**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM**

SHEILA MARQUES FERNANDES

**O PAPEL DA COENZIMA Q-10 NA INJÚRIA RENAL AGUDA
INDUZIDA POR CONTRASTE EM RATOS DIABÉTICOS**

São Paulo

2016

SHEILA MARQUES FERNANDES

**O PAPEL DA COENZIMA Q-10 NA INJÚRIA RENAL AGUDA
INDUZIDA POR CONTRASTE EM RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Enfermagem na Saúde do Adulto

Orientadora:

Profª Drª Maria de Fatima Fernandes Vattimo

São Paulo

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO 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

Fernandes, Sheila Marques

O papel da coenzima Q-10 na injúria renal aguda induzida por contraste em ratos diabéticos /

Sheila Marques Fernandes. – São Paulo, 2016.

96p.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fatima Fernandes Vattimo

1. Injúria renal aguda 2. Contraste iodado
3. Diabetes Mellitus 4. Coenzima Q-10 I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Sheila Marques Fernandes.

Título: O papel da coenzima Q-10 na injúria renal aguda induzida por contraste em ratos diabéticos.

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Às pessoas que são os alicerces da minha vida:

Minha mãe **Maria** por ser meu maior exemplo, por acreditar em mim, por todos os conselhos e principalmente pelas correções. Eterna gratidão.

Meu pai **Luiz** pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Meu avô **Francisco** (*in memoriam*) que mostrou a melhor forma de viver.

Minha avó **Marta** por inspirar com sua coragem, força e determinação.

Meus irmãos e amigos de sempre **Renata, Lorena, Eduardo, Rafael e Samuel**.

Minhas sobrinhas **Alícia e Laura** que fazem lembrar a alegria das pequenas, simples e valiosas conquistas diárias.

Meu companheiro **Aleff** por toda parceria, carinho, atenção e motivação.

Ser parte da vida de vocês é a melhor parte da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** por tudo, principalmente pela vida abençoada que me concede.

Agradeço especialmente à **Prof. Dra. Maria de Fátima Fernandes Vattimo** pela oportunidade e dedicação desde o início. Pelo exemplo e orientação, que tanto me inspirou e contribuiu para minha formação científica. Sempre terei grande estima e admiração. Muito obrigada por me ajudar a expandir meus horizontes.

À **Mirian Watanabe** pela amizade, por todo apoio, pela paciência e empenho em ensinar, pelo exemplo de competência e pelo cuidado e envolvimento em projetos que desenvolvi no Laboratório de Experimentação em Modelo Animal (LEMA).

À **Cassiane Dezoti** pela grande parceria no desenvolvimento de projetos de pesquisa e pela amizade que desenvolvemos paralelamente aos projetos em comum, por todos os ensinamentos e pela dedicação que teve com este projeto.

À **Neusa Oliveira** por sua amizade e todo o apoio técnico no laboratório desde o início da minha trajetória de pesquisa.

À **Fátima Freire** pela amizade, companheirismo e ajuda no laboratório.

Aos pesquisadores **Priscilla Mendes, Daniel Malisani, Anna Chimirri e Natalia Abreu** pelo companheirismo no laboratório, ajuda e amizade.

Aos colaboradores do LEMA e da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, pela amizade, receptividade e apoio que foi importante para realização deste trabalho.

Agradeço à **Dra Fernanda Borges** pela colaboração para realização deste projeto com suas valiosas colocações no exame de qualificação e ajuda no

desenvolvimento de técnicas. Agradeço pela receptividade no laboratório, paciência e persistência na realização de experimentos que certamente enriquecerão este trabalho.

Agradeço à **Natalia** e **Vanessa** que me acompanharam durante meus primeiros experimentos na pré-iniciação científica e me fizeram apreciar a pesquisa experimental. Nunca me esquecerei do acolhimento e paciência que tiveram comigo.

À minha grande amiga **Patrícia**, por ter iniciado a jornada de pesquisa comigo na pré-iniciação científica, por ser conselheira e irmã.

A todos os meus professores, desde o ensino básico até o superior, pelos ensinamentos e inspiração que foram essenciais para minha formação.

Aos meus familiares por todo apoio, compreensão e incentivo.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para minha formação pessoal e profissional.

Minha sincera gratidão.

.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.

Martin Luther King

Fernandes S M. O papel da coenzima Q-10 na injúria renal aguda induzida por contraste em ratos diabéticos. [dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2016.

RESUMO

A hiperglicemia crônica favorece a ocorrência da nefropatia induzida por contraste iodado (NIC). Diabetes Mellitus (DM) e NIC compartilham mecanismos de lesão oxidativa e indução de enzimas de proteção e adaptação celular como a coenzima Q-10 (COQ-10). O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da COQ-10 na função e hemodinâmica renal, perfil oxidativo e histologia renal em ratos diabéticos submetidos ao modelo de NIC. Métodos: Ratos Wistar, machos, 250 a 290 g, foram randomizados nos grupos: Citrato: animais que receberam tampão citrato 0,01M, (veículo da estreptozotocina), 0,4 ml intravenoso (i.v), 1 vez; Tween 80: animais que receberam Tween 80, 1%, (veículo da COQ-10), 0,5 ml, intraperitoneal (i.p.), 1 vez; DM: animais que receberam estreptozotocina (65 mg/kg), i.v., 1 vez, no 1º dia do protocolo; DM+CI: animais DM que no 26º dia de protocolo receberam contraste iodado (CI, 6 ml/kg), i.p., 1 vez; DM+CI+COQ-10: animais DM com pré-condicionamento com COQ-10 (10 mg/kg), 1 vez por 6 dias a partir do 22º dia de protocolo, e o tratamento com CI. O protocolo de todos os grupos teve duração de 4 semanas. Foram avaliados parâmetros fisiológicos (ingestão de ração e água, peso, glicemia, razão peso do rim e peso do animal), a função renal (*clearance* de inulina), a hemodinâmica renal (fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal), o perfil oxidativo (peróxidos, óxido nítrico e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na urina, tióis no tecido renal) e análise histológica renal. Resultados: Animais DM apresentaram hiperglicemia, polidipsia, poliúria, polifagia, perda de peso e aumento da relação peso rim/animal, com redução da função renal, além de redução do fluxo sanguíneo renal, elevação da resistência vascular renal, com aumento na excreção de metabólitos oxidativos e consumo de reserva antioxidante endógena. O grupo DM+CI demonstrou redução adicional na função, alterações na hemodinâmica renal e aumento nos parâmetros de estresse oxidativo. A administração de COQ-10 atenuou a redução da função renal, preveniu alterações hemodinâmicas renais e reduziu o estresse oxidativo no grupo DM+CI. As

alterações histológicas no DM e DM+CI foram discretas e o tratamento com COQ-10 previniu a progressão de danos histológicos mais extensos nos animais que receberam CI. Conclusão: O tratamento com COQ-10 demonstrou efeito antioxidante na NIC em ratos diabéticos com melhora significativa da função e hemodinâmica renal.

Palavras-chave: Injúria renal aguda. Contraste iodado. Diabetes Mellitus. Coenzima Q-10.

Fernandes S M. The role of coenzyme Q-10 in acute kidney injury induced by contrast in diabetic rats. [dissertation]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2016.

ABSTRACT

Chronic hyperglycemia favors the occurrence of nephropathy induced by iodinated contrast (CIN). Diabetes Mellitus (DM) and CIN share oxidative damage mechanisms and induction of protective and cellular adaptation enzymes as coenzyme Q-10 (CoQ-10). The aim of this study was to investigate the role of COQ-10 in renal function and hemodynamics, oxidative profile and renal histology in diabetic rats submitted to the NIC model. Methods: Wistar rats, male, weighing 250-290 g, were randomized into two groups: Citrate: animals that received citrate buffer 0.01M (streptozotocin), 0.4 ml, intravenous (i.v.), once; Tween 80: animals that received Tween 80, 1% (CoQ-10 vehicle), 0.5 ml, intraperitoneal (i.p.), once; DM: animals given streptozotocin (65 mg/kg) i.v., once on the first day of the protocol; CI+DM: DM animals, on the 26^o day protocol, treated with iodinated contrast (CI, 6 ml/kg) i.p., once; DM+CI+COQ-10: DM animals preconditioned with COQ-10 (10 mg/kg), once a day, for 6 days from the 22^o day and treated with CI. The protocol for all groups lasted 4 weeks. Physiological parameters evaluated were (food and water intake, corporal weight, blood glucose and right kidney weight), renal function (inulin clearance), renal hemodynamics (renal blood flow and renal vascular resistance), the oxidative profile (peroxides, nitric oxide and reactive substances to thiobarbituric acid in urine, thiols in renal tissue) and renal histological analysis. Results: DM animals showed hyperglycemia, polydipsia, polyuria, polyphagia, weight loss and increased weight kidney / animal relationship with reduced renal function, as well as a reduction on renal blood flow, increased renal vascular resistance and changes in oxidative profile with increased the excretion of metabolites and oxidative consumption of endogenous antioxidant reserve. DM+CI promoted further reduction in renal function, exacerbated hemodynamic changes and increase in oxidative stress parameters. COQ-10 administration preserved renal function, prevented hemodynamic changes and reduced oxidative stress in the DM + CI + COQ-10. Histological changes in DM and DM + CI were discrete and treatment with CoQ-10 prevented the progression of the histologic damage in

the animals receiving CI. Conclusion: COQ-10 presented an antioxidant effect on the NIC in diabetic rats, by improving function and renal hemodynamics and reducing oxidative stress.

Keywords: Acute renal Injury. Iodinated contrast. Diabetes Mellitus. Coenzyme Q-10.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Transferência de elétrons mediada por COQ-10 na membrana mitocondrial.....	28
Figura 2 – Reação simplificada da redução da ubiquinona.....	28
Figura 3 – Gaiola metabólica.....	37
Figura 4 – Sequência cronológica do protocolo experimental.....	38
Figura 5 – Média semanal da glicemia (A), desvio padrão das médias semanais da glicemia dos diversos grupos (B).....	47
Figura 6 – Média semanal do peso (A), desvio padrão das médias semanais do peso dos diversos grupos (B).....	49
Figura 7 – Cortes histológicos para avaliação da área tubulointersticial (aumento 400x) dos grupos: Citrato (A), Tween (B), DM (C), DM+CI (D), DM+CI+COQ-10 (E).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Resultados da ingesta de ração e água dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	51
Tabela 4.2 – Resultados do peso do rim e da relação peso do rim/peso animal dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	52
Tabela 4.3 – Resultados da função renal global dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	54
Tabela 4.4 – Resultados da hemodinâmica global e renal dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	56
Tabela 4.5 – Resultados da excreção de peróxidos urinários dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	58
Tabela 4.6 – Resultados da excreção de TBARS urinário dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	60
Tabela 4.7 – Resultados dos tióis solúveis não proteicos no tecido renal dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	62
Tabela 4.8 – Resultados da excreção de nitrito dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	64
Tabela 4.9 – Resultados da lesão tubulointersticial dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosine
BHT	2[6] – di-tert-butil-p-cresol
BHT	Butilhidroxitolueno
bpm	batimentos por minuto
CI	contraste iodado
Cit C	Citocromo C
COQ-10	Coenzima Q-10
DM	diabetes mellitus
DM-1	diabetes mellitus tipo 1
DM-2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTNB	ácido diotionitrobenzóico
DTPA	ácido dietilenotriaminopentacético
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio
et al	e colaboradores
FADH	flavina-adenina dinucleótido
FSR	fluxo sanguíneo renal
GR	glutathione redutase
GSH	Glutathione
GSSG	glutathione oxidada
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	intravenoso
IRA	injúria renal aguda
LipDH	lipoamida desidrogenase
MDA	malondelaldeído
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NFκ-B	fator nuclear
NIC	nefropatia induzida por contraste
NO	óxido nítrico
PAG	produtos de glicação avançada
PAM	pressão arterial média
PE	polietileno
Pi	fosfato inorgânico
PKC	proteína Kinase C
RVR	resistência vascular renal
TBARS	substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TFG	taxa de filtração glomerular
TGF-β	fator de crescimento transformador β
TNF-α	fator de necrose tumoral-α
TrxR-1	tioredoxina redutase
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SIGLAS

LEMA	Laboratório Experimental de Modelos Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EEUSP	Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo
FSP-USP	Faculdade de Saúde Pública-Universidade de São Paulo
ICBUSP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

-	menos
%	porcentagem
<	menor
=	igual
±	mais ou menos
®	marca com registro
μl	microlitro
μM	micromolar
μmol	micromol
cm	centímetro
dl	decilitro
Dr ^a	doutora
e-	elétron
Fe	ferro
g	grama
h	hora
H ⁺	próton
H ₂ O	água
kg	quilograma
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mm ²	milímetros quadrados
mmHg	milímetros de mercúrio
mOsm/L	miliosmolar por litro
n	número de animais estudados
N	Normal

NaNO_2	nitrito de sódio
nm	nanometro
nM	nanomolar
nmol	nanomol
n°	número
NO_2^-	nitrito
O_2	oxigênio
O^{2-}	ânion superóxido
$^\circ\text{C}$	graus Celsius
p	nível de significância
Prof ^a	professora
rpm	rotações por minuto
X	vezes
α	alfa
λ	comprimento de onda
μm	micrometros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 MATERIAIS.....	34
3.1.1 Reagentes.....	34
3.1.2 Animais.....	34
3.2 PROCEDIMENTOS.....	35
3.2.1 Protocolo de indução do diabetes.....	35
3.2.2 Protocolo de administração da COQ-10.....	35
3.2.3 Protocolo de administração do Cl.....	35
3.2.4 Apresentação dos grupos experimentais.....	36
3.2.5 Gaiola metabólica.....	36
3.2.6 Coleta de amostra sanguínea e determinação do peso renal.....	37
3.2.7 Sequência cronológica do protocolo experimental.....	38
3.3 MÉTODOS.....	39
3.3.1 Função renal.....	39
3.3.2 Perfil oxidativo.....	41
3.3.3 Análise histológica do tecido renal.....	44
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
3.5 LOCAL.....	45
3.5 RECURSOS FINANCEIROS.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	47
4.1.1 Glicemia capilar.....	47
4.1.2 Peso corporal.....	49
4.1.3 Ingesta de ração e água.....	51
4.1.4 Relação peso do rim e relação peso rim/peso animal.....	52
4.2 FUNÇÃO RENAL.....	54
4.2.1 Função renal global e <i>clearance</i> de inulina.....	54
4.3 HEMODINÂMICA GLOBAL E RENAL.....	56
4.3.1 Hemodinâmica global e renal.....	56
4.4 PERFIL OXIDATIVO.....	58
4.4.1 Dosagem de peróxidos urinários.....	58
4.4.2 Dosagem de TBARS urinários.....	60

4.4.3 Dosagem de tióis solúveis não proteicos no tecido renal.....	62
4.4.4 Dosagem de óxido nítrico urinário.....	64
4.5 ANÁLISE HISTOLOGICA RENAL.....	66
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com prevalência global estimada para 366 milhões de pessoas até 2030, o diabetes mellitus (DM) é atualmente um dos principais problemas de saúde pública ^(1, 2). Está associado ao aumento nos custos de serviços de saúde e gastos sociais, com redução da qualidade de vida ^(3, 4, 5). Dentre as principais complicações do DM destaca-se a disfunção renal.

O cenário das doenças renais, de origem primária ou secundária, como é o caso da lesão renal aguda, não é nada amistoso. Isso porque apesar de em algumas partes do mundo, as doenças renais agudas e crônicas serem preveníveis e tratáveis, em outras regiões mais carentes elas são deixadas sem atenção e cuidado. Isso reforça que as investigações na área de doenças renais devem estar comprometidas com a redução dessas diferenças entre países favorecidos e desfavorecidos, sugerindo e promovendo mudanças reais na identificação, tratamento e reabilitação do bem estar dos indivíduos acometidos por essas síndromes.

O DM é uma síndrome caracterizada por desordens metabólicas resultantes de defeitos na síntese e/ou secreção de insulina ou ainda de sua ação nos tecidos. Essas alterações, se mantidas, podem ocasionar um quadro de hiperglicemia ⁽⁶⁾. As duas formas clínicas mais prevalentes do DM são o DM tipo 1 (DM-1) e DM tipo 2 (DM-2). O DM-1 resulta da interação dos fatores genéticos e ambientais que comprometem a produção de insulina, enquanto o DM-2 caracteriza-se por resistência insulínica e está associado a fatores ambientais e obesidade ^(7, 8). Distúrbios endócrinos, retinopatias, neuropatias e nefropatias são complicações frequentes entre os portadores do DM com hiperglicemia crônica ^(9, 10).

O mecanismo pelo qual a hiperglicemia sustentada provoca alterações funcionais e estruturais nos rins ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se que a hiperglicemia diabética ativa vias que participam simultaneamente do desenvolvimento de complicações no DM sendo os pontos chaves: (a) via dos polióis, (b) ativação de proteína quinase C (PKC);

(c) acúmulo de produtos de glicação avançada (PAG); (d) ativação da biossíntese de hexoaminas e (e) estresse oxidativo ⁽¹¹⁻¹³⁾.

O excesso de glicose induz aumento de seu metabolismo pela via dos polióis que reduz sistemas antioxidantes endógenos e induz a síntese de diacilglicerol, principal ativador fisiológico da PKC ⁽¹³⁾. A PKC está envolvida no aumento da endotelina e redução do óxido nítrico (NO), o que ocasiona anormalidades de fluxo sanguíneo renal (FSR) no DM; na síntese de NADPH oxidases, que estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); na síntese de citocinas inflamatórias, como o fator de crescimento transformador β (TGF- β), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator nuclear (NF κ -B) ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Esses fatores estão diretamente ligados ao mecanismo de fibrose, perda progressiva da função renal e aumento da permeabilidade glomerular a macromoléculas como as proteínas ^(14,17). Adicionalmente, a glicose também pode agir sobre as proteínas circulantes e estruturais, gerando os chamados PAG, que causam disfunção celular e estão envolvidos no mecanismo fisiopatológico de liberação de EROs e citocinas inflamatórias ^(18, 19). Por fim, o aumento da atividade da via das hexosaminas, estimulado pela hiperglicemia, resulta em alterações na expressão gênica com aumento na produção de citocinas inflamatórias e EROS ^(12, 20).

EROs são átomos, íons ou moléculas instáveis que comportam oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita mais externa ⁽²⁰⁾. EROS podem ser radicais (superóxido, hidroxila, peroxila, alkoxila, hidroperoxila) e não radicais (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, ozônio, oxigênio *singlet*, peróxidos lipídicos), sob determinadas condições algumas espécies não radicalares podem ser convertidas em espécies radicalares. Os radicais livres são alvo de grande preocupação, pois podem interagir com as principais classes de biomoléculas no organismo ⁽²¹⁾.

Entre os efeitos tóxicos desencadeados pelas EROs, podem ser citados a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas celulares e lesão dos ácidos nucleicos. A produção excessiva de EROs está relacionada com o desenvolvimento da lesão oxidativa e depleção de sistemas antioxidantes

endógenos, caracterizando a instalação de um quadro de estresse oxidativo (20, 21).

O estresse oxidativo desempenha papel central na lesão celular por hiperglicemia. Elevados níveis de glicose estimulam a produção de EROS e favorecem a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN) ⁽²²⁾. A interação do ânion superóxido, uma EROs não radicalar, com o NO leva a produção de ERN, dentre as quais destaca-se o peroxinitrito, um potente oxidante que age sobre moléculas biológicas causando peroxidação lipídica, nitração de aminoácidos, lesão direta do DNA e oxidação de anti-oxidantes naturais ^(23, 24).

Independente da idade, sexo, grupo étnico e comorbidades, associações consistentes entre o prognóstico clínico e o início da doença renal no DM se baseiam na redução da filtração glomerular e aumento da excreção de albuminúria. Diversos relatos confirmam que os rins não funcionam só como órgãos alvo, mas também podem agravar significativamente ou ainda iniciar processos fisiopatológicos em funções essenciais na manutenção da homeostase corporal, o que corrobora a importância de se estabelecer pensamento analítico quanto a gravidade da sobreposição entre DM e a injúria renal aguda (IRA) ^(25- 27).

Entre os pacientes acometidos por DM, aproximadamente 20 a 30% desenvolvem a nefropatia ^(26, 28, 29). Considerando que a IRA é uma desordem prevenível e tratável, investigações que busquem elucidar mecanismos e agentes com impacto na sua fisiopatologia que possam oferecer evidências pré-clínicas e clínicas são oportunas.

Condições clínicas preexistentes, como o DM, representam fator de risco para a ocorrência de complicações como a nefrotoxicidade por fármacos, exemplo o contraste iodado (CI) ⁽³⁰⁾. Os CIs são utilizados em angiografias, cinecoronariografias e exames diagnósticos contrastados e podem causar IRA, principalmente em pacientes diabéticos ^(30, 31).

A nefropatia induzida por contraste (NIC) consiste em uma deterioração aguda da função renal após administração de CI. A NIC na

clínica é definida como um aumento da concentração absoluta da creatinina sérica de 0,5 mg/dl ou superior a 25% do seu valor basal, que acontece três dias após a administração do CI, na ausência de outras causas de IRA ⁽³²⁾. Ressalte-se que a identificação de IRA de causa única é rara e não incomum esta é abordada como uma síndrome de etiologia multifatorial.

Por ano, mais de 75 milhões de doses de contraste são administradas no mundo e cerca de 150 000 pacientes desenvolvem NIC. Destes, ao menos 1% requer diálise e internação prolongada ⁽³³⁾. Embora entre indivíduos saudáveis a incidência de NIC seja menor que 2%, em pacientes de risco, como diabéticos, a incidência pode ser de até 30% ⁽³⁴⁾.

A fisiopatologia da NIC compreende uma complexa interação entre efeitos vasculares e tubulares decorrentes de toxicidade direta, vasoconstrição e geração de EROs.

O CI é eliminado predominante pelo rim e leva cerca de 24 horas para que isso ocorra em indivíduos saudáveis, no entanto, na NIC, esse processo de eliminação do CI pode causar alterações reológicas e bioquímicas no rim ^(35, 36). Inicialmente, ele promove uma curta vasodilatação renal com aumento do FSR seguido de vasoconstrição, com diminuição do FSR e da taxa de filtração glomerular ⁽³⁷⁾.

A elevada osmolaridade do CI aumenta a pressão hidrostática intratubular, diminuindo a pressão de filtração glomerular e consequentemente diminuindo a taxa de filtração glomerular. Além disso, por ser mais viscoso que o sangue, o CI age sobre a musculatura do vaso causando vasoconstrição e resultando em redução do FSR, hipoperfusão e hipóxia medular ⁽³⁷⁾. A regulação desse processo é feita pela interação entre vasoconstritores e vasodilatadores, em resposta ao desafio metabólico imposto pelo CI ao rim. A endotelina e a adenosina, potentes vasoconstritores, são liberados, enquanto os vasodilatadores, NO e prostaglandina-1, são diminuídos. A redução acentuada da oferta de oxigênio desencadeia mecanismos de lesão túbulo glomerular que resultam na diminuição da taxa de filtração glomerular ⁽³⁷⁾.

Além das alterações hemodinâmicas, a infusão de meios de contraste exerce efeito deletério sobre as células tubulares renais, como consequência da citotoxicidade direta e da isquemia, decorrente da vasoconstrição ⁽³⁷⁾. A citotoxicidade direta ocorre pela ação da osmolaridade do CI, esta altera moléculas de sinalização afetando mecanismos vasodilatadores e de sobrevivência, crescimento e proliferação celular ⁽³⁸⁾. A lesão nas células tubulares provocada pelo CI resulta no aumento da liberação de vasoconstritores diminuição de vasodilatadores, causando predomínio da vasoconstrição e redução do FSR, conforme anteriormente explicado ⁽³⁹⁾. O dano celular causado pode levar a destruição de células epiteliais com obstrução dos túbulos e consequente aumento da pressão intratubular, dificultando o fluxo do fluido tubular ⁽⁴¹⁾.

O CI promove produção de EROS o que contribui para a lesão tubular e vascular. O estresse oxidativo intensifica a disfunção endotelial e ocasiona alteração dos mecanismos que regulam transporte tubular ⁽⁴⁰⁾. Simultaneamente, a atividade enzimática antioxidante diminui criticamente, estabelecendo um estado redox ^(32, 42).

Muitos estudos associam os efeitos deletérios do CI às características dos meios de contraste. Os CI podem ser classificados de acordo com sua osmolaridade, sendo considerados de alta osmolaridade (até 2000 mOsm/L de H₂O), baixa osmolaridade (até 290 mOsm/L de H₂O) e isosmolar (600-800 mOsm/L de H₂O). Uma meta-análise com mais de 25 ensaios demonstrou que o risco de NIC com o uso de CI de alta osmolaridade é maior do que com o uso do CI de baixa osmolaridade ⁽⁴³⁾. O uso de contraste isosmolar reduziu o risco de NIC em relação ao contraste de baixa osmolaridade conforme demonstrado em outra meta-análise envolvendo 2727 pacientes ⁽⁴⁴⁾. Além da osmolaridade, estudos clínicos sustentam que o teor de iodo, a ionicidade, a viscosidade e a dose contribuem para a toxicidade do CI ^(45, 46).

As alterações renais causadas pelo CI associadas à vulnerabilidade do rim diabético confirmam que este grupo de pacientes manifestam fator de risco para NIC. Essa condição de vulnerabilidade ressalta a necessidade de cuidados em relação ao manejo do paciente com DM quando exposto ao CI.

Agentes anti-oxidantes e anti-inflamatórios tem sido investigados no sentido de se esclarecer seus benefícios contra os efeitos deletérios do Cl. Destacam-se nesse estudo os efeitos protetores da coenzima Q-10 (COQ-10) em modelos de lesão oxidativa e inflamatória.

Existem pelo menos dez diferentes tipos de enzimas isoladas que são denominadas de coenzima Q. A COQ-10 é um componente essencial da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e é uma molécula anti-oxidante lipossolúvel ⁽⁴⁷⁾.

A via bioquímica de síntese da COQ-10 é complexa e ainda não esta totalmente elucidada. Sabe-se que é sintetizada endogenamente com envolvimento da tirosina e que utiliza a mesma via de síntese do mevalonato ⁽⁴⁸⁾. Está localizada nas membranas das mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos e complexo de Golgi em células de todos os órgãos, especialmente nos rins, coração, cérebro e fígado. Apresenta-se em duas principais formas, uma forma oxidada (ubiquinona) e uma forma reduzida (ubiquinol) ^(49, 50)

A principal função da COQ-10 acontece na membrana mitocondrial interna, onde em sua forma oxidada, ubiquinona, participa da cadeia de transporte elétrons e translocação de prótons, juntamente com os citocromos e desidrogenases mitocondriais, para produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP). A COQ-10 é responsável pela transferência de elétrons do complexo I e II para o complexo III na cadeia de transporte de elétrons ⁽⁵¹⁾. Neste processo as desidrogenases oxidam os NADH e FADH₂ e transferem prótons e elétrons para os complexos de citocromos. Esses posteriormente reduzem o oxigênio para água e ocorre a fosforilação do ADP, sendo todo este processo fundamental para produção de ATP ⁽⁵²⁾.

Figura 1 – Transferência de elétrons mediada por COQ-10 na membrana mitocondrial.

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), flavina-adenina dinucleótido (FADH), elétrons (e^-), prótons (H^+), oxigênio (O_2), água (H_2O), fosfato inorgânico (Pi), adenosina difosfato (ADP), trifosfato de adenosina (ATP). **Fonte:** Yang YK, Wang LP, Chen L, Yao XP, Yang KQ, Gao LG, Zhou XL. Coenzyme Q10 treatment of cardiovascular disorders of ageing including heart failure, hypertension and endothelial dysfunction. Clin Chim Acta. 2015;450:83-9.

A COQ-10 é único antioxidante lipídico solúvel sintetizado endogenamente. A sua atividade antioxidante está relacionada a capacidade de doar e aceitar dois elétrons em um ciclo redox entre ubiquinol e ubiquinona com envolvimento da enzima de oxi-redução, NAD(P)H oxidase (53).

Figura 2 – Reação simplificada da redução da ubiquinona.

Tioredoxina redutase (TrxR-1), Lipoamida desidrogenase (LipDH), glutatona redutase (GR). **Fonte:** Nordman T, Xia L, Björkhem-Bergman L, Damdimopoulos A, Nalvarte I, Arnér ES, Spyrou G, Eriksson LC, Björnstedt M, Olsson JM. Regeneration of the antioxidante ubiquinol by lipoamide dehydrogenase, thioredoxin reductase and glutathione reductase. Biofactors. 2003;18(1-4):45-50.

Sua forma reduzida denominada ubiquinol, protege os fosfolipídeos de membrana e as lipoproteínas séricas de sofrerem peroxidação lipídica e evita que as proteínas de membrana mitocondrial sofram dano oxidativo induzido por EROs ⁽⁵⁴⁾. Atua diretamente protegendo os componentes celulares ao neutralizar os radicais livres e indiretamente por meio da regeneração de outros anti-oxidantes tais como o α -tocoferol e ascorbato ⁽⁵⁵⁾.

Adicionalmente, a COQ-10 tem propriedades anti-inflamatórias diminuindo a produção de citocinas por interferir na expressão de genes que mediam a resposta inflamatória ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. A indução da COQ-10 tem demonstrado atividade antioxidante e anti-inflamatória em modelo animal de nefropatia diabética e nefrotoxicidade da cisplatina. No modelo de IRA induzida por cisplatina, a indução de COQ-10 foi capaz de preservar a função renal e diminuir a produção de moléculas inflamatórias ^(59, 60).

Estudos demonstram que a COQ-10 atenua o dano oxidativo promovendo redução nas concentrações plasmáticas do marcador de estresse oxidativo malondealdeído, aumento da capacidade antioxidante da glutathione e superóxido dismutase em modelo de hipertensão ^(61, 62). Adicionalmente, Hamilton et al. (2009), mostram que a COQ-10 melhora a disfunção endotelial em pacientes com DM tipo 2 tratados com estatina ⁽⁶³⁾.

Considerando esses achados, dados obtidos em estudos *in vivo* e estudos clínicos sugerem que a COQ-10 seja um agente potencialmente benéfico no quadro de IRA induzida por CI em animais diabéticos. No entanto, apesar de demonstrar potencial terapêutico promissor em quadros de estresse oxidativo, disfunções endoteliais, funcionais e hemodinâmicas e resposta inflamatória, a atividade da COQ-10 na NIC ainda não está esclarecida.

A incidência da IRA cresce em ritmo constrangedor e é atribuída a uma variedade de fatores demográficos interligados, como idade avançada, grande número comorbidades, além da severidade das doenças e o avanço na complexidade da terapêutica clínica e cirúrgica. Por outro lado, o

envelhecimento da população mundial antecipa que as complicações renais ainda vão apresentar crescimento substancial. Nesse sentido, a retroalimentação entre pesquisa básica e clínica, como proposto nesse estudo em que se desenhou a sobreposição entre o modelo crônico de DM e o agudo da NIC, é fundamental, uma vez que pode trazer benefícios concretos na terapia de doenças agudas como IRA por meio da elucidação dos mecanismos envolvidos com a enzima COQ-10.

Nesse cenário, considerando o efeito protetor da COQ-10 em diversos modelos, este estudo propõe verificar a atividade desta coenzima na NIC em ratos diabéticos. A hipótese é que o efeito da COQ-10 possa se sobressair na NIC em animais diabéticos com melhora na função, hemodinâmica e histologia renal e sobre o perfil oxidativo.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- a)** Verificar o papel da enzima COQ-10 na função renal, perfil oxidativo, hemodinâmica e histologia renal de ratos diabéticos com IRA induzida por CI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Avaliar a função renal, perfil oxidativo, hemodinâmica e histologia renal de ratos diabéticos;
- b)** Avaliar a função renal, perfil oxidativo, hemodinâmica e histologia renal de ratos diabéticos com IRA induzida por CI;
- c)** Avaliar a interferência da COQ-10 na função renal, perfil oxidativo, hemodinâmica e histologia renal de ratos diabéticos com IRA induzida por CI.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada por meio do sistema Nanopure da Bransead.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar, machos, pesando entre 250 e 290 g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com livre acesso a água e ração em condições térmicas com ciclos alternados de dia e noite.

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA - ICBUSP), protocolo de registro nº 60, folhas 128 do livro 02 (**Anexo A**)⁽⁶⁴⁾.

Ao término do protocolo experimental, foi realizada a eutanásia do animal, segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório de pesquisa⁽⁶⁵⁾. As carcaças de animais submetidos à eutanásia foram embaladas e acondicionadas em freezer e posteriormente encaminhadas para o descarte. O descarte foi realizado em saco branco, com o símbolo de “risco biológico”, lacrados e depositados em containers para descarte de resíduos biológicos, localizados na área externa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP) e coletados em datas previamente estabelecidas pela instituição.

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Protocolo de indução do diabetes

O DM foi induzido por meio da administração de 65mg/kg intravenosa (i.v.) caudal de Estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Company, St Luis, MO, EUA) dissolvida em 0,4 ml de tampão citrato, pH 4,2. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dl, 24 horas após o procedimento de indução. A determinação quantitativa da glicemia foi feita em amostra de sangue capilar fresco coletado a partir de punção caudal e os valores foram obtidos por meio de tiras-teste e monitor de glicemia (Accu-Chek® Active, Roche Diagnostics).

Durante as quatro semanas subsequentes a indução do DM, o peso corporal e a glicemia de cada animal foram aferidos semanalmente ^(66, 67).

3.2.2 Protocolo de administração da COQ-10

Os animais foram submetidos à administração de 10mg/kg de COQ-10 (Coenzyme Q10, Sigma Chemical Company, Saint Louis, EUA) via intraperitoneal (i.p.), dissolvida em solução de 1% de Tween 80, por 6 dias. O tratamento com COQ-10 foi iniciado no 22º dia do protocolo experimental. Foram quatro dias de pré-condicionamento, seguido de uma dose administrada no dia do CI e a última no dia seguinte ⁽⁶⁸⁾.

3.2.3 Protocolo de administração do CI

Os animais receberam 6 ml/kg de CI (ioxitalamato de meglumina e de sódio), i.p., dose única, no 26º dia do protocolo experimental ⁽⁶⁹⁾.

3.2.4 Apresentação dos grupos experimentais

Os animais foram randomizados em cinco grupos experimentais:

- a) Citrato (n=7):** animais que receberam 0,4 ml de tampão citrato 0,01M (veículo da STZ) em pH 4,2, i.v.;
- b) Tween 80 (n=7):** animais que receberam 0,5 ml de Tween 80, 1%, (veículo da COQ-10), i.p.;
- c) Diabetes (DM) (n=7):** animais que receberam 65 mg/kg de STZ, i.v., diluída em 0,1M de tampão citrato em pH 4,2 no 1º dia de protocolo e prosseguiram em acompanhamento até 28º dia do protocolo experimental.
- d) Diabetes + Contraste Iodado (DM+CI) (n=7):** animais DM que receberam 6 ml/kg de CI, i.p., dose única no 26º dia do protocolo experimental;
- e) Diabetes + Contraste Iodado + Coenzima Q-10 (DM+CI+COQ-10) (n=7):** animais DM que receberam COQ-10, i.p., diluída em Tween 80%, 1%. O tratamento com COQ-10 foi iniciado no 22º dia do protocolo experimental. Foram quatro dias de pré-condicionamento, seguidos de uma dose administrada no mesmo dia da administração de CI e a última dose no dia seguinte.

3.2.5 Gaiola metabólica

No final do 27º dia do protocolo experimental, os animais dos diversos grupos foram colocados em gaiolas metabólicas (Figura 3) para mensuração do volume urinário, ingestão hídrica e alimentar de 24 horas. A amostra urinária foi utilizada para realização de estudos de função renal e estresse oxidativo.

Figura 3 – Gaiola metabólica.

Fonte: Ilustração da gaiola metabólica. São Paulo: Tecnoplast.

3.2.6 Coleta da amostra sanguínea e determinação do peso renal

Após serem retirados das gaiolas metabólicas, os animais foram anestesiados com Thiopentax[®] (tiopental sódico: 50 mg/kg) i.p. e submetidos aos procedimentos necessários para estudos de função renal pela técnica de determinação do *clearance* de inulina, estes procedimentos estão descritos em seção posterior. Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia para coleta de sangue terminal, por meio da punção da aorta abdominal, também para estudos de função renal.

O rim direito foi retirado e em seguida pesado para o cálculo da razão peso do rim e peso do animal, após este procedimento foi acondicionado para análise histológica posterior. O rim esquerdo foi removido e imediatamente acondicionado e armazenados resfriados a -80°C para estudos posteriores de mensuração de tióis não proteicos.

Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia do animal por coleta de sangue terminal, segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório de pesquisa ⁽⁶⁵⁾.

3.2.7 Sequência cronológica do protocolo experimental

A Figura 4 representa a sequência cronológica do protocolo experimental.

Figura 4 – Sequência cronológica do protocolo experimental

Fonte: Fernandes SM. O papel da coenzima Q-10 na injúria renal aguda induzida por contraste em ratos diabéticos. [dissertação]. São Paulo: EEUSP: 2016.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Função renal

3.3.1.1 Determinação da filtração glomerular

A filtração glomerular (FG) foi estimada por meio da técnica de *clearance* de inulina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA). O animal foi anestesiado com Thiopentax[®] (tiopental sódico: 50 mg/kg, i.p) e para manutenção de boa ventilação foi traqueostomizado com tubo de polietileno PE-240. Em seguida, foi realizada a cateterização da veia jugular com tubo de polietileno PE-60, por este acesso foi administrado inicialmente uma dose de 100 mg/kg de inulina 10% seguida da infusão contínua durante todo o experimento em velocidade de 0,04 ml/min mantida por meio de bomba de infusão. A bexiga urinária foi cateterizada com tubo de polietileno PE-240 e após um período de 30 minutos de estabilização do animal, foi iniciada a coleta de urina a cada 30 minutos e colhida amostra sanguínea no início e no final do experimento. A artéria carótida foi cateterizada com tubo de polietileno PE-60 para coleta de sangue e monitoramento dos parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (BIOPAC[®] Systems, Inc, Model MP 150, Califórnia, EUA). As concentrações de inulina na urina e no sangue foram mensuradas pelo método colorimétrico de Antrona e foram utilizadas para o cálculo do *clearance* de inulina, relacionando com o volume urinário em ml/min, pela formula: concentração de inulina= (Inulina na urina x Volume urinário) / Inulina no plasma. O *clearance* de inulina foi corrigido para 100 g de peso corporal do animal e foi expresso em ml/min/100g ^(71, 70).

3.3.1.2 Mensuração do fluxo sanguíneo renal

O FSR foi mensurado ao final do estudo do *clearance* de inulina. Com o animal ainda sob efeito anestésico, foi realizada uma incisão mediana abdominal para dissecação do pedículo renal esquerdo. A artéria renal esquerda foi isolada e envolvida por sonda de fluxo ultrassônica (T402; *Transonic Systems*, Bethesda, Maryland, EUA) para mensuração do fluxo sanguíneo. A resistência vascular renal foi calculada por meio da seguinte fórmula: Resistência vascular renal (RVR) = Pressão arterial média (PAM) / Fluxo sanguíneo renal (FSR). O resultado foi expresso em mmHg/ml/min ⁽⁷¹⁾.

3.3.1.3 Dosagem de creatinina sérica

A dosagem de creatinina sérica foi determinada por colorimetria pelo método de Jaffé ⁽⁷²⁾. A primeira etapa da mensuração consistiu na desproteinização do plasma. Neste processo, 0,5 ml de plasma diluído em 1,5 ml de água destilada (1:5) recebeu 0,25 ml de tungstato de sódio 10% e 0,25 ml de ácido sulfúrico 0,75 N. A solução final foi homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos a 5000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante (1,5 ml) foi retirado e adicionado a 0,3 ml de hidróxido de sódio 0,75 N e 0,3 ml de ácido pícrico 0,036 M. A solução foi homogeneizada e mantida por 20 minutos em temperatura ambiente. A leitura das absorbâncias das amostras foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 520 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

3.3.1.4 Dosagem de creatinina urinária

A dosagem de creatinina urinária foi determinada por colorimetria pelo método de Jaffé ⁽⁷²⁾. Foi utilizando 0,05ml da amostra de urina diluída em 5ml de água destilada (1:100), acrescentando-se 1ml de hidróxido de sódio a 0,75N e 1 ml de ácido pícrico 0,036M. A solução foi homogeneizada e

mantida por 20 minutos em temperatura ambiente. A leitura das absorbâncias das amostras foi em espectrofotômetro em λ 520 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

3.3.2 Perfil oxidativo

3.3.2.1 Dosagem de peróxidos urinários

Os peróxidos são encontrados em todos os fluídos corporais, especialmente na urina, as alterações de seus níveis são consideradas como potenciais indicadores da formação de EROs ^(73, 74).

A mensuração direta de peróxidos foi realizada por meio da reação colorimétrica pelo método de análise FOX-2. Essa reação consiste na utilização de ferro-xilenol laranja que oxidam o íon Fe^{2+} para íon Fe^{3+} . O xilenol laranja [ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3'' – bis (metilamino) ácido diacético] apresenta alta seletividade para o íon Fe^{3+} produzindo um complexo de coloração azul-arroxeadado ($\alpha = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ⁽⁷⁵⁾.

A preparação da solução de FOX-2 respeitou a seguinte ordem:

- 90 ml de metanol;
- 10 ml de água destilada;
- 100 μM xilenol laranja;
- 4 mM BHT (2[6] – di-tert-butil-p-cresol);
- 25 mM da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- 250 μM de sulfato ferroso de amônio.

Na etapa seguinte, 900 μl desta solução e 100 μl da amostra da urina foram homogeneizadas e a solução permaneceu em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. A solução foi centrifugada para retirada de resíduos. Em seguida, a leitura das absorbâncias foi realizada por espectrofotometria em λ 560 nm ⁽⁷³⁾.

Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos/grama creatinina urinária ^(73,74).

3.3.2.2 Dosagem de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) urinário

A peroxidação lipídica é geralmente mensurada em função da produção de malondialdeído (MDA). O MDA é um dos principais aldeídos resultantes da oxidação de lipídeos na cascata de peroxidação lipídica, que reage na presença do ácido tiobarbitúrico em fluídos orgânicos e, portanto é um indicador de peroxidação lipídica ⁽⁷⁶⁾.

A dosagem consistiu na diluição de 0,2 ml de urina em 0,8 ml de água. A essa solução foram adicionados 1 ml de TCA a 17,5% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,6%, pH 2. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em banho maria (água fervente) durante 20 minutos ⁽⁷⁶⁾. Ao término do tempo, a solução foi resfriada em gelo e foi adicionado 1 ml de TCA a 70%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos. Ao fim desta etapa, as soluções foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm e a leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotometria em λ 534 nm ⁽⁷⁶⁾.

Os valores, estabilizados por grama de creatinina urinária, foram expressos por nmol de TBARS/grama creatinina urinária ⁽⁷⁶⁾.

3.3.2.3 Dosagem de tióis solúveis não proteicos no tecido renal

Dentre os sistemas de defesas oxidantes intracelulares e extracelulares encontram-se a glutathiona (GSH), o mais relevante composto tiólico presente em sistemas biológicos. 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

sulfidril 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 ⁽⁷⁷⁾.

A quantificação dos tióis foi realizada a partir de amostras do tecido renal trituradas e homogeneizadas com solução 10 mM de acetato de sódio, 0,5% tween-20 e DTPA (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 dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, por meio do uso do kit Bio Rod, e outra alíquota foi utilizada para dosagem dos tióis solúveis ⁽⁷⁸⁾.

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 volume de 400 µl das amostras precipitadas e diluídas foram homogeneizadas em solução de DTNB e tampão Tris (pH 8,0). Após 10 minutos de reação, a quantidade de tióis foi determinada pela absorbância das amostras obtidas por leitura espectrofotométrica em λ 412nm. A partir da quantificação de proteínas totais fez-se a correlação com a mensuração de tióis solúveis. Todos os valores obtidos foram estabilizados por nmol de tióis/mg de proteínas totais ^(77, 78).

3.3.2.4 Mensuração do óxido nítrico urinário

A síntese de NO foi mensurado indiretamente por meio do nitrito (NO_2^-), metabólito estável do NO, pelo método de Griess. A reação colorimétrica baseia-se na reação dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido (pH entre 2,5 e 5,0) formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. A leitura por espectrofotometria das absorbâncias das

amostras foi realizada em λ 545 nm. A quantidade de nitrito na amostra foi calculada a partir de curva padrão construída usando nitrito de sódio (NaNO_2). O equacionamento da mensuração de NO foi ajustado para valores de creatinina urinária e todos os valores obtidos foram estabilizados em nmol de nitrito por miligrama de creatinina urinária ^(79, 80).

3.3.3 Análise histológica do tecido renal

Amostras do tecido renal foram cortadas e encaminhadas para preparação de lâminas histológicas em laboratório externo. Após serem embebidas em parafina, o tecido foi cortado em secções com espessura de 4 μm e a preparação final das lâminas foi realizada após a coloração do tecido renal com hematoxilina-eosina.

O tecido foi analisado sob microscopia de luz e as alterações tubulointersticiais foram definidas como achatamento celular, hialinização celular, infiltrado no interstício, edema das células epiteliais, degeneração vacuolar, necrose e descamação das células tubulares. As quantificações da lesão tubulointersticial foram graduadas de acordo com a extensão da lesão pelo escore: 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 ^(71, 81). Em cada lâmina foram fotografados 25 campos, somente a região cortical. O escore médio para cada amostra foi calculado e o escore médio de cada grupo foi expresso em porcentagem.

A leitura das lâminas foi realizada com auxílio de patologista externo em microscópio óptico Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) utilizando objetiva de 400X.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. A variância entre os grupos foi analisada por meio do teste ANOVA, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls no programa estatístico Graph-Pad Prism version-3 for Windows[®]. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

3.5 LOCAL

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Modelo Animal (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo (EEUSP), coordenado pela Prof^a Dr^a Maria de Fatima Fernandes Vattimo.

3.6 RECURSOS FINANCEIROS

Os recursos financeiros para o desenvolvimento desse projeto foram providos pelo Processo FAPESP 2013/26560-0 e bolsa de mestrado Processo FAPESP 2014/22551-1.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

4.1.1 Glicemia capilar

Figura 5 – Média semanal da glicemia (A), desvio padrão das médias semanais da glicemia dos diversos grupos (B).^a $p < 0,05$ vs Citrato; ^b $p < 0,05$ vs Tween.

Fonte: Fernandes SM. O papel da coenzima Q-10 na injúria renal aguda induzida por contraste em ratos diabéticos. [dissertação]. São Paulo: EEUSP: 2016.

Os animais dos grupos Citrato e Tween mantiveram valores de glicemia considerados normais. O grupo Citrato foi considerado controle saudável para o modelo de DM. Os animais que receberam STZ para indução de DM apresentaram elevação significativa da glicemia.

A administração de CI aos animais DM (DM+CI) não alterou a glicemia semanal dos animais diabéticos.

O pré- condicionamento com COQ-10 não induziu alteração na glicemia dos animais diabéticos do grupo DM+CI+COQ-10, quando comparados aos grupos de animais diabéticos que não receberam COQ-10.

4.1.2 Peso corporal

Figura 6 – Média semanal do peso (**A**), desvio padrão das médias semanais do peso dos diversos grupos (**B**). ^a $p < 0,05$ vs Citrato; ^b $p < 0,05$ vs Tween.

Fonte: Fernandes SM. O papel da coenzima Q-10 na injúria renal aguda induzida por contraste em ratos diabéticos. [dissertação]. São Paulo: EEUSP: 2016.

O peso médio semanal dos animais dos grupos Citrato e Tween foi considerado como padrão de normalidade. Os animais dos grupos diabéticos apresentaram elevação significativa do peso em relação aos animais do grupo Citrato, controle do modelo de DM.

A administração de CI aos animais DM (DM+CI) não alterou o peso semanal dos animais diabéticos.

Os animais diabéticos que receberam COQ-10 demonstraram padrão de peso semelhante aos animais dos grupos DM e DM+CI que não receberam o pré- condicionamento com COQ-10.

4.1.3 Ingesta de ração e água

Tabela 4.1 – Resultados da ingestão de ração e água dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	Ingesta de ração (g)	Ingesta de água (ml)
Citrato	7	21,14 ± 1,88	26,43 ± 4,40
Tween	7	21,29 ± 3,90	23,57 ± 4,41
DM	7	36,71 ± 4,84 ^{ab}	131,43 ± 17,72 ^{ab}
DM+CI	7	39,14 ± 4,61 ^{ab}	130,71 ± 23,53 ^{ab}
DM+CI+COQ-10	7	35,00 ± 1,77 ^{ab}	147,14 ± 21,85 ^{ab}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

A ingestão de ração e água pelos animais dos grupos Citrato e Tween demonstrou valores que foram considerados referência de normalidade (Ração: Citrato: 21,14±1,88 e Tween: 21,29±3,90. Água: Citrato: 26,43±4,40 e Tween: 23,57±4,41). O grupo Citrato foi considerado como controle saudável para o modelo de DM (Ração: Citrato: 21,14±1,88. Água: Citrato: 26,43±4,40).

Conforme demonstrados na Tabela 4.1, os animais dos grupos diabéticos apresentaram aumento significativo no consumo de água e ração em 24 horas em relação ao grupo Citrato (Ração: DM: 36,71±4,84 e DM+CI: 39,14±4,61 vs Citrato: 21,14±1,88. Água: DM: 131,43±17,72 e DM+CI: 130,71±23,53 vs Citrato: 26,43±4,40; p < 0,05).

A administração de COQ-10 não alterou o perfil de ingestão de ração e água dos animais diabéticos em comparação aos animais diabéticos que não receberam o pré- condicionamento com COQ-10 (Ração: DM+CI+COQ-10: 35,00±1,77 vs DM: 36,71±4,84 e DM+CI: 39,14±4,61. Água: DM+CI+COQ-10: 147,14±21,85 vs DM: 131,43±17,72 e DM+CI: 130,71±23,53; p < 0,05).

4.1.4 Relação peso do rim/peso animal

Tabela 4.2 – Resultados do peso do rim e da relação peso do rim/peso animal dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	Peso do rim (g)	Peso rim/Peso animal
Citrato	7	1,23 ± 0,17	0,34 ± 0,05
Tween	7	1,30 ± 0,09	0,34 ± 0,03
DM	7	1,67 ± 0,24 ^{ab}	0,64 ± 0,07 ^{ab}
DM+CI	7	1,70 ± 0,15 ^{ab}	0,62 ± 0,12 ^{ab}
DM+CI+COQ-10	7	1,58 ± 0,06 ^{ab}	0,57 ± 0,06 ^{ab}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

Na avaliação do peso do rim e relação peso rim/peso animal, os animais do grupo Citrato e Tween apresentaram valores considerados de normalidade para estes parâmetros (Peso rim: Citrato: 1,23±0,17 e Tween: 1,30±0,09. Peso rim/Peso animal: Citrato: 0,34±0,05 e Tween: 0,34±0,03). O grupo Citrato foi considerado controle saudável para o modelo de DM (Peso rim: Citrato: 1,23±0,17. Peso rim/Peso animal: Citrato: 0,34±0,05).

A Tabela 4.2 demonstra que os animais com diabetes induzida por STZ apresentaram elevação significativa no peso do rim e da correlação peso rim/ peso animal quando comparados com os animais que receberam apenas o veículo da STZ (Peso do rim: DM: 1,67±0,24 e DM+CI: 1,70±0,15 vs Citrato: 1,23±0,17 e Tween: 1,30±0,09. Peso rim/Peso animal: DM: 0,64±0,07 e DM+CI: 0,62±0,12 vs Citrato: 0,34±0,05; p < 0,05).

O grupo de animais DM+CI+COQ-10 não apresentou variação significativa do peso do rim e da relação peso rim/ peso animal em comparação com os animais diabéticos que não receberam COQ-10 (Peso do rim: DM+CI+COQ-10: 1,58±0,06 vs DM: 1,67±0,024 e DM+CI: 1,70±0,15.

Peso rim/Peso animal: DM+Cl+COQ-10: $0,57 \pm 0,06$ vs DM: $0,64 \pm 0,07$ e DM+Cl: $0,62 \pm 0,12$; $p < 0,05$).

4.2 FUNÇÃO RENAL

4.2.1 Função renal global e *clearance* de inulina

Tabela 4.3 – Resultados da função renal global dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	Fluxo urinário (ml/min)	Creatinina sérica (mg/dl)	<i>Clearance</i> de inulina (ml/min/100g)
Citrato	7	0,011 ± 0,002	0,30 ± 0,05	0,90 ± 0,26
Tween	7	0,010 ± 0,002	0,30 ± 0,06	0,89 ± 0,22
DM	7	0,059 ± 0,009 ^{ab}	0,77 ± 0,18 ^{ab}	0,52 ± 0,09 ^{ab}
DM+CI	7	0,065 ± 0,008 ^{ab}	1,06 ± 0,17 ^{abc}	0,16 ± 0,05 ^{abc}
DM+CI+COQ-10	7	0,071 ± 0,017 ^{ab}	0,75 ± 0,09 ^{abd}	0,41 ± 0,06 ^{abd}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

^c p < 0,05 vs DM

^d p < 0,05 vs DM+CI

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

A Tabela 4.3 aponta os dados referentes à função renal global dos grupos experimentais. Os grupos Citrato e Tween, não diabéticos, apresentaram resultados que foram considerados como referência de normalidade para todos os parâmetros analisados. O grupo Citrato foi considerado controle para o modelo de DM e o grupo Tween, veículo da COQ-10, foi considerado controle para o tratamento com COQ-10.

Para avaliação da função global dos animais, o fluxo urinário e a creatinina sérica foram mensurados e a taxa de filtração glomerular foi estimada por meio do *clearance* de inulina.

Os animais DM e DM+CI apresentaram aumento do fluxo urinário em relação aos animais do grupo Citrato (DM: 0,059±0,009 e DM+CI: 0,065±0,008 vs Citrato: 0,011±0,002; p < 0,05).

Entre os animais DM+CI+COQ-10, não se observou variação significativa do fluxo urinário quando comparados aos animais diabéticos que não receberam o pré-condicionamento com COQ-10 (DM+CI+COQ-10: $0,071 \pm 0,017$ vs DM: $0,059 \pm 0,009$ e DM+CI: $0,065 \pm 0,008$; $p < 0,05$).

Observou-se aumento da creatinina sérica dos animais diabéticos não tratados com COQ-10 em relação aos animais saudáveis (DM: $0,77 \pm 0,18$ e DM+CI: $1,06 \pm 0,17$ vs Citrato: $0,30 \pm 0,05$ e Tween: $0,30 \pm 0,06$; $p < 0,05$). A administração do CI provocou elevação adicional da creatinina sérica dos animais DM quando comparados aos animais que não receberam o CI (DM+CI: $1,06 \pm 0,17$ vs DM: $0,77 \pm 0,18$; $p < 0,05$).

Em contrapartida, o pré-condicionamento com COQ-10 reduziu valores de creatinina sérica do grupo DM+CI+COQ-10 em relação ao grupo DM+CI (DM+CI+COQ-10: $0,75 \pm 0,09$ vs DM+CI: $1,06 \pm 0,17$; $p < 0,05$).

Quanto ao *clearance* de inulina, observou-se redução significativa desse parâmetro nos animais DM em relação aos animais considerados saudáveis (DM: $0,52 \pm 0,09$; vs Citrato: $0,90 \pm 0,26$ e Tween: $0,89 \pm 0,22$; $p < 0,05$).

Os animais DM tratados com CI manifestaram redução mais acentuada no *clearance* de inulina, quando comparados aos animais DM que não receberam CI (DM+CI: $0,16 \pm 0,05$ vs DM: $0,52 \pm 0,09$; $p < 0,05$).

O pré-condicionamento com COQ-10 atenuou a redução da função renal dos animais DM+CI+COQ-10 em comparação aos animais do grupo DM+CI (DM+CI+COQ-10: $0,41 \pm 0,06$ vs DM+CI: $0,16 \pm 0,05$; $p < 0,05$).

4.3 HEMODINÂMICA GLOBAL E RENAL

4.3.1 Hemodinâmica global e renal

Tabela 4.4 – Resultados da hemodinâmica global e renal dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	Frequência cardíaca (bpm)	Pressão arterial média (mmHg)	Fluxo sanguíneo renal (ml/min)	Resistência vascular renal (mmHg/ml/min)
Citrato	7	424,00 ± 31,59	99,46 ± 5,09	7,47 ± 1,38	13,71 ± 3,09
Tween	7	457,90 ± 57,84	105,45 ± 8,02	7,11 ± 1,65	13,91 ± 2,59
DM	7	437,57 ± 35,51	99,55 ± 7,23	4,58 ± 0,63 ^{ab}	23,71 ± 6,80 ^{ab}
DM+CI	7	382,88 ± 28,45	102,37 ± 15,22	2,84 ± 0,87 ^{abc}	37,85 ± 8,88 ^{abc}
DM+CI+COQ-10	7	463,70 ± 82,20	99,94 ± 7,52	5,01 ± 0,67 ^{abd}	20,07 ± 3,22 ^{cd}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

^c p < 0,05 vs DM

^d p < 0,05 vs DM+CI

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

A hemodinâmica foi avaliada por meio da verificação da frequência cardíaca, pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal. Os animais Citrato e Tween foram considerados saudáveis e utilizados como padrão de normalidade. O Citrato foi usado como um controle saudável para o modelo de DM e o Tween foi um controle para o tratamento com COQ-10.

Não se observou alteração na frequência cardíaca e pressão arterial média dos animais entre os diferentes grupos (Frequência cardíaca: Citrato: 424,00±31,59; Tween: 457,90±57,84; DM: 437,57±35,51; DM+CI: 382,88±28,45; DM+CI+COQ-10: 463,70±82,20. Pressão arterial média: Citrato: 99,46±5,09; Tween: 105,45±8,02; DM: 99,55±7,23; DM+CI: 102,37±15,22; DM+CI+COQ-10: 99,94±7,52).

A administração de COQ-10 aos animais do grupo DM+CI+COQ-10 não alterou a frequência cardíaca ou a pressão arterial média quando comparados aos animais diabéticos que não receberam o pré-condicionamento (Frequência cardíaca: DM+CI+COQ-10: $463,70 \pm 82,20$ vs DM: $437,57 \pm 35,51$ e DM+CI: $382,88 \pm 28,45$. Pressão arterial média: DM+CI+COQ-10: $99,94 \pm 7,52$ vs DM: $99,55 \pm 7,23$ e DM+CI: $102,37 \pm 15,22$; $p < 0,05$).

Quanto ao fluxo sanguíneo renal, observou-se redução nesse parâmetro nos animais com indução do DM em comparação com os animais saudáveis do grupo controle Citrato (DM: $4,58 \pm 0,63$ e DM+CI: $2,84 \pm 0,87$ vs Citrato: $7,47 \pm 1,38$; $p < 0,05$).

O tratamento com CI induziu redução adicional do fluxo sanguíneo renal dos animais DM em relação aos animais DM não tratados (DM+CI: $2,84 \pm 0,87$ vs DM: $4,58 \pm 0,63$; $p < 0,05$).

A administração de COQ-10 demonstrou atenuar o decréscimo do fluxo sanguíneo renal quando comparado animais que não receberam o pré-condicionamento (DM+CI+COQ-10: $5,01 \pm 0,67$ vs DM+CI: $2,84 \pm 0,87$; $p < 0,05$).

A avaliação da resistência vascular renal revelou que os animais dos grupos DM e DM+CI apresentaram elevação deste parâmetro quando comparados aos animais do grupo Citrato (DM: $23,71 \pm 6,80$ e DM+CI: $37,85 \pm 8,88$ vs Citrato: $13,71 \pm 3,09$). Adicionalmente, os animais tratados com CI apresentaram elevação mais acentuada da resistência vascular renal em relação aos animais diabéticos que não receberam CI (DM+CI: $37,85 \pm 8,88$ vs DM: $23,71 \pm 6,80$; $p < 0,05$).

O pré-condicionamento com COQ-10 induziu redução da resistência vascular renal dos animais diabéticos quando comparados aos animais diabéticos que não receberam essa suplementação (DM+CI+COQ-10: $20,07 \pm 3,22$ vs DM+CI: $37,85 \pm 8,88$; $p < 0,05$).

4.4 PERFIL OXIDATIVO

4.4.1 Dosagem de peróxidos urinários

Tabela 4.5 – Resultados da excreção de peróxidos urinários dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	Peróxidos urinários (nM/g de creatinina urinária)
Citrato	7	1,31 ± 0,83
Tween	7	1,40 ± 0,64
DM	7	6,95 ± 0,89 ^{ab}
DM+CI	7	17,31 ± 4,47 ^{abc}
DM+CI+COQ-10	7	4,09 ± 0,87 ^{cd}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

^c p < 0,05 vs DM

^d p < 0,05 vs DM+CI

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

O peróxido de hidrogênio está presente em todos fluídos corporais, especialmente na urina. A mensuração dos níveis de peróxidos urinários é considerada como biomarcador da geração de peróxido de hidrogênio e preditor da extensão de estresse oxidativo em modelos experimentais *in vivo* (75).

Na Tabela 4.5 é possível verificar que os grupos Citrato, controle saudável do modelo de DM, e Tween, controle do tratamento com COQ-10, apresentaram resultados que foram considerados referência de normalidade para este parâmetro (Citrato: 1,31±0,83 e Tween: 1,40±0,64).

Os grupos DM, DM+CI e DM+CI+COQ-10, apresentaram elevação significativa nos valores dos peróxidos urinários quando comparados ao grupo Citrato, que recebeu apenas o veículo da STZ (DM: 6,95±0,89;

DM+CI: $17,31 \pm 4,47$ e DM+CI+COQ-10: $4,09 \pm 0,87$ vs Citrato: $1,31 \pm 0,83$; $p < 0,05$).

Essa alteração foi significativamente exacerbada no grupo DM+CI em relação aos demais grupos diabéticos (DM+CI: $17,31 \pm 4,47$ vs DM: $6,95 \pm 0,89$ e DM+CI+COQ-10: $4,09 \pm 0,87$; $p < 0,05$).

Por outro lado, foi constatada redução significativa na excreção de peróxidos urinários no grupo DM+CI+COQ-10 em comparação com os animais DM+CI (DM+CI+COQ-10: $4,09 \pm 0,87$ vs DM+CI: $17,31 \pm 4,47$; $p < 0,05$).

4.4.2 Dosagem de TBARS urinário

Tabela 4.6 – Resultados da excreção de TBARS urinário dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	TBARS
		(nM/g de creatinina urinária)
Citrato	7	0,25 ± 0,14
Tween	7	0,18 ± 0,05
DM	7	12,91 ± 2,79 ^{ab}
DM+CI	7	21,97 ± 7,77 ^{abc}
DM+CI+COQ-10	7	15,74 ± 3,87 ^{abcd}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

^c p < 0,05 vs DM

^d p < 0,05 vs DM+CI

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

Um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica é o MDA, este pode ser detectado indiretamente através da dosagem de TBARS urinário, no qual o ácido tiobarbitúrico reage com várias substâncias, dentre elas o MDA ⁽⁷⁶⁾.

Conforme demonstrado na Tabela 4.6, os grupos Citrato e Tween foram considerados com valores de normalidade, sendo respectivamente, controle para o modelo de DM e para o tratamento com COQ-10 (Citrato: 0,25±0,14 e Tween: 0,18±0,05).

Os grupos diabéticos apresentaram elevação significativa de TBARS urinários quando comparados com o seu respectivo grupo controle (DM: 12,91±2,79; DM+CI: 21,97±7,77 e DM+CI+COQ10: 15,74±3,87 vs Citrato: 0,25±0,14; p < 0,05).

A administração de CI aos animais DM induziu elevação adicional dos TBARS urinários quando esse grupo foi comparado aos animais DM que não receberam CI (DM+CI: 21,97±7,77 vs DM: 12,91±2,79; p < 0,05).

O pré-condicionamento com COQ-10 induziu redução significativa na excreção dos TBARS urinários quando comparado o grupo DM+CI+COQ10 com os animais que não receberam o pré-condicionamento (DM: $12,91 \pm 2,79$ vs DM+CI+COQ10: $15,74 \pm 3,87$; $p < 0,05$).

4.4.3 Dosagem de tióis solúveis não proteicos no tecido renal

Tabela 4.7— Resultados dos tióis solúveis não proteicos no tecido renal dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	Tióis (nM/mg de proteínas totais)
Citrato	7	24,80 ± 5,60
Tween	7	20,38 ± 3,52
DM	7	14,82 ± 2,16 ^{a b}
DM+CI	7	9,28 ± 1,04 ^{a bc}
DM+CI+COQ-10	7	14,21 ± 2,12 ^{a bcd}

^a p< 0,05 vs Citrato

^b p< 0,05 vs Tween

^c p< 0,05 vs DM

^d p< 0,05 vs DM+CI

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

A glutathiona é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbicas e seu papel intracelular inclui a neutralização de EROs. Os tióis representam a quantidade da reserva protetora oxidativa endógena de glutathiona peroxidase não oxidada⁽⁷⁸⁾.

Conforme demonstrado na Tabela 4.7 os grupos Citrato (controle do modelo de DM) e Tween (controle do tratamento com COQ-10) apresentaram altos níveis de tióis no tecido renal e foram considerados como padrão de normalidade (Citrato: 24,80±5,60 e Tween: 20,38±3,52).

O consumo de tióis foi observado com a indução do DM quando comparados esses animais com aqueles que não receberam STZ para indução de DM (DM: 14,82±2,16; DM+CI: 9,28±1,04 e DM+CI+COQ-10: 14,21±2,12 vs Citrato: 24,80±5,60; p< 0,05).

O insulto renal do CI foi associado a uma redução adicional dos níveis de tióis em comparação aos animais DM que não receberam CI (DM+CI: $9,28 \pm 1,04$ vs DM: $14,82 \pm 2,16$ e DM+CI+COQ-10: $14,21 \pm 2,12$; $p < 0,05$).

A administração COQ-10 promoveu elevação dos níveis de tióis em relação aos animais que não receberam o pré-condicionamento (DM+CI+COQ-10: $14,21 \pm 2,12$ vs DM+CI: $9,28 \pm 1,04$; $p < 0,05$).

4.4.4 Dosagem de óxido nítrico urinário

Tabela 4.8 – Resultados da excreção de nitrito dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	NO
		(nM/mg de creatinina urinária)
Citrato	7	23,81 ± 6,20
Tween	7	20,44 ± 6,69
DM	7	50,14 ± 4,28 ^{a b}
DM+CI	7	96,94 ± 16,00 ^{a bc}
DM+CI+COQ-10	7	61,05 ± 4,34 ^{a bcd}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

^c p < 0,05 vs DM

^d p < 0,05 vs DM+CI

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

Foram avaliados os metabólitos do NO urinário por meio do nitrito.

Na Tabela 4.8 é possível verificar que os grupos Citrato, controle saudável para o modelo de DM, e Tween, controle saudável para o tratamento com COQ-10, apresentaram resultados que foram considerados referência de normalidade para este parâmetro (Citrato: 23,81±6,20 e Tween: 20,44±6,69).

Os grupos DM, DM+CI e DM+CI+COQ-10, apresentaram elevação significativa na excreção de nitrito quando comparados ao grupo controle do modelo de DM (DM: 50,14±4,28; DM+CI: 96,94±16,00 e DM+CI+COQ-10: 61,05±4,34 vs Citrato: 23,81±6,20 e Tween: 20,44±6,69; p < 0,05).

No grupo DM+CI, o parâmetro acima citado foi significativamente mais elevado em relação aos demais grupos diabéticos (DM+CI: 96,94±16,00 vs DM: 50,14±4,28 e DM+CI+COQ-10: 61,05±4,34; p < 0,05).

Em contrapartida, o óxido nítrico urinário no grupo DM+Cl+COQ-10 foi significativamente reduzido em comparação com os animais DM+Cl (DM+Cl+COQ-10: $61,05 \pm 4,34$ vs DM+Cl: $96,94 \pm 16,00$; $p < 0,05$).

4.5 ANÁLISE HISTOLOGICA RENAL

Tabela 4.9 – Resultados da lesão tubulointersticial dos grupos: Citrato, Tween, DM, DM+CI, DM+CI+COQ-10. São Paulo-2016.

Grupos	n	Quantificação das alterações tubulointersticiais (%)
Citrato	5	0,05 ± 0,02
Tween	5	0,08 ± 0,02
DM	5	0,27 ± 0,09 ^{ab}
DM+CI	5	0,45 ± 0,13 ^{abc}
DM+CI+COQ-10	5	0,29 ± 0,09 ^{abd}

^a p < 0,05 vs Citrato

^b p < 0,05 vs Tween

^c p < 0,05 vs DM

^d p < 0,05 vs DM+CI

Os dados apresentam médias ± desvio padrão.

A lesão tubulointersticial foi avaliada por meio de um escore de lesão de 0 a 4 de acordo com a extensão das alterações encontradas em cada campo analisado. A Tabela 4.9 apresenta o grau de lesão tubulointersticial dos diversos grupos.

Todos os grupos apresentaram discretas alterações com média de escore das áreas de lesão tubulointersticial menor que 1, demonstrando comprometimento de menos do que 5% das áreas focais teciduais.

Os grupos Citrato e Tween apresentaram valores que foram considerados característico de ausência de lesão tubulointersticial (Citrato: 0,05±0,02; Tween: 0,08 ± 0,02). Conforme já citado em seções anteriores, os veículos dos tratamentos foram utilizados como controles. o grupo Citrato foi utilizado como controle para o modelo de indução de DM enquanto o grupo Tween foi considerado controle do tratamento com COQ-10.

O grupo DM, demonstrou as alterações tubulointersticial superior ao seu grupo controle (DM: 0,27 ± 0,09 vs Citrato: 0,05±0,02; p < 0,05).

O grupo DM+CI apresentou aumento significativo da área de lesão tubulointersticial em comparação com o grupo DM (DM+CI: $0,45 \pm 0,13$ vs DM: $0,27 \pm 0,09$; $p < 0,05$).

O condicionamento com COQ-10 demonstrou reduzir a área de extensão da lesão tubulointersticial em relação aos animais DM que receberam CI (DM+CI+COQ-10: $0,29 \pm 0,09$ vs DM+CI: $0,45 \pm 0,13$; $p < 0,05$).

Figura 7. Cortes histológicos para avaliação da área tubulointersticial (aumento 400X) dos grupos: Citrato (A), Tween (B), DM (C), DM+CI (D), DM+CI+COQ-10 (E).

Fonte: Fernandes SM. O papel da coenzima Q-10 na injúria renal aguda induzida por contraste em ratos diabéticos. [dissertação]. São Paulo: EEUSP: 2016.

A Figura 7 ilustra as alterações tubulointersticiais dos grupos Citrato (A), Tween (B), DM (C), DM+CI (D), DM+CI+COQ-10 (E).

Os grupos Citrato e Tween apresentaram manutenção da integridade do tecido renal com características de normalidade.

Os grupos diabéticos apresentaram discretas alterações. No grupo DM observou-se presença de infiltrado intersticial e início de processo de hialinização de algumas células tubulares. Essas alterações foram evidenciadas de forma mais pronunciada no grupo DM+CI, neste observou-se, adicionalmente, presença de achatamento de células tubulares.

O grupo DM+CI+COQ-10 apresentou lesões da área tubulointersticial com menor comprometimento demonstrado por menor extensão de áreas com alterações como hialinização e infiltrado.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A ocorrência de DM na população mundial é alarmante e tende a um aumento considerável nos próximos anos ⁽³⁾. Doenças crônicas como o DM exigem cuidados constantes e medidas preventivas específicas para evitar o desenvolvimento de complicações associadas e outras patologias ⁽⁴⁾. Considerando que, atualmente na prática clínica, o emprego de terapêuticas invasivas, como exames diagnósticos de imagens contrastados, são imprescindíveis e que tais intervenções em indivíduos diabéticos podem levar ao desenvolvimento de NIC, a compreensão dos mecanismos envolvidos na IRA de origem nefrotóxica causada pelo CI é de grande interesse para a saúde pública e para o indivíduo diabético. Adicionalmente, elucidar a participação de terapias farmacológicas na prevenção da NIC requer o interesse e atenção da comunidade científica para implementação de medidas profiláticas que otimizem os cuidados com o paciente diabético.

Apesar dos esforços da comunidade científica, ainda não existe tratamento específico para a NIC. Postula-se o emprego de menor volume de contraste, escolha por contraste de baixa osmolaridade ou iso-osmolar, hidratação e uso de bicarbonato ou N-acetilcisteína como possíveis agentes de efeito na prevenção da NIC ^(82, 83, 84). No entanto, estudos com resultados controversos quanto a eficiência dessas intervenções e incertezas sobre o sucesso de outras terapias farmacológicas para prevenção da NIC dificultam e desestimulam a implementação e consolidação de protocolos intervencionistas precisos. Sendo assim o CI ainda é amplamente empregado em indivíduos diabéticos.

Estudos experimentais com modelo animal contribuem tanto para a compreensão de mecanismos fisiopatológicos implicados na NIC quanto para a avaliação de terapias farmacológicas com potencial preventivo para IRA por CI em grupos com comorbidades como o DM.

No presente estudo, a indução do DM-1 realizada por meio da administração da STZ, um quimioterápico que degenera as células β do pâncreas, comprometendo a produção de insulina, iniciou um quadro de hiperglicemia crônica, característico do DM ⁽⁸⁵⁾. A manutenção da hiperglicemia diabética durante o protocolo de estudo foi confirmada por meio do controle glicêmico semanal. A condição de hiperglicemia crônica consiste em uma síndrome metabólica relacionada à resistência insulínica, e está associado ao aumento do risco de desenvolvimento de complicações macrovasculares (doença da artéria coronária, aterosclerose e doença vascular periférica) e microvasculares (nefropatia, neuropatia e retinopatia) ^(7, 86, 87).

Os dados deste estudo confirmam que o modelo experimental de DM reproduziu as características clínicas desta síndrome com ocorrência de perda de peso, polifagia, poliúria e polidipsia. Esses achados podem estar relacionados com o desequilíbrio energético e alteração no mecanismo de transporte tubular de sódio e glicose no estado de hiperglicemia crônica ^(85, 59).

A perda de peso corporal, como observada neste estudo, é um dos indicadores gerais de regulação metabólica no DM e já foi demonstrada na literatura ^(88, 89). Para compensar os níveis reduzidos de glicose em função da indisponibilidade da insulina, a gluconeogênese é estimulada causando o comprometimento da composição corporal total ⁽⁸⁾.

A elevação da relação peso do rim/peso animal, conforme observada neste estudo, já foi descrita como uma característica clássica do modelo de doença renal no DM e pode estar relacionada com a hipertrofia renal ^(90, 91). A hiperglicemia crônica favorece a ocorrência de resposta inflamatória e o acúmulo de proteínas na matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e laminina que, por sua vez, estão relacionadas ao espessamento da membrana basal e expansão da matriz mesangial glomerular, que acarretam a hipertrofia ⁽⁹²⁾. A hipertrofia resultante do aumento da massa do túbulo

proximal favorece a intensa reabsorção causando hiperfiltração glomerular via hiper-reabsorção ⁽⁹³⁾.

A hiperfiltração glomerular no DM está principalmente associada a alterações hemodinâmicas com dilatação arteriolar aferente, mediada pelo aumento na produção de prostanoídes vasodilatadores e NO, e vasoconstrição da arteríola eferente, mediada por endotelina e adenosina ⁽⁷⁾. Adicionalmente, a hiperglicemia crônica estimula a síntese de citocinas envolvidas com os mecanismos de fibrose e aumento da permeabilidade glomerular a macromoléculas o que favorece a filtração da glicose. Consequentemente, ocorre estímulo para reabsorção de glicose nos túbulos proximais mediada pelos cotransportadores de Na⁺/glicose, em que a glicose excedente é eliminada e, por ser osmoticamente ativa, promove a eliminação conjunta de água. Os resultados das alterações descritas foram observados no presente estudo, no qual os animais DM apresentaram aumento no fluxo urinário, que corresponde ao quadro de poliúria relacionada à hiperglicemia diabética ^(85, 8).

As alterações morfológicas nos néfrons no DM contribuem para a toxicidade do CI e aumentam o risco de NIC ^(93, 94, 95). A fisiopatologia da NIC consiste na combinação da isquemia renal, toxicidade direta nas células tubulares renais e produção de EROs ^(96, 97).

A NIC é a terceira causa de IRA adquirida em ambiente hospitalar representando 10-13% dos casos, é uma das principais causas de morbidade, doença renal terminal, hospitalização prolongada, aumento de custos e do risco de morte ⁽²⁹⁾.

A investigação de alternativas que promovam renoproteção na presença de fatores de risco para NIC é amplamente estimulada. A indução da COQ-10 demonstra elevado potencial terapêutico para prevenção da NIC por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e eficiência no tratamento de disfunção endotelial já demonstrado em outros modelos de lesão ^(51, 60, 61, 63).

O desenvolvimento de NIC no DM foi evidenciado neste estudo com disfunções na função renal, hemodinâmica renal e a instalação de estresse oxidativo.

A elevação da creatinina sérica no grupo DM confirma o comprometimento funcional renal decorrente da doença crônica, sendo este achado, já demonstrado em modelo animal de DM induzida por STZ ⁽⁹⁸⁾.

A creatinina sérica é um parâmetro fundamental para o diagnóstico de NIC e determinação de fatores de risco, devido ao seu baixo custo e facilidade de estimacão aplicada na prática clínica ⁽³⁴⁾. Estudo com 41 pacientes diabéticos demonstrou que a indução da NIC foi caracterizada por aumento de 0,5 mg/dl da creatinina sérica em 48 horas após a infusão do contraste ⁽⁹⁹⁾.

No presente estudo, a elevação adicional de creatinina sérica após a administração de CI foi encontrada no grupo DM+CI e corrobora as alterações previstas na NIC. Estes resultados são consistentes com achados de estudos anteriores que apontam o DM como fator de risco para NIC ⁽¹⁰⁰⁾. A administração de COQ-10 aos animais DM tratados com CI impediu o aumento da creatinina sérica, demonstrando proteção contra as alterações decorrentes do CI.

A avaliação da função renal por estimativa da taxa de filtração glomerular foi abordada por meio do *clearance* inulina. A redução do *clearance* inulina nos animais DM em 50% confirmou a disfunção renal nesse modelo crônico demonstrando a ação deletéria da associação dos fatores metabólicos e hemodinâmicos envolvidos no DM. O uso do CI no DM provocou redução adicional (30%) da função renal resultando na NIC. Estes dados corroboram os achados de outros estudos que relataram redução significativa da função renal em ratos diabéticos expostos ao CI ⁽¹⁰¹⁾.

No DM, a hiperglicemia crônica está relacionada à vasoconstrição intra-renal, que compromete o FSR, e causa diminuição da taxa de filtração glomerular ⁽¹⁷⁾. A NIC no DM está associada com insuficiência renal

secundária à hipertensão glomerular que resulta no aumento do fluxo plasmático renal, hiperfiltração glomerular e hiperosmolaridade urinária ^(102, 103).

Barlak et al. (2010) demonstraram redução da taxa de filtração glomerular em animais que receberam CI, após 24 horas de restrição de água ⁽¹⁰²⁾. Do mesmo modo, está demonstrado que após a administração de CI em ratos diabéticos, ocorre redução significativa do *clearance* de creatinina ⁽¹⁰⁴⁾. Após o insulto tóxico, resultante da hiper osmolaridade do CI, que é maior que a do sangue, ocorre a liberação de substâncias vasoativas, como endotelina, adenosina e tromboxanes, iniciando-se a fase vasoconstritora da NIC, com redução no FSR e na taxa de filtração glomerular ^(39, 105).

O pré-condicionamento com COQ-10 aos animais DM tratados com CI surpreendeu positivamente quanto ao efeito renoprotetor demonstrado pela elevação do *clearance* de inulina.

Estes resultados ressaltam o importante papel da COQ-10 na modulação de processos fisiopatológicos induzidos por CI. Outros estudos sobre toxicidade renal já demonstraram a capacidade da COQ-10 em minimizar a nefrotoxicidade por ciclosporina e cisplatina, sendo esse efeito atribuído à atividade antioxidante ^(68, 106).

No presente estudo, a diminuição do FSR e elevação da RVR nos animais diabéticos confirmaram as alterações na hemodinâmica renal característica do DM, com redução do FSR decorrente do aumento da RVR.

Conforme observado neste estudo, os efeitos do CI sobre o FSR são acentuados na presença de DM. Palm e colaboradores demonstraram que a administração de contraste em ratos diabéticos induzidos por STZ provocou redução acentuada do FSR em relação a animais saudáveis ⁽¹⁰⁷⁾. Neste estudo, o uso de CI em ratos diabéticos resultou em severa vasoconstrição renal com aumento significativo da RVR.

As alterações hemodinâmicas da perfusão renal na NIC estão relacionadas principalmente a um *feedback* túbulo-glomerular pelo qual, durante a eliminação do CI pelo rim, suas moléculas são filtradas no glomérulo e não sofrem a reabsorção tubular, criando-se assim um gradiente osmótico que compromete a reabsorção de água e sódio nos túbulos renais, estimulando a diurese ⁽³⁵⁾. O aumento da pressão intra-tubular estimula o mecanismo de *feedback* tubulo-glomerular, que desencadeia vasoconstrição das arteríolas aferentes, mediada por aumento na produção intrarenal de vasoconstritores (endotelina, adenosina, vasopressina, prostaglandina 2) e diminuição de vasodilatadores (óxido nítrico e prostaglandina 1), o que resulta em diminuição da taxa de filtração glomerular e isquemia medular por aumento da RVR e consequente diminuição do FSR ^(38, 41, 17, 108).

A diminuição do FSR, como observado neste estudo, também pode ser atribuída à viscosidade e osmolaridade de meios de contraste. A manutenção da vasoconstrição com aumento da RVR contribui para a agregação dos eritrócitos, resultando na diminuição da oferta de oxigênio ao tecido renal. A hipóxia prolongada favorece ao desenvolvimento da injúria oxidativa culminando na disfunção endotelial com apoptose e morte celular. ^(44, 39, 109, 110).

Neste estudo, o tratamento com COQ-10 demonstrou melhora da hemodinâmica renal com redução do RVR e elevação do FSR. Estudos sugerem que a COQ-10 estimula a produção de prostaglandina-1 e prostaciclina que auxiliam na vasodilatação. Adicionalmente também é atribuído à COQ-10 a capacidade de reduzir a resistência periférica por meio da preservação do vasodilatador NO. A COQ-10 promove a redução do NO²⁻ à NO, auxiliando na manutenção deste agente biorregulador ⁽⁵¹⁾.

Além das alterações de função e hemodinâmica renal, o presente estudo analisou metabólitos oxidativos para avaliar a participação destes componentes na fisiopatologia da NIC tendo como fator de risco o DM, e verificar o papel da COQ-10 como um possível tratamento para esta patologia.

O oxigênio é essencial para a manutenção da homeostase do organismo, pequenas quantidades de EROs são constantemente produzidas em todas as células com metabolismo aeróbico e eliminadas por sistemas antioxidantes ⁽¹¹⁰⁾.

Neste estudo, o aumento de metabólitos oxidativos na urina do grupo submetidos a DM confirmou a produção aumentada de EROs demonstrada por elevação na excreção de peróxidos e NO urinários, com peroxidação lipídica evidenciada por níveis elevados de TBARS na urina. Adicionalmente a lesão oxidativa foi marcada no DM pela redução dos tióis no tecido renal indicativos do consumo da reserva antioxidante tiólica, a glutathione. Esses achados já foram demonstrados em outros estudos onde a hiperglicemia diabética é associada a geração de EROs e redução de parâmetros antioxidantes ^(111, 59).

Como reiterado neste estudo, a hiperglicemia crônica intensifica a participação das EROs no mecanismo de lesão do DM. O DM torna as células endoteliais incapazes de modular as taxas de transporte de glicose provocando seu acúmulo no espaço intracelular em órgãos como rins, olhos e tecidos neuronais ⁽¹¹³⁾. A glicose em excesso pode sofrer auto-oxidação e/ou promover glicação não enzimática de proteínas e lipídios de membrana formando AGEs, ou ainda pode ser metabolizada por vias diferentes da via glicolítica, como a via dos polióis e hexoaminas ^(14, 20, 114). Todos esses mecanismos na hiperglicemia estão envolvidos na indução da produção de EROs, o que torna o estresse oxidativo um componente chave na fisiopatologia do DM ⁽²⁰⁾.

O estresse oxidativo causado pelo DM é potencializado pelo efeito tóxico do CI na NIC, decorrente da vasoconstrição que promove intensa hipóxia tecidual favorecendo a formação de EROs. Em condições de hipóxia, há acúmulo de hipoxantina após o consumo do ATP celular, a hipoxantina é convertida a xantina e ácido úrico e nessa reação gera superóxido e radical hidroxila, que são EROS altamente tóxicas ^(113- 116). Estas, por sua vez, promovem a redução de enzimas catilazadoras, metais de transição,

carreadores de elétrons e podem ainda reagir com outras moléculas e componentes celulares. A reação com metais de transição como o ferro (Fe^{3+}) e cobre (Cu^{2+}) possibilita a interação destes metais reduzidos com o peróxido de hidrogênio, umas EROs não radicalar, catalisando a formação de radical hidroxila ^(117, 118). As EROs em contato com o NO podem gerar peroxinitrito, extremamente tóxico, que desencadeia a oxidação nitrosativa ^(115, 116).

A dose única de CI administrada aos animais DM no atual estudo induziu o estresse oxidativo confirmado pelo aumento na excreção de peróxidos, NO urinários e TBARS. A hipoperfusão combinada a hipóxia relacionadas ao uso de meios de contrastes aumentam a produção de EROs no rim levando ao consumo da reserva antioxidante tiólica, indicativo do consumo de glutatona.

Estudos sobre a NIC demonstram ainda que a combinação da hipóxia e lesão parenquimatosa renal tóxica são mediadas por EROs. O estresse oxidativo é um dos fatores envolvidos na patogênese da NIC que contribui para lesão tubular e vascular. A viscosidade dos CIs também colabora para ocorrência de hipóxia medular e aumento de liberação de radicais livres ^(36, 44, 119).

O aumento dos níveis de peróxidos urinários neste modelo de NIC em ratos diabéticos evidencia a elevada produção de EROs. O peróxido de hidrogênio embora seja um agente oxidante e redutor fraco, apresenta elevado potencial de penetração nas membranas biológicas e quando produzido em excesso favorece a formação do radical hidroxila, o mais reativo e mais lesivo radical conhecido ⁽⁵²⁾. É responsável por danos no DNA, nas proteínas e peroxidação lipídica, provocando edema mitocondrial, com liberação de toxinas que contribuem para a persistente hipóxia da região medular renal, evoluindo para a necrose tubular aguda ⁽⁷⁵⁾.

Foi possível evidenciar neste estudo que o pré-condicionamento com a COQ-10 exerceu efeito antioxidante renoprotetor sobre a função renal dos animais diabéticos submetidos à NIC. Apesar da sua primordial função na

produção de ATP, a ubiquinona é capaz de transferir elétrons para componentes que não participam da cadeia respiratória, por meio da oxidação do ubiquinol onde ocorre doação de hidrogênio para um radical livre, gerando uma semiquinona, forma intermediária da COQ-10. A continuação da oxidação desta forma intermediária da COQ-10 leva a formação da ubiquinona e resulta em neutralização final de dois radicais livres ^(118, 120, 121).

A COQ-10 exerce papel considerável na desativação do radical ânion superóxido, após formação na mitocôndria o mesmo é prontamente oxidado pela ubiquinona ^(118, 121). As insaturações da cadeia lateral da ubiquinona e ubiquinol também exercem função importante na desativação do oxigênio singlete, uma EROs altamente tóxica, tanto por desativação física colisional, quanto por adição às insaturações ⁽¹²¹⁾.

Adicionalmente, já foi demonstrada em outros estudos que a suplementação com COQ-10 suprime a geração de EROS por reduzir a NADPH oxidase envolvida na produção de EROs e eliminar produtos de peroxidação lipídica ⁽⁵⁶⁾.

A elevação do TBARS no estudo atual foi indicativo do efeito deletério do CI em ratos diabéticos, demonstrando que esse fármaco potencializa a peroxidação lipídica em ratos diabéticos. O MDA é um marcador de peroxidação lipídica que pode ser mensurado indiretamente pela dosagem de TBARS ⁽⁷⁶⁾.

Neste estudo o pré-condicionamento com COQ-10 reduziu os níveis de TBARS nos animais diabéticos que receberam o insulto do CI, reafirmando a capacidade anti-oxidante da COQ-10 e sua eficiência em prevenir a peroxidação lipídica.

A reação inicial que caracteriza a peroxidação lipídica é causada por ação das EROs, principalmente o radical hidroxila, que capta um átomo de hidrogênio normalmente de ácidos graxos poli-insaturados das membranas, deixando um de seus carbonos com um elétron desemparelhado. A

estabilização depende de um rearranjo molecular com formação de um carbono radicalar que reage com o oxigênio molecular e resulta no radical peroxila, que é capaz de capturar átomos de hidrogênio de moléculas de lipídios vizinhos e formar um novo carbono radicalar que sofre rearranjo e perpetua essa reação em cadeia. Paralelamente, o radical peroxila, que capturou hidrogênio, gera o lipídio hidroperóxido que decomposto resulta na formação de aldeídos como o MDA. Essa decomposição é acompanhada pela formação de outros radicais, peroxila e alcóxila. A cascata de peroxidação pode se estender para os fosfolipídeos de membrana e lipoproteínas ⁽⁵²⁾. O MDA, além de ser um produto da peroxidação lipídica, também pode reagir com grupamentos amina das bases nitrogenadas purinas do DNA, guanina, adenina e citosina e com a guanosina, formando assim os adutos que são nocivos para o parênquima renal ^(76, 120, 121).

As alterações causadas pela peroxidação lipídica resultam em mudanças nas propriedades físico-químicas das membranas, o que altera sua fluidez e permeabilidade, e pode levar a edema e ruptura das membranas de células e organelas provocando morte celular ⁽⁵²⁾.

A literatura postula que a atividade da COQ-10 é predominante e limitada ao meio lipossolúvel, devido a sua longa cadeia lateral. Esta característica de localização lhe confere grande eficiência na interrupção de reações radicalares em cadeia como a peroxidação lipídica, além disso, é considerada uma substância de grande poder antioxidante através estabilização de dois radicais livres a cada molécula de COQ-10 no seu ciclo redox e é agilmente recuperada, o que justifica sua eficiência em interromper processos de peroxidação lipídica ^(122, 123).

Embora o presente estudo não tenha tido objetivo de reverter o quadro de peroxidação lipídica que se estabelece no DM, vale ressaltar que diversos estudos comprovam que a suplementação com COQ-10 por um período mais prolongado demonstra potencial significativo sob o parâmetro mencionado.

Um estudo com ratos induzidos a DM com STZ e tratados com 5mg/Kg de COQ-10 na água de beber por quatro semanas apresentou redução de TBARs no soro ⁽¹²³⁾. Da mesma forma, um ensaio clínico em pacientes com retinopatia diabética demonstrou que a suplementação com COQ-10 por seis meses reduziu a peroxidação lipídica demonstrada por diminuição de MDA no soro ⁽⁵⁰⁾.

Na literatura não há relatos da atividade da COQ-10 sob a NIC em ratos diabéticos, portanto, cabe destacar que os achados deste estudo reforçam a interferência da COQ-10 sobre processos de lesão oxidativa também no modelo de NIC em ratos diabéticos.

Adicionalmente, nesse estudo, foi constatada redução acentuada dos níveis dos tióis nos animais diabéticos que receberam CI em relação aos animais DM. Esse dado demonstra intensa degradação do citado antioxidante endógeno na coexistência com a NIC. Este achado permite pressupor que a associação DM+CI potencializou o consumo da reserva antioxidante endógena nos animais diabéticos em decorrência da produção excessiva de EROs.

Enzimas antioxidantes como a glutathione são a primeira linha de defesa contra EROs, sua diminuição contribui para o ataque oxidante as células. Neste estudo, o pré-condicionamento dos animais diabéticos com COQ-10 demonstrou capacidade de preservar a reserva do anti-oxidante tiólica sistêmica após administração do CI, tendendo a manter a quantidade da mesma em níveis semelhantes ao grupo DM.

A glutathione é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbicas e seu papel intracelular inclui a neutralização de EROs. Na forma de GHS a glutathione é um cofator da glutathione peroxidase, sendo esta responsável por desempenhar o papel protetor contra a lesão oxidativa ⁽⁵²⁾. O selênio é um componente essencial da glutathione peroxidase e necessário para preservação da GHS. Fouad A, et al. (2010) demonstraram que a COQ-10 atenuou a perda de selênio e zinco e resultou na preservação da glutathione em modelo animal nefrotoxicidade induzida por cisplatina ⁽⁶⁰⁾.

A capacidade da COQ-10 preservar sistemas anti-oxidantes já foi demonstrada em outros estudos, onde a atividade da mesma suprimiu a necessidade de consumo elevado da reserva enzimática de catalase em insulto promovido pelo DM ⁽⁵⁹⁾.

O envolvimento das ERN na NIC também foi evidenciado neste estudo, uma vez que houve elevação na excreção de NO urinário em ratos diabéticos, enquanto que a administração de CI aos animais DM promoveu aumento na excreção de NO.

Exceto pelo papel como vasodilatador, o óxido nítrico aumenta processos inflamatórios e oxidativos. Altas concentrações de NO favorecem sua interação com a EROs superóxido e levam à síntese de peroxinitrito. O peroxinitrito possui propriedades oxidantes, sendo capaz de iniciar a peroxidação de lípidios, causar danos no DNA, em proteínas e induzir apoptose ^(56, 125, 126).

Conforme demonstrado em nosso estudo, a COQ-10 foi capaz de diminuir a excreção de NO urinário nos animais diabéticos que receberam CI. Os dados da literatura relatam que a COQ-10 pode evitar o estresse nitrosativo, pois, a forma reduzida da COQ-10 pode ainda reagir diretamente com o óxido nítrico e peroxinitrito neutralizando suas atividades oxidantes. Essa atividade também está associada a sua capacidade de suprimir as EROS ⁽¹²⁶⁾.

As mudanças histológicas encontradas nos animais diabéticos no presente estudo demonstraram alterações tubulointersticiais leves. Alterações teciduais típicas de glomeroesclerose e fibrose tubulointersticial com expansão mesangial, depósito da matriz extracelular, dano tubulointersticial e apoptose já foram descritas em ratos diabéticos e estão relacionadas ao desenvolvimento da nefropatia diabética ^(127, 85).

Neste estudo, o escore de lesão tubular após infusão de CI foi baixo, com mudanças histológicas acometendo cerca de 5% das células tubulares renais, reforçando que o mecanismo primário envolvido na redução da

função renal está relacionado principalmente às alterações hemodinâmicas renais e ao dano oxidativo que favorecem a instalação da NIC. Os achados histológicos dos animais que receberam CI apresentaram início de processo de hialinização, achatamento das células epiteliais e presença de infiltrado intersticial na arquitetura celular renal.

As alterações histológicas observadas nos animais diabéticos que receberam CI foram decorrentes da associação do insulto provocado pela hiperglicemia e NIC. A presença de alterações morfológicas na NIC são variáveis e controversas. Alguns estudos não encontraram alterações estruturais nos rins na NIC enquanto outros destacam a presença de vacuolização nas células dos túbulos proximais, embora não estabeleçam correlação direta entre estas alterações e algum grau de comprometimento funcional renal ^(96, 128). Outros estudos experimentais sobre NIC encontraram ainda alterações histológicas de necrose das células tubulares, formação de castas intratubulares e congestão luminal, acarretando redução da taxa de filtração glomerular e alteração da hemodinâmica renal ^(98,103).

Embora a extensão da área de lesão tecidual tubular tenha sido moderada em todos os grupos experimentais do presente estudo, a administração de COQ-10 por seis dias não reverteu as alterações estruturais decorrentes da condição crônica de DM, mas preveniu a progressão da área de extensão com lesão tecidual após o uso de CI.

Em modelo animal de diabetes já foi descrito que a COQ-10 não impediu a ocorrência de necrose glomerular, fibrose intersticial, vacuolização tubular moderada e espessamento da membrana basal glomerular neste modelo de doença crônica ⁽¹²⁹⁾. Enquanto em um modelo de insulto agudo provocado pelo agente nefrotóxico cisplatina, o dano de tecido renal histopatológico foi atenuado pelo pré-condicionamento com COQ-10 por seis dias ⁽⁶⁰⁾.

Sumariamente, os resultados do presente estudo confirmam as alterações renais causadas pela hiperglicemia crônica, tais como redução da função renal, redução do fluxo sanguíneo renal e aumento de resistência

vascular renal. Além dos achados bioquímicos e hemodinâmicos, a presença de estresse oxidativo foi atestada por aumento da excreção de peróxidos urinários, NO e TBARS associada ao consumo de antioxidante tiólico sistêmico.

Estes resultados reforçaram que o fator DM representa risco para a toxicidade de medicamentos, destacando-se os CIs, como foi reproduzido nesse modelo. Neste estudo, a presença de DM contribuiu para a vulnerabilidade do sistema renal à NIC, uma vez que a injúria renal foi significativamente mais severa nos animais DM que receberam o insulto do CI.

Esse estudo destacou o efeito da COQ-10 na situação de IRA mista, por DM e CI. O tratamento foi capaz de atenuar a redução da função renal, preservar a hemodinâmica renal e prevenir a lesão oxidativa e histológica decorrentes da NIC nos animais diabéticos.

Considerando que há possibilidade de se estabelecer intervenção precoce para a hiperglicemia crônica e seus efeitos na função renal, o DM configura-se como um fator de risco modificável para a nefrotoxicidade do CI. Além disso, a consolidação de uma abordagem que inclua protocolos de diagnóstico e profilaxia para pacientes de risco é crucial e deve ser estimulada, outrossim, a implementação de estratégias preventivas com intervenções farmacológicas inovadoras, como a COQ-10, pode estabelecer um cenário promissor e reverter de forma eficiente os efeitos adversos da fisiopatologia da NIC.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- a) A indução de DM reduziu a função renal dos animais, desencadeou o envolvimento de mecanismos oxidativos de lesão e induziu alterações hemodinâmicas de fluxo sanguíneo renal, resistência vascular renal com repercussão sobre a histologia renal;
- b) O uso do CI promoveu ação deletéria adicional à função renal, exacerbando o comprometimento na hemodinâmica renal e maior gravidade de lesão oxidativa, com piora dos parâmetros histológicos, caracterizando a instalação da NIC nos ratos diabéticos;
- c) O pré-condicionamento com COQ-10 promoveu renoproteção com manutenção do *clearance* de inulina dos animais diabéticos na NIC, preveniu alterações hemodinâmicas renais induzidas pelo CI e exerceu efeito antioxidante com redução na liberação de metabólitos oxidativos e preservação de reserva antioxidante endógena. A COQ-10 demonstrou efeito protetor também sobre as alterações histológicas renais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. McHugh S, Tracey ML, Riordan F, O'Neill K, Mays N, Kearney PM. Evaluating the implementation of a national clinical programme for diabetes to standardise and improve services: a realist evaluation protocol. *Implement Sci*. 2016; 11(1):107.
3. Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, Nichols G. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 87(3):293-301.
4. Franco OH, Steyerberg EW, Hu FB, Mackenbach J, Nusselder W. Associations of diabetes mellitus with total life expectancy and life expectancy with and without cardiovascular disease. *Arch Intern Med*. 2007; 167(11):1145–1151.
5. Vos T, Barber RM, Bell B, Bertozzi-Villa A, Biryukov S, Bolliger I, Charlson F, Davis A, Degenhardt L, Dicker D, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2015; 386(9995):743–800.
6. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001; 414(6865):782-7.
7. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002; 288(20):2579-88.
8. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013; 93(1):137-88.
9. Molitch ME, Steffes M, Sun W, Rutledge B, Cleary P, de Boer IH, Zinman B, Lachin J. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study Group. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1

- diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2010; 33(7):1536-43.
10. White NH. Long-term Outcomes in Youths with Diabetes Mellitus. *Pediatr Clin North Am*. 2015; 62(4):889-909.
 11. Hussein MM, Mahfouz MK. Effect of resveratrol and rosuvastatin on experimental diabetic nephropathy in rats. *Biomed Pharmacother*. 2016; 82:685-692.
 12. Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation*. 2009; 120(13):1266-86.
 13. Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern TS, King GL. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C β -null mice. *Diabetes*. 2006; 55(11):3112-20.
 14. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54(6):1615–25.
 15. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(4):537-77.
 16. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 105(2):141-50.
 17. Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. Glomerular Hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1981; 19(3):410-15.
 18. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic of complication. *N Engl J Med*. 1988; 318(20):1315-21.
 19. Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K, Yoshiga K. The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis*. 1993; 21(5):480-5.

20. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Machado JAN. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab.* [online] 2008; 52 (7):1096-1105.
21. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-22
22. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J Biomark.* 2013; 2013:378790.
23. Cosentino F, Lüscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 32 Suppl 3:S54-61.
24. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Lüscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 1997; 96(1):25-8.
25. Hamzić-Mehmedbašić A, Rašić S, Balavac M, Rebić D, Delić-Šarac M, Durak-Nalbantić A. Prognostic indicators of adverse renal outcome and death in acute kidney injury hospital survivors. *J Renal Inj Prev.* 2016; 5(2):61-8.
26. Verma A, Vyas S, Agarwal A, Abbas S, Agarwal DP, Kumar R. Diabetic Kidney Disease and Hypertension: A True Love Story. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(3):OC11-3.
27. Yang J, Lee JY, Na YJ, Lim SY, Kim MG, Jo SK, Cho W. Risk factors and Outcomes of acute renal infarction. *Kidney Res Clin Pract.* 2016; 35(2):90-5.
28. Dorman JS, Laporte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Wagener DK, Becker DJ, Cavender DE, Drash AL. The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. *Diabetes.* 1984; 33(3):271-6.
29. James MT, Grams ME, Woodward M, Elley CR, Green JA, Wheeler DC, de Jong P, Gansevoort RT, Levey AS, Warnock DG, Sarnak MJ; CKD Prognosis Consortium. A Meta-analysis of the Association of Estimated GFR, Albuminuria, Diabetes Mellitus, and Hypertension With Acute Kidney Injury. *Am J Kidney Dis.* 2015; 66(4):602-12.

30. Stacul F, van der Molen AJ, Reimer P, Webb JA, Thomsen HS, Morcos SK, Almén T, Aspelin P, Bellin MF, Clement O, Heinz-Peer G; Contrast Media Safety Committee of European Society of Urogenital Radiology (ESUR). Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines. *Eur Radiol.* 2011; 21(12):2527-41.
31. Benko A, Fraser M, Magner P, Capusten B, Barret B, Myers A, Owen RJ; Canadian Association of Radiologists. Canadian Association of Radiologists: consensus guidelines for the prevention of contrast-induced nephropathy. *Can J Assoc Radiol.* 2011; 58(2): 79-87.
32. Pisani A, Riccio E, Andreucci M, Faga T, Ashour M, Di Nuzzi A, Mancini A, Sabbatini M. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:868321.
33. Feldkamp T, Kribben A. Contrast media induced nephropathy: definition, incidence, outcome, pathophysiology, risk factors and prevention. *Minerva Med.* 2008; 99(2):177-96.
34. Jorgensen AL. Contrast-induced nephropathy: pathophysiology and preventive strategies. *Crit Care Nurse.* 2013; 33(1):37-46.
35. Pintassilgo Santos A, Mascarenhas Gaivão A, Tavares A, Ferreira S. Iodinated contrast agents. *Acta Med Port.* 2009; 22(3):261-74.
36. Seeliger E, Sendeski M, Rihal CS and Persson PB: Contrast-induced kidney injury: mechanisms, risk factors, and prevention. *Eur Heart J.* 2012; 33(16): 2007-15.
37. Andreucci M, Faga T, Pisani A, Sabbatini M, Russo D, Michael A. Prevention of contrast-induced nephropathy through a knowledge of its pathogenesis and risk factors. *Scientific World Journal.* 2014; 2014:823169.
38. McCullough PA, Soman SS. Contrast-induced nephropathy. *Crit Care Clin.* 2005; 21(2):261-80.
39. Wong PC, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Int J Cardiol.* 2012; 158(2):186-92.

40. Deng J, Wu G, Yang C, Li Y, Jing Q, Han Y. Rosuvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of nitric oxide, inflammatory responses, oxidative stress and apoptosis in diabetic male rats. *J Transl Med.* 2015; 13:53.
41. Russo D, Minutolo R, Cianciaruso B, Memoli B, Conte G, De Nicola L. Early effects of contrast media on renal hemodynamics and tubular function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6(5):1451-8.
42. Nazıroğlu M, Yoldaş N, Uzgur EN, Kayan M. Role of contrast media on oxidative stress, Ca(2+) signaling and apoptosis in kidney. *J Membr Biol.* 2013; 246(2):91-100.
43. Barrett BJ, Carlisle EJ. Metaanalysis of the relative nephrotoxicity of high- and low-osmolality iodinated contrast media. *Radiology.* 1993; 188(1):171-8.
44. McCullough PA, Bertrand ME, Brinker JA, Stacul F. A meta-analysis of the renal safety of isosmolar iodixanol compared with low-osmolar contrast media. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(4):692-9.
45. Davidson C, Stacul F, McCullough PA, Tumlin J, Adam A, Lameire N, Becker CR; CIN Consensus Working Panel. Contrast medium use. *Am J Cardiol.* 2006; 98(6A):42K-58K.
46. Nikolsky E, Mehran R, Turcot D, Aymong ED, Mintz GS, Lasic Z, Lansky AJ, Tsounias E, Moses JW, Stone GW, Leon MB, Dangas GD. Impact of chronic kidney disease on prognosis of patients with diabetes mellitus treated with percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2004; 94(3):300-5.
47. Forsgren M, Attersand A, Lake S, Grünler J, Swiezewska E, Dallner G, Climent I. Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem J.* 2004; 382(Pt 2):519-26.
48. Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, Dimauro S, Hirano M. A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet.* 2006; 78(2):345-9.

49. Oleck S, Ventura HO. Coenzyme Q10 and Utility in Heart Failure: Just Another Supplement? *Curr Heart Fail Rep*. 2016; 13(4):190-5.
50. Rodríguez-Carrizalez AD, Castellanos-González JA, Martínez-Romero EC, Miller-Arrevillaga G, Pacheco-Moisés FP, Román-Pintos LM, Miranda-Díaz AG. The effect of ubiquinone and combined antioxidant therapy on oxidative stress markers in non-proliferative diabetic retinopathy: A phase IIa, randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Redox Rep*. 2016; 21(4):155-63.
51. Yang YK, Wang LP, Chen L, Yao XP, Yang KQ, Gao LG, Zhou XL. Coenzyme Q10 treatment of cardiovascular disorders of ageing including heart failure, hypertension and endothelial dysfunction. *Clin Chim Acta*. 2015; 450:83-9.
52. Vasconcelos SML, Goulart MO, Moura JBF, Benfato VMMS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2002; 30 (5): 1323-1338.
53. Nordman T, Xia L, Björkhem-Bergman L, Damdimopoulos A, Nalvarte I, Arnér ES, Spyrou G, Eriksson LC, Björnstedt M, Olsson JM. Regeneration of the antioxidant ubiquinol by lipoamide dehydrogenase, thioredoxin reductase and glutathione reductase. *Biofactors*. 2003; 18(1-4):45-50.
54. Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*. 2007; 7 Suppl:S41-50.
55. Sattarinezhad E, Shafaroodi H, Sheikhnouri K, Mousavi Z, Moezi L. The effects of coenzyme Q10 on seizures in mice: the involvement of nitric oxide. *Epilepsy Behav*. 2014; 37:36-42.
56. Sohet FM, Neyrinck AM, Pachikian BD, de Backer FC, Bindels LB, Niklowitz P, Menke T, Cani PD, Delzenne NM. Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. *Biochem Pharmacol*. 2009; 78(11):1391-400.

57. Abdollahzad H, Aghdashi MA, Asghari Jafarabadi M, Alipour B. Effects of Coenzyme Q10 Supplementation on Inflammatory Cytokines (TNF- α , IL-6) and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis Patients: A Randomized Controlled Trial. *Arch Med Res*. 2015; 46(7):527-33.
58. Schmelzer C, Lindner I, Rimbach G, Niklowitz P, Menke T, Döring F. Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression. *Biofactors*. 2008; 32(1-4):179-83.
59. Modi K, Santani DD, Goyal RK, Bhatt PA. Effect of coenzyme Q10 on catalase activity and other antioxidant parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res*. 2006; 109(1):25-34.
60. Fouad AA, Al-Sultan AI, Refaie SM, Yacoubi MT. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. *Toxicology*. 2010; 274(1-3):49-56.
61. Murad LB, Guimarães MR, Vianna LM. Effects of decylubiquinone (coenzyme Q10 analog) supplementation on SHRSP. *Biofactors*. 2007; 30(1):13-8.
62. Wang H, Zhao X, Yin S. [Effects of coenzyme Q10 or combined with micronutrients on antioxidant defense system in rats]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2008; 37(3):311-3.
63. Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF. Coenzyme Q10 improves endothelial dysfunction in statin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2009; 32(5):810-2.
64. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Resolução normativa nº 12 de 20 setembro de 2013. Institui a diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos. *Diário Oficial da União, Brasília*, 25 set 2013. Seção 1: 52-9.
65. Brasil. Resolução normativa nº 13 de 20 setembro de 2013. Institui a diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. *Diário Oficial da União, Brasília*, 26 set 2013. Seção 1.

66. Silva M, Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML. Efeito da Estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamster. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011; 55(1):46-53.
67. Morsy MA, Ibrahim SA, Amin EF, Kamel MY, Abdelwahab SA, Hassan MK. Carvedilol ameliorates early diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:105214.
68. Fatima S, Al-Mohaimeed N, Arjumand S, Banu N, Al-Jameil N, Al-Shaikh Y. Effect of pre- and post-combined multidoses of epigallocatechin gallate and coenzyme Q10 on cisplatin-induced oxidative stress in rat kidney. *J Biochem Mol Toxicol.* 2015; 29(2):91-7.
69. 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.
70. Whiter P., Samson F. E. Determination of inulin in plasm and urine by use of antrone. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1954; 43(3):45–48.
71. Luchi WM, Shimizu MH, Canale D, Gois PH, de Bragança AC, Volpini RA, Girardi AC, Seguro AC. Vitamin D deficiency is a potential risk factor for contrast-induced nephropathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; 309(3):R215-22.
72. Owen JA, Iggo B, Scandrett FJ, Stewar CP t. The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine; a critical examination. *Biochem J.* 1954; 58(3): 426–437.
73. Deiana L, Carru C, Pes G, Tadolini B. Spectrophotometric measurement of hydroperoxides at increased sensitivity by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. *Free Radic Res.* 1999; 31(3):237-44.
74. Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydrogen peroxide assay with the ferric - xylenol orange complex. *Anal Biochem.* 1999; 273(2):149-55.

75. 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.
76. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*. 2001; 37(3):293-303.
77. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signally and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64(5-6): 1057-64.
78. Akerboom TPM, Sies H. Assay glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 1981; 77: 373-82.
79. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126(1): 131-8.
80. Ptilovanciv EO, Fernandes GS, Teixeira LC, Reis LA, Pessoa EA, Convento MB, Simões MJ, Albertoni GA, Schor N, Borges FT. Heme oxygenase 1 improves glucoses metabolism and kidney histological alterations in diabetic rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2013; 5(1):3.
81. 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
82. Bianco RPR, Araújo ES. Nefroproteção relacionada ao uso de meio de contraste iodado: atenção de enfermagem. *Acta Paul Enferm*. 2008; 21(número especial): 187-91.
83. Santos RO, Malvar B, Silva R, Ramalho V, Pessegueiro P, Amoedo M, Aniceto J, Pieres C. Nefropatia de contraste. *Acta Med Port*. 2011; 24(5) 809-820.
84. Gao Z, Han Y, Hu Y, Wu X, Wang Y, Zhang X, Fu J, Zou X, Zhang J, Chen X, Jose PA, Lu X, Zeng C. Targeting HO-1 by Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Contrast-Induced Renal Injury via Anti-Oxidative Stress and Anti-Inflammation Pathways. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0149032.
85. Sun H, Ge N, Shao M, Cheng X, Li Y, Li S, Shen J. Lumbrokinase attenuates diabetic nephropathy through regulating extracellular matrix

- degradation in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013; 100(1):85-95.
- 86.Chen HM, Shen WW, Ge YC, Zhang YD, Xie HL, Liu ZH. The relationship between obesity and diabetic nephropathy in China. *BMC Nephrol.* 2013; 14:69.
 - 87.Howangyin KY, Silvestre JS. Diabetes mellitus and ischemic diseases: molecular mechanisms of vascular repair dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34(6):1126-35.
 - 88.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; 2012:542042.
 - 89.Ahmad J. Management of diabetic nephropathy: recent progress and future perspective. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2015; 9(4):343–58.
 - 90.Kurdián M, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Gimenez-Bonafe P, Coria V, Grande MT, Boggia J, Malacrida L, Torras J, Arévalo MA, González-Martínez F, López-Novoa JM, Grinyó J, Noboa O. Delayed mTOR inhibition with low dose of everolimus reduces TGF β expression, attenuates proteinuria and renal damage in the renal mass reduction model. *PLoS One.* 2012; 7(3):e32516.
 - 91.Toprak O, Cirit M, Yesil M, Bayata S, Tanrisev M, Varol U, Ersoy R, Esi E. Impact of diabetic and pre-diabetic state on development of contrast-induced nephropathy in patients with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2007; 22(3):819–26.
 - 92.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.
 - 93.Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S, Khamaisi M. Why is diabetes mellitus a risk factor for contrast-induced nephropathy? *Biomed Res Int.* 2013; 2013:123589. 93
 - 94.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.

95. Berg KJ. Nephroltoxicity related to contrast media. *Scand J Urol Nephrol*. 2000; 34(5):317–22.
96. Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3(1):288-96.
97. Taşkıran E, Erbaş O, Yiğittürk G, Meral A, Akar H, Taşkıran D. Exogenously administered adenosine attenuates renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren Fail*. 2016: 1-7.
98. 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.
99. Dangas G, Iakovou I, Nikolsky E, Aymong ED, Mintz GS, Kipshidze NN, Lansky AJ, Moussa I, Stone GW, Moses JW, Leon MB, Mehran R. Contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions in relation to chronic kidney disease and hemodynamic variables. *Am J Cardiol*. 2005; 95(1):13-9.
100. Fonseca CD, Watanabe M, Mendonca MH, Fernandes SM, Vattimo MFF. Heme oxigenasse-1 as a potetial antioxidante agente for contrast induced nephropathy in diabetic rats. *Nephrol Dial Transpl*. 2014; 29(supplement 3):i63–i64.
101. Deedwania P, Kosiborod M, Barrett E, Ceriello A, Isley W, Mazzone T, Raskin P; American Heart Association Diabetes Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Hyperglycemia and acute coronary syndrome: a scientific statement from the American Heart association Diabetes Committee of the Council of Nutrition. *Circulation*. 2008; 117(12):1610–9.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
 105. Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 68(1): 14-22.
 106. Sato T, Ishikawa A, Homma Y. Effect of reduced form of coenzyme Q10 on cyclosporine nephrotoxicity. *Exp Clin Transplant.* 2013; 11(1):17-20.
 107. Palm F, Carlsson PO, Fasching A, Hellberg O, Nygren A, Hansell P, Liss P. Effects of the contrast medium iopromide on renal hemodynamics and oxygen tension in the diabetic rat kidney. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 530:653-9.
 108. Heyman SN, Reichman J, Brezis M. Pathophysiology of radiocontrast nephropathy: a role for medullary hypoxia. *Invest Radiol.* 1999; 34(11):685–91.
 109. Ridzuan N, John CM, Sandrasaigaran P, Maqbool M, Liew LC, Lim J, Ramasamy R. Preliminary study on overproduction of reactive oxygen species by neutrophils in diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2016; 7(13):271-8.
 110. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991; 40(4):405-12.
 111. Rodríguez LD, Cstelao AM, Górriz JL, Alvaro F, González JFNG. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. *World Journal of Diabetes.* 2012; 3(1):7-18.
 112. Ridzuan N, John CM, Sandrasaigaran P, Maqbool M, Liew LC, Lim J, Ramasamy R. Preliminary study on overproduction of reactive oxygen species by neutrophils in diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2016; 7(13):271-8.
 113. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011; 121 (11):4210-21.

114. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med.* 2000; 109(8):665-78.
115. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(11): 1287-312.
116. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015; 6:524-51.
117. 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.
118. Nohl H, Kozlov AV, Staniek K, Gille L. The multiple functions of coenzyme Q. *Bioorg Chem.* 2001; 29(1):1-13.
119. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486(1):10-3.
120. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011; 283(2-3): 65-87.
121. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova [online].* 2006; 29(1):113-123.
122. Sawicka E, Długosz A, Rembacz KP, Guzik A. The effects of coenzyme Q10 and baicalin in cisplatin-induced lipid peroxidation and nitrosative stress. *Acta Pol Pharm.* 2013; 70(6):977-85.
123. Prangthip P, Kettawan A, Okuno M, Okamoto T. An improve of oxidative stress in rats by ubiquinone-10 and ubiquino- bioavailability after short- and long term coenzyme Q10 supplementation. 2016; 13(6):647-659.
124. Tsai KL, Huang YH, Kao CL, Yang DM, Lee HC, Chou HY, Chen YC, Chiou GY, Chen LH, Yang YP, Chiu TH, Tsai CS, Ou HC, Chiou SH. A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(5):458-68.

125. Lee J, Hong YS, Jeong JH, Yang EJ, Jhun JY, Park MK, Jung YO, Min JK, Kim HY, Park SH, Cho ML. Coenzyme Q10 ameliorates pain and cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis by regulating nitric oxide and inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2013; 8(7):e69362.
126. Tsuneki H, Sekizaki N, Suzuki T, Kobayashi S, Wada T, Okamoto T, Kimura I, Sasaoka T. Coenzyme Q10 prevents high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2007; 566(1-3):1-10.
127. 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.
128. Barrett BJ. Contrast nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 1994; 5(2):125-37.
129. Maheshwari RA, Balaraman R, Sen AK, Seth AK. Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats. *Indian J Pharmacol*. 2014; 46(6):627-32.

.

ANEXOS

ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **055/15** intitulado: **“O papel da coenzima q10 na injúria renal aguda induzida por contraste iodado em ratos diabéticos”** que utilizará **90** animais da espécie **rato**, apresentado pela Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Maria de Fátima Fernandes Vattimo
Pesquisador (a) Executante: Sheila Marques Fernandes

CEUA-FMUSP, 25 de Março de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais