F, Machado FG, Ventura BH, Malheiros DM, Fujihara CK, Silvia LF, Zatz R. Regression of glomerular injury by losartan in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2009; 75(1): 72-9.
61. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med.* 1993; 329(20): 1456-62.
62. Ahmed A, Alsharief E, Alsharief A. Intensive versus conventional glycemic control: what is best for patients with type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr.* 2013; 7(1): 48-51.

63. Scheen AJ. Saxagliptin plus metformin combination in patients with type 2 diabetes and renal impairment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012; 8(3): 383-94.
64. Smith AC, Burton JO. Exercise in kidney disease and diabetes: time for action. *J Ren Care.* 2012; 38(suppl 1): 52-8.
65. Kang KS, Yamabe N, Kim HY, Park JH, Yokozawa T. Therapeutic potential of 20(S)-ginsenoside Rg(3) against streptozotocin-induced diabetic renal damage in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008; 591(1-3): 266-72.
66. Lee AS, Lee YJ, Lee SM, Yoon JJ, Kim JS, Kang DG, et al. An aqueous extract of *Portulaca oleracea* ameliorates diabetic nephropathy through suppression of renal fibrosis and inflammation in diabetic db/db mice. *Am J Chin Med.* 2012; 40(3): 495-510.
67. Vallon V, Blantz RC, Thomson S. Glomerular hyperfiltration and salt paradox in early type 1 diabetes mellitus: a tubulo-centric view. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(2): 530-7.
68. Chen LH, Stead B, Advani SL, Yaqoob N, Thai K, Kabir MG, et al. Hyperglycemia and renal mass ablation synergistically augment albuminuria in the diabetic subtotaly nephrectomized rat: implications for modeling diabetic nephropathy. *Nephron Extra.* 2012; 2(1): 115-24.
69. Rasch R, Norgaard JO. Renal enlargement: comparative autoradiographic studies of 3H-thymidine uptake in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetologia.* 1983; 25(3): 280-7.
70. Bhattacharya S, Manna P, Gachhui R, Sil PC. D-Saccharic acid 1,4-lactone protects diabetic rat kidney by ameliorating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via NF- κ B and PKC signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 267(1): 16-29.
71. Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 68(1): 14-22.

72. Ueda J, Nygren A, Hansell P, Ulfendahl HR. Effect of intravenous contrast media on proximal and distal tubular hydrostatic pressure in the rat kidney. *Acta Radiol.* 1993; 34(1): 83-7.
73. Niederalt C, Wendl T, Kuepfer L, Claassen K, Loosen R, Willmann S, et al. Development of a physiologically based computational kidney model to describe the renal excretion of hydrophilic agents in rats. *Front Physiol.* 2012; 3: 494. Epub 2012 Jan 24.
74. Barlak A, Akar H, Yenicerioglu Y, Yenisey C, Meteoglu I, Yilmaz O. Effect of sodium bicarbonate in an experimental model of radiocontrast nephropathy. *Ren Fail.* 2010; 32(8): 992-9.
75. Solomon R, Werner C, Mann D, D'Elia J, Silva P. Effects of saline, manitol, and furosemide to prevent acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. *N Engl J Med.* 1994; 331(21): 1416-20.
76. Diamantopoulos A, Kyriazis I, Geronatsiou K, Papadaki H, Loudos G, Kagadis GC, et al. Prastatin prevents renal injury following ischemia/reperfusion and radiocontrast administration. *Am J Nephrol.* 2012; 36(3): 278-86.
77. Ahmad A, Mondello S, Di Paola R, Mazzon E, Esposito E, Catania MA, et al. Protective effect of apocynin, a NADPH-oxidase inhibitor, against contrast-induced nephropathy in the diabetic rats: A comparison with n-acetylcysteine. *Eur J Pharmacol.* 2012; 674(2-3): 397-406.
78. Salmon AH, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, et al. Loss of endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(8): 1339-50.
79. Hueper K, Hartung D, Gutberlet M, Gueler F, Sann H, Husen B, et al. Magnetic resonance diffusion tensor imaging for evaluation of histopathological changes in a rat model of diabetic nephropathy. *Invest Radiol.* 2012; 47(7): 430-7.
80. Turcot DB, Kiernan FJ, McKay RG, Grey NJ, Boden W, Perdrizet GA. Acute hyperglycemia: implications for contrast-induced

- nephropathy during cardiac catheterization. *Diabetes Care*. 2004; 27(2): 620-1.
81. Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, Rosen S, Brezis M. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest*. 1994; 94(3): 1069-75.
 82. Goodman AI, Olszanecki R, Yang LM, Quan S, Li M, Omura S, et al. Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Int*. 2007; 72(8): 945-53.
 83. Goldenberg I, Matetzky S. Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies. *CMAJ*. 2005; 172(11): 1461-70.
 84. Dezoti Fonseca C, Watanabe M, Vattimo M de F. Role of heme oxygenase-1 in polymyxin B - induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(10): 5082-7.
 85. Watanabe M, de Moura Neiva LB, da Costa Santos CX, Martins Laurindo FR, de Fatima Fernandes Vattimo M. Isoflavone and the heme oxygenase system in ischemic acute kidney injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(12): 2366-71.
 86. Al-Otaibi KE, Al Elaiwi AM, Tariq M, Al-Asmari AK. Simvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of oxidative stress, proinflammatory myeloperoxidase, and nitric oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 831748. Epub 2012 Oct 10.
 87. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011; 283(2-3): 65-87.
 88. Hsu DZ, Li YH, Chu PY, Periasamy S, Liu MY. Sesame oil prevents acute kidney injury induced by the synergistic action of aminoglycoside and iodinated contrast in rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(6): 2532-36.
 89. Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, Burnett JC Jr. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 1990; 258(1 Pt 2): F115-20.

90. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, et al. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int.* 2013; 83(3): 446-54.
91. Oskan G, Ulusoy S, Orem A, Ersoz S, Alkant M, Yucesan FB, et al. Protective effect of the grape seed proanthocyanidin extract in rat modelo of contrast-induced nephropathy. *Kidney Blood Press Res.* 2012; 35(6): 445-53.
92. Habib SL, Yadav M, Tizani S, Bhandari B, Valente AJ. Tuberin inhibits Production of Matrix Protein Fibronectin in Diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(10): 1652-62.
93. Gui D, Huang J, Guo Y, Chen J, Chen Y, Xiao W, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF- κ B-mediated inflammatory genes expression. *Cytokine.* 2013; 61(3): 970-7.
94. Wang L, Wu CG, Fang CQ, Gao J, Liu YZ, Chen Y, et al. The protective effect of α -lipoic acid on mitochondria in the kidney of diabetic rats. *Int J Clin Exp Med.* 2013; 6(2): 90-7.
95. Ari E, Yilmaz Y, Kedrah AE, Alahdab Y, Cakalagaoglu F, Arikan H, et al. Protective effect of the vasopressin agonist terlipressin in a rat model of contrast-induced nephropathy. *Am J Nephrol.* 2011; 33(3): 269-76.
96. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths-the proximal vs. Distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney Int.* 2010; 77(1): 9-16.
97. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5): 1047-53.

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **060** nas fls. **128** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria de Fátima Fernandes Vattimo**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Nefrotoxicidade induzida por contraste em ratos diabéticos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Cassiane Dezoti da Fonseca**, **Mirian Watanabe**, **Sheila Marques Fernandes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **26.06.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 27 de junho de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP