



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ERIKA GONDIM GURGEL RAMALHO LIMA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS RENAIIS CAUSADOS PELOS  
CONTRASTES DE ALTA OSMOLALIDADE, BAIXA OSMOLALIDADE E  
ISOSMOLAR: PAPEL DO KIM-1 COMO DETECTOR PRECOCE DE INJÚRIA  
RENAL**

**FORTALEZA**

**2016**

**ERIKA GONDIM GURGEL RAMALHO LIMA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS RENAIIS CAUSADOS PELOS  
CONTRASTES DE ALTA OSMOLALIDADE, BAIXA OSMOLALIDADE E  
ISOSMOLAR: PAPEL DO KIM-1 COMO DETECTOR PRECOCE DE INJÚRIA  
RENAL**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L697a

Lima, Erika Gondim Gurgel Ramalho.

Análise comparativa dos efeitos renais causados pelos contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar : papel do KIM-1 como detector precoce de injúria renal / Erika Gondim Gurgel Ramalho Lima. – Fortaleza, 2016.

85 f. : il. color.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. Meios de contraste. 2. Lesão renal aguda. 3. Biomarcadores farmacológicos. I. Título.

CDD – 616.61

---

**ERIKA GONDIM GURGEL RAMALHO LIMA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS RENAIIS CAUSADOS PELOS  
CONTRASTES DE ALTA OSMOLALIDADE, BAIXA OSMOLALIDADE E  
ISOSMOLAR: PAPEL DO KIM-1 COMO DETECTOR PRECOCE DE INJÚRIA  
RENAL**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A DEUS, pela força nos  
momentos mais difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus filhos, Luana, Fabrizio e Felipe, que sempre compreenderam e apoiaram meus momentos de ausência;

Ao meu esposo Flávio, pelo seu apoio e fidelidade;

Aos meus pais, Tereza e Eduardo, por um amor indescritível;

Aos meus irmãos, Duda e Ivo, por poder sempre contar com eles;

À minha avó Dindinha (*in memorian*), amor eterno;

Ao meu grande amigo Eriertônio Façanha Barreto, por sua amizade verdadeira;

Ao meu chefe e amigo Renan Montenegro Junior, pelo seu total apoio e confiança;

Ao meu chefe e professor Marcellus Souza, pelo seu apoio e pelos ensinamentos;

Às minhas amigas da UNIMED Viviane Noronha, Renata, Nádia, Sônia, Larissa, Viviane Bandeira e Samara, que me compreenderam e ajudaram;

Às minhas eternas mestres Ana Ruth Macedo, Vilani Guedes e Lucia de Fátima, por terem sido exemplos formadores da minha vida profissional;

Às minhas amigas Adriana Rats, Rita Paiva, Tanila, Ocilia, Livia Batista, Synara e Ozilene Batista, pela amizade e apoio que sempre me proporcionaram durante esta minha caminhada;

Aos que fazem a Gerência de Ensino e Pesquisa dos Hospitais Universitários da UFC Fernanda, Andréa, Dalila, Stela, Rosângela, Vanessa, Samila, Marcos, Felipe, Flavio, Sheila, Graça, Andrezza, Roseli, Aliciane, Livia, Aurea, Arleudo, pela compreensão e ajuda;

A Thisciane Pinto, sem palavras para agradecê-la, amo muito;

A Virginia Fernandes, por sua amizade e disponibilidade;

Ao nosso estatístico, Antonio Brazil, sempre disponível e preciso em suas análises;

Aos colegas de laboratório Ramom, Tiago e Gdayllon, pelo empenho e paciência na realização dos experimentos;

Ao Laboratório ARGUS, em especial aos patologistas Cleto Nogueira e André Teixeira, pela disponibilidade e pelo excelente trabalho realizado nas análises histológicas;

À professora Dra. Alice Maria Costa Martins, por ter confiado em mim e me aceitado como orientanda, mostrando-se sempre disponível e proporcionando orientações valiosas;

À banca examinadora, pelo aceite do convite;

A todos os professores que tive durante o doutorado, que participaram da construção dos meus conhecimentos com dedicação e competência;

A todos, o meu muito obrigada.

## RESUMO

Os meios de contraste iodados são utilizados há mais de 60 anos, sendo imprescindíveis na prática médica. Dentre as complicações decorrentes da utilização dos contrastes, destaca-se a nefropatia induzida por contraste (NIC), que representa a terceira causa mais comum de insuficiência renal adquirida e está associada com altas mortalidade e morbidade. O objetivo do estudo foi comparar os efeitos renais dos contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar; verificar a participação do KIM-1 como preditor precoce da NIC; e avaliar o efeito dos meios de contraste em células tubulares renais LLC-MK2. Os experimentos foram realizados em ratos Wistar, com três tipos de contraste, em duas dosagens e em tempos de 24, 48 e 72 horas. Em seguida, foram realizadas análises bioquímicas de biomarcadores clássicos e do KIM-1 urinário, e análises histológicas. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o protocolo número 33/2015. No estudo *in vitro*, foram utilizadas as células renais LLC-MK2 para avaliação do tipo de morte induzida, por meio de citometria de fluxo. Avaliando os grupos tratados com contrastes de três osmolalidades diferentes, foram observados aumento significativo dos níveis de creatinina plasmática e redução da taxa de filtração glomerular no grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade. Também foi encontrado aumento na expressão de KIM-1 urinário e da albuminúria nos grupos de alta osmolalidade e isosmolar. Na análise de duas dosagens com o contraste de alta osmolalidade, apenas a maior dosagem apresentou alteração de biomarcadores. Na análise dos tempos e do contraste de alta osmolalidade, os biomarcadores clássicos alteraram a partir de 48 horas e, na análise do KIM-1, já foi identificada expressão urinária a partir do tempo de 24 horas. Nos ensaios *in vitro* em células renais, foi evidenciada apoptose com os contrastes analisados. A histologia mostrou alteração tubular moderada, no grupo de 48 horas, e, nos demais grupos, alterações leves. Em conclusão, sugere-se que o contraste de alta osmolalidade é mais nefrotóxico que os contrastes de baixa osmolalidade e isosmolar. A redução da dose sugere uma maior segurança, e o KIM-1 mostrou uma superioridade em relação aos biomarcadores clássicos no diagnóstico precoce da NIC.

**Palavras-chave:** Meios de contraste. Lesão renal aguda. Biomarcadores farmacológicos.

## ABSTRACT

### COMPARATIVE ANALYSIS OF RENAL EFFECTS CAUSED BY HIGH-OSMOLAR, LOW-OSMOLAR AND ISO-OSMOLAR CONTRAST MEDIA: THE ROLE OF KIM-1 AS AN EARLY DETECTOR OF RENAL INJURY

Iodinated contrast media have been used in the last 60 years and are indispensable in medical practice. Among the complications arising from the use of contrast media, is contrast-induced nephropathy (CIN), which is the third most common cause of acquired renal failure and is associated with high mortality and morbidity. The aim of the study was to compare the renal effects of high-osmolar, low-osmolar and iso-osmolar contrast media; to verify the role of KIM-1 as an early predictor of CIN; and evaluate the effect of contrast media on LLC-MK2 renal tubular cells. The experiments were performed in Wistar rats, with three types of contrast, at two doses and times of 24, 48 and 72 hours. Then, biochemical analyses of classical biomarkers and urinary KIM-1 were carried out, in addition to histological analysis. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Research (CEPA) of the Federal University of Ceará (UFC), under protocol number 33/2015. In the *in vitro* study, LLC-MK2 renal tubular cells were used for evaluation of type of induced cell death by means of flow cytometry. When evaluating the groups treated with three different osmolar contrasts, a significant increase in plasma creatinine levels and reduction in glomerular filtration rate in the group receiving high-osmolar contrast were observed. Increased urinary KIM-1 expression and albuminuria were also found in the high-osmolar and iso-osmolar contrast groups. In the analysis of two doses with high-osmolar contrast, only the higher dose showed biomarker changes. In the analysis of times and high-osmolar contrast, classical biomarkers changed after 48 hours and, in the analysis of KIM-1, urinary expression was already identified at 24 hours. Apoptosis was detected in the analyzed contrast during *in vitro* assays in renal cells. Histological analysis showed moderate tubular change in the 48-hour group, with slight modifications in the other groups. In conclusion, we suggest that the high-osmolar contrast is more nephrotoxic than low-osmolar and iso-osmolar contrast media. Dose reduction suggests greater safety and KIM-1 showed superiority compared to classic biomarkers for early diagnosis of CIN.

**Keywords:** Contrast Media. Acute Kidney Injury. Biomarkers, Pharmacological analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura dos meios de contraste iodados	17
<b>Figura 2</b>	Mecanismos de morte celular	23
<b>Figura 3</b>	Esquema das vias de apoptose	25
<b>Figura 4</b>	Modelo esquemático da molécula de KIM-1	27
<b>Figura 5</b>	Estrutura química do fluorocromo catiônico rodamina 123	38
<b>Figura 6</b>	Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente rodamina 123 (Rho123) e sua respectiva ligação à membrana mitocondrial funcional	38
<b>Figura 7</b>	Princípio do ensaio de oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), pelo peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) à 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi fluorescente)	40
<b>Figura 8</b>	Prancha representativa da fotomicrografia dos rins dos animais do grupo controle, tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), iobitridol (baixa osmolalidade) e iodixanol (isosmolar), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas	46
<b>Figura 9</b>	Prancha representativa da fotomicrografia dos rins dos animais do grupo controle, tratados com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas dosagens de 5 mL/kg e 2,5 mL/kg, no tempo de 72 horas	52
<b>Figura 10</b>	Prancha representativa da fotomicrografia dos rins dos animais do grupo controle, tratados com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dosagem de 5 mL/kg e tempos de 24, 48 e 72 horas	58
<b>Figura 11</b>	<i>Dot plot</i> das citometrias com células tubulares renais LLC- MK2	60
<b>Figura 12</b>	Histograma representativo da formação de espécies reativas de oxigênio pela técnica de diacetato de diclorofluoresceína	63

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Creatinina sérica (mg/dL) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas	41
<b>Gráfico 2</b>	<i>Clearance</i> de creatinina (mL/min) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo 72 horas	42
<b>Gráfico 3</b>	Albuminúria (mg/24 horas) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas	43
<b>Gráfico 4</b>	Expressão de KIM-1 urinário no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5mL/kg e tempo de 72 horas	45
<b>Gráfico 5</b>	Creatinina sérica (mg/dL) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5), no tempo de 72 horas	47
<b>Gráfico 6</b>	<i>Clearance</i> de creatinina (mL/min) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5), no tempo de 72 horas	48
<b>Gráfico 7</b>	Albuminúria (mg/24horas) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5) no tempo de 72 horas	49
<b>Gráfico 8</b>	Expressão de KIM-1 urinário no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5) no tempo de 72 horas	51
<b>Gráfico 9</b>	Creatinina sérica (mg/dL) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)	53
<b>Gráfico 10</b>	<i>Clearance</i> de creatinina (mL/min) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)	54

<b>Gráfico 11</b>	Albuminúria (mg/24 horas) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)	55
<b>Gráfico 12</b>	Expressão de KIM-1 urinário no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)	57
<b>Gráfico 13</b>	Análise do tipo de morte celular induzida pelos contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar em cultura de células LLC-MK2 na concentração de 15 mgI/mL, por 24 horas	59
<b>Gráfico 14</b>	Produção de espécies reativas de oxigênio em cultura de células tratadas com contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), iobitridol (baixa osmolalidade) e iodixanol (isosmolar), na dose de 15 mgI/mL	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Comparação das propriedades físicas dos contrastes iodados	18
<b>Tabela 2</b>	Proteinúria (mg/24 horas), fração de excreção de sódio (FE-Na <sup>+</sup> ), fração de excreção de potássio (FE-K <sup>+</sup> ) e fração de excreção de cloreto (FE-Cl <sup>-</sup> ) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas	44
<b>Tabela 3</b>	Proteinúria (mg/24horas), fração de excreção de sódio (FE-Na <sup>+</sup> ), fração de excreção de potássio (FE-K <sup>+</sup> ) e fração de excreção de cloreto (FE-Cl <sup>-</sup> ) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5) no tempo de 72 horas	50
<b>Tabela 4</b>	Proteinúria (mg/24 horas), fração de excreção de sódio (FE-Na <sup>+</sup> ), fração de excreção de potássio (FE-K <sup>+</sup> ) e fração de excreção de cloreto (FE-Cl <sup>-</sup> ) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)	56
<b>Tabela 5</b>	Efeito dos contrastes sobre o potencial de membrana mitocondrial em cultura de células tratadas com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), iobitridol (baixa osmolalidade) e iodixanol (isosmolar), na dose de 15 mgI/mL	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b>	<i>7-aminoactinomicin D</i>
<b>AKIN</b>	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
<b>Cl<sup>-</sup></b>	íons cloreto
<b>CT</b>	grupo controle
<b>DCFH</b>	2',7'-diclorofluoresceína
<b>DCFH-DA</b>	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
<b>DCFoxi</b>	2',7'-diclorofluoresceína oxidada
<b>DM</b>	diabetes mellitus
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>FL2</b>	filtro de fluorescência vermelha
<b>IL-18</b>	interleucina 18
<b>IRC</b>	insuficiência renal crônica
<b>IV</b>	via intravenosa
<b>K<sup>+</sup></b>	íons potássio
<b>KDIGO</b>	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
<b>KIM-1</b>	molécula de injúria renal 1
<b>LRA</b>	lesão renal aguda
<b>Na<sup>+</sup></b>	íons sódio
<b>NGAL</b>	lipocaína associada à gelatinase neutrofílica
<b>NIC</b>	nefropatia induzida por contraste
<b>PBS</b>	solução tampão de fosfato
<b>PE</b>	ficoeritrina
<b>RIFLE</b>	<i>Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Kidney Disease</i>
<b>Rho123</b>	rodamina 123
<b>SBF</b>	soro bovino fetal
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>TFG</b>	taxa de filtração glomerular
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>UTI</b>	unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Meio de Contraste Iodado	16
1.2	Classificação dos Contrastes	16
1.2.1	<i>Contrastes de alta osmolalidade</i>	18
1.2.2	<i>Contrastes de baixa osmolalidade</i>	18
1.3	Farmacologia dos meios de contraste	19
1.3.1	<i>Farmacocinética</i>	20
1.3.3	<i>Farmacodinâmica</i>	20
1.4	Nefropatia Induzida por Contraste	21
1.5	Morte Celular	23
1.5.1	<i>Necrose celular</i>	24
1.5.2	<i>Apoptose Celular</i>	25
1.6	Biomarcadores Renais	27
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1	Animais de Experimentação	33
4.2	Aspectos Éticos	33
4.3	Ensaio in Vivo	33
4.3.1	<i>Grupos experimentais</i>	33
4.3.2	<i>Protocolo experimental</i>	34
4.3.3	<i>Mensuração de parâmetros bioquímicos</i>	35
4.3.4	<i>Determinação do biomarcador KIM-1</i>	35
4.3.5	<i>Análise histológica</i>	36
4.4	Ensaio in Vitro	36
4.4.1	<i>Obtenção, cultivo e manutenção das células tubulares renais</i>	36
4.4.2	<i>Avaliação do tipo de morte celular</i>	37
4.4.2.1	<i>Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo</i>	37
4.4.2.1.1	<i>Protocolo experimental</i>	38

4.4.3	<i>Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial</i> .....	39
4.4.3.1	<i>Protocolo experimental</i> .....	40
4.4.4	<i>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas</i> .....	40
4.5	<b>Análise Estatística</b> .....	42
5	<b>RESULTADOS</b> .....	43
5.1	<b>Análise dos Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados com Contrastos Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas</b> .....	43
5.2	<b>Mensuração da Expressão de KIM-1 Urinário nos Animais Tratados com Contrastos Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas</b> .....	46
5.3	<b>Análise Histológica dos Rins dos Animais Tratados com Contrastos Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas</b> .....	47
5.4	<b>Análise Comparativa dos Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados com Contraste Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) nas Doses de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 horas</b> .....	48
5.5	<b>Análise Comparativa da Expressão de KIM-1 Urinário nos Animais Tratados com Contrastos Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) nas Doses de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas</b> .....	52
5.6	<b>Análise Comparativa das Alterações Histológicas dos Rins dos Animais Tratados com contrastos Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) nas Doses de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas</b> .....	53
5.7	<b>Análise Comparativa dos Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados com Contraste Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) na Dose de 5 mL/kg e Tempos de 24, 48 e 72 Horas Mantidos em Gaiola Metabólica</b> .....	54
5.8	<b>Análise Comparativa da Expressão de KIM-1 Urinário nos Animais Tratados com Contrastos Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) Na Dose de 5 MI/Kg e Tempos de 24, 48 e 72 Horas Mantidos em Gaiola Metabólica</b> .....	58

<b>5.9</b>	<b>Análise Histológica dos Rins dos Animais Tratados com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) na Dose de 5 mL/kg e Tempos de 24, 48 e 72 Horas Mantidos em Gaiola Metabólica .....</b>	<b>59</b>
<b>5.10</b>	<b>Avaliação do Tipo de Morte Celular Induzida pelos Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) em Cultura de Células Tubulares Renais Proximais LLC-MK2 na Concentração de 15 mgI/mL, por 24 Horas .....</b>	<b>60</b>
<b>5.11</b>	<b>Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial em Células LLC-MK2 com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 15 mgI/mL .....</b>	<b>62</b>
<b>5.12</b>	<b>Análise das Espécies Reativas de Oxigênio em Células LLC-MK2 com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 15 mgI/mL .....</b>	<b>63</b>
<b>5.13</b>	<b>Análise do KIM-1 no Sobrenadante de Células LLC-MK2 Tratadas com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar), na Dose de 15 MgI/mL.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Meio de Contraste Iodado

Os agentes de contraste radiográficos iodados vêm sendo utilizados há mais de 60 anos e são imprescindíveis na prática médica atual. No mundo, estima-se em mais de 80 milhões/ano o número de intervenções diagnósticas ou terapêuticas realizadas com o auxílio de meios de contraste (EDUARDO *et al.*, 2008; SOLOMON, 2014).

Nas últimas décadas, várias modificações têm sido realizadas na molécula orgânica na qual o iodo está inserido e têm resultado em alterações nas propriedades físicas dos contrastes. Os agentes de contraste diferem significativamente com respeito às suas propriedades físico-químicas e efeitos fisiológicos peculiares, que podem influenciar em sua eficácia e efetividade. Na prática, os contrastes apresentam várias propriedades físico-químicas interdependentes, como hidrofiliabilidade, osmolalidade, viscosidade, ionicidade e solubilidade (EDUARDO *et al.*, 2008; McCORMACK, 2013; ROUSSEFF, 2010; SOLOMON, 2014). Essas propriedades estão diretamente relacionadas ao número e ao tamanho da molécula orgânica necessária para ligação do iodo (SOLOMON, 2014). O meio de contraste ideal deve ser altamente solúvel em água, estável, biologicamente inerte, seletivamente excretado e ter baixa viscosidade, além de uma osmolalidade igual à do plasma e de boa tolerabilidade (McCORMACK, 2013).

Os contrastes iodados são utilizados nos diagnósticos por imagens, para aumentar a resolução entre os diferentes tecidos que naturalmente não absorvem suficientemente a radiação e para ter uma clara visualização dos detalhes essenciais (McCORMACK, 2013).

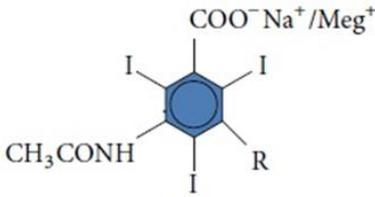
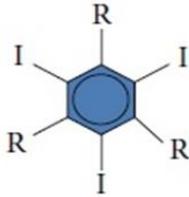
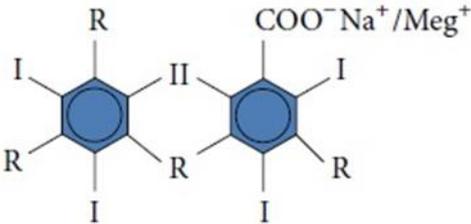
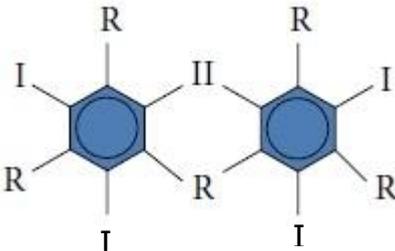
Atualmente, os contrastes utilizados são modificações químicas do anel benzeno tri-iodado e podem ser classificados baseando-se em suas características físicas e químicas, incluindo sua estrutura química, a osmolalidade, o conteúdo de iodo e a ionização em solução (SANTOS *et al.*, 2009; SOLOMON, 2014).

### 1.2 Classificação dos Contrates

Na prática clínica, a classificação baseada na osmolalidade é a mais utilizada (SANTOS *et al.*, 2009; SOLOMON, 2014). A osmolalidade é uma função definida pelo número de partículas de uma solução (independente de sua carga elétrica ou massa) por unidade de volume,

representada por mOsm/kg de água, e é proporcional ao número de partículas livres por quilo de água, representando o poder osmótico que a solução exerce sobre as moléculas de água (ROUSSEFF, 2010; SUGAWARA; DAROS, 2004). Nas últimas décadas, com o desenvolvimento dos contrastes de monômeros iônicos para monômeros não iônicos e, a partir daí, para dímeros não iônicos, o número de átomos de iodo por molécula aumentou de 1,5 para 6,0 (Figura 1), resultando em um menor número de moléculas (menor osmolalidade) e moléculas progressivamente maiores (maior viscosidade) (Tabela 1) (SOLOMON, 2014).

Figura 1 - Estrutura dos meios de contraste iodados

Estrutura molecular	Ano	Exemplo	Comentários
	1950	Monômero iônico Ioxitalamato de meglumina	Alta osmolalidade 5 a 8 x osmolalidade do sangue
	1980	Monômero não iônico Iobitridol	Baixa osmolalidade 2 a 3 x osmolalidade do sangue
	1980	Dímero iônico Ioxiglato	Baixa osmolalidade 2 x osmolalidade do sangue
	1990	Dímero não iônico Iodixanol	Isosmolar osmolalidade igual a do sangue

Fonte: SOLOMON (2014).

Os contrastes iodados são também caracterizados como iônicos ou não iônicos, e monômeros ou dímeros. Os contrastes monômeros iônicos possuem grupo carboxila nas cadeias laterais e se dissociam em ânions e cátions na solução, aumentando assim a osmolalidade. Os não iônicos não possuem grupo carboxila e, desse modo, não se dissociam na solução (McCORMACK, 2013).

Tabela 1 - Comparação das propriedades físicas dos contrastes iodados

	Concentração (mgI/mL)	Gramas de iodo/100mL	Osmolalidade (mmol/kg a 37° C)	Viscosidade (cP a 37° C)
Ioxitalamato de meglumina (Telebrix®)	350	35	2160	7,5
Iobitridol (Henetix®)	350	35	915	10
Iodixanol (Visipaque®)	320	32	290	11,8

Fonte: Adaptada de SOLOMON (2014).

### ***1.2.1 Contrastes de alta osmolalidade***

Os contrastes de alta osmolalidade são formados, por um anel benzeno tri-iodado, com duas cadeias orgânicas laterais e um grupo carboxil. O ânion iodado, diatrizoato ou ioxitalamato, é conjugado com um cátion sódio ou meglumina; o resultado é um monômero iônico. A ionização na ligação carboxil-cátion torna o contraste solúvel em água. Assim, para cada três átomos de iodo, duas partículas estão presentes em solução (razão 3:2). Sua osmolalidade em solução varia de 600 a 2100 mOsm/kg, *versus* 290 mOsm/kg do plasma humano, estando essa alta osmolalidade relacionada com alguns de seus efeitos adversos (McCORMACK, 2013; SANTOS *et al.*, 2009).

### ***1.2.2 Contrastes de baixa osmolalidade***

Os contrastes de baixa osmolalidade se apresentam na forma de: monômeros iônicos; dímeros iônicos e dímeros não iônicos (isosmolar). Os monômeros não iônicos apresentam o anel de benzeno tri-iodado solúvel em água devido à adição de grupos hidroxil hidrofílicos às

cadeias orgânicas das laterais das posições 1, 3 e 5. Como não têm grupo carboxil, não ionizam em solução. Assim, para cada três átomos de iodo, apenas uma partícula está presente em solução (razão 3:1). Logo, a uma determinada concentração de iodo, os monômeros não iônicos têm aproximadamente metade da osmolalidade dos monômeros iônicos em solução. Nas concentrações normalmente utilizadas, eles possuem uma osmolalidade que varia entre 290 e 860 mOsm/kg (SANTOS *et al.*, 2009; SOLOMON, 2014).

Os dímeros iônicos são formados pela junção de dois monômeros iônicos, com a substituição de um grupo carboxil por uma amida, diminuindo a indesejada pressão osmótica, porém aumentando a viscosidade em solução. Esses agentes possuem seis átomos de iodo por cada duas partículas em solução (razão 6:2). Sua osmolalidade é de 600 mOsm/kg. O único comercializado no mercado é o ioxaglato (SANTOS *et al.*, 2009; SOLOMON, 2014).

Os dímeros não iônicos são formados por dois monômeros não iônicos conjugados, que contêm seis átomos de iodo para cada partícula dissolvida em solução (razão 6:1). Possuem baixa osmolalidade, semelhante à do plasma (290 mOsm/kg) e apresentam baixa toxicidade. Por possuírem grandes cadeias laterais, são bastante viscosos em solução, dificultando a manipulação e limitando seu uso clínico (SUGAWARA; DAROS, 2004).

A qualidade da imagem proporcionada pelos meios de contraste está relacionada à concentração de iodo nos tecidos. Os contrastes de baixa osmolalidade e isosmolar são capazes de produzir imagens com nitidez por um período maior de tempo, quando comparados com os de alta osmolalidade, por se diluírem mais lentamente nos fluidos corporais (McCORMACK, 2013).

Existem duas importantes limitações ao uso mais generalizado do contraste de baixa osmolalidade: seu elevado custo e a ocorrência de reações adversas tardias graves. Em relação ao custo, o preço dos contrastes de baixa osmolalidade está em declínio, ocasionando redução na utilização dos contrastes de alta osmolalidade em procedimento endovascular (THOMSEN; MORCOS, 2000). Quando comparado o custo-efetividade do contraste de baixa osmolalidade (iopamidol) com o do contraste isosmolar (iodixanol), o primeiro mostrou-se como a melhor alternativa (CHICAIZA-BECERRA; GARCIA-MOLINA; GAMBOA, 2012).

### **1.3 Farmacologia dos meios de contraste**

Os contrastes iodados são destinados ao uso em procedimentos diagnósticos e terapêuticos de várias especialidades, como angiografia periférica e cerebral, urografia intravenosa, tomografia computadorizada, mielografia, angiografia digital, angiocardiografia e técnicas de intervenção (HENETIX, 2013; SANTOS *et al.*, 2009).

### **1.3.1 Farmacocinética**

Os contrastes iodados não se ligam à proteína. Seu volume de distribuição é de 0,26 L/kg de peso corporal, de acordo com a distribuição para o espaço extracelular. Após injeção intravascular, os mesmos são distribuídos no sistema intravascular e no espaço intersticial, ocorrendo o equilíbrio completo 2 horas após a injeção. Não são metabolizados, sendo rapidamente eliminados na urina nas suas formas inalteradas através de filtração glomerular sem, contudo, sofrerem reabsorção tubular. Nos pacientes com função renal normal, a meia-vida do contraste é de 2 horas. Porém, em 4 horas, 75% da dose administrada já seria excretada e, em 24 horas, a eliminação corresponde a 98%; menos de 2% são excretados nas fezes dentro de 5 dias. A depuração renal é de 110 mL/min, equivalente à filtração glomerular, independente da dose administrada. Em pacientes com insuficiência renal, com taxa de filtração glomerular (TFG) reduzida, a excreção pode prolongar-se por semanas, ganhando relevância a eliminação extra renal, principalmente biliar e intestinal (SANTOS *et al.*, 2009; VISIPAQUE, 2015).

### **1.3.3 Farmacodinâmica**

Após a administração do contraste iodado, o pico dos níveis de iodo plasmático ocorre imediatamente após a injeção intravascular rápida. Os níveis plasmáticos de iodo se reduzem rapidamente, dentro de 5 a 10 minutos, o que pode ser explicado pela diluição no fluido vascular e extravascular (VISIPAQUE, 2015).

Os contrastes iodados podem ser visualizados no parênquima renal dentro de 30 a 60 segundos após a injeção intravenosa (IV) rápida. A opacificação dos cálices e pelves em pacientes com função renal normal torna-se evidente dentro de 1 a 3 minutos, com uma ótima imagem, que ocorre dentro de 5 a 15 minutos (VISIPAQUE, 2015). É conhecido que alguns

destes pacientes que recebem infusão de contraste intra-arterial ou intra-venoso apresentam injúria renal, reconhecida pelo aumento dos níveis de creatinina sérica (SOLOMON, 2014).

#### 1.4 Nefropatia Induzida por Contraste

Nefropatia induzida por contraste (NIC) é definida como um aumento relativo da creatinina sérica em 25% ou um aumento absoluto de 0,5 mg/dL, no período de 48 a 72 horas após administração de meio de contraste na ausência de qualquer outra causa ou fator de risco. O pico ocorre entre o segundo e terceiro dia e retorna aos níveis basais em 14 dias. No sumário de urina frequentemente encontram-se células epiteliais, cilindros granulosos e mínima proteinúria. Em quase todos os casos há baixa fração de excreção de sódio (INDA FILHO, 2014; NICOLA *et al.*, 2015; ROUSSEFF, 2010; ULTRAMARI *et al.*, 2006).

A NIC é a terceira causa iatrogênica de insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados e está associada com taxa de mortalidade elevada, superior a 34%, nessa população (EDUARDO *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2015). Em recente estudo, foi apresentada uma incidência de 10,3% em pacientes de alto risco e de 4,9% em pacientes de baixo risco, utilizando um volume de  $221,8 \pm 119,2$  mL de contraste. Foram considerados pacientes de alto risco aqueles com *diabetes mellitus* (DM), insuficiência renal crônica (IRC), idade avançada, choque, insuficiência cardíaca, anemia e grande volume de contraste (EBISAWA *et al.*, 2016). Além de estar associada ao aumento da morbidade e do tempo de internação. É responsável aproximadamente por 10% das insuficiências renais que requerem hospitalização na Europa e nos Estados Unidos, e pelo internamento de um em cada seis pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) por redução da função renal pós-utilização de contraste, requerendo hemodiálise e, conseqüentemente, aumento do custo para os sistemas de saúde (NICOLA *et al.*, 2015; ROSE JUNIOR; CHOI, 2015).

A patogênese da NIC não está completamente compreendida. Porém, existe a hipótese de que uma constrição dos vasos dentro da medula renal leve à redução da entrega de oxigênio, resultando em um efeito tóxico direto nas células tubulares renais. Conseqüentemente, a redução na perfusão dos rins causa a ativação do *feedback* tubuloglomerular, respondendo com a liberação de mediadores vasoativos endógenos, como endotelina e adenosina. Isso é acompanhado pela redução nos rins da produção de vasodilatadores como óxido nítrico e

prostaglandinas, causando NIC (NICOLA *et al.*, 2015). Outro possível mecanismo inclui os mediadores osmóticos, causando alterações na hemodinâmica renal. Os contrastes são filtrados livremente, não são absorvidos e são 100% eliminados pela urina. Como consequência, a carga osmótica do contraste presente nos túbulos renais nas primeiras horas após a administração é muito alta, sendo ainda mais alta com o contraste de alta osmolalidade. Possivelmente, estes mecanismos osmóticos ocasionam alterações na hemodinâmica renal, que levam à redução do fluxo sanguíneo e subsequente isquemia renal (BRIGUORI; TAVANO; COLOMBO, 2003; ROSE JUNIOR; CHOI, 2015; WONG *et al.*, 2012). Pesquisas em ratos mostraram que, após a administração de contraste de alta osmolalidade, ocorre um aumento da resistência vascular renal pelo mecanismo de *feedback* tubuloglomerular. Contudo esse mesmo mecanismo não é ativado após a administração de contraste de baixa osmolalidade (RIBEIRO, 2003).

Foi também observada a elevação da concentração de cálcio intracelular, adrenalina, angiotensina, vasopressina e diminuição dos níveis de dopamina em cultura de células mesangiais quando expostas ao contraste de baixa osmolalidade. Este trabalho sugere que o meio de contraste desencadeia várias respostas celulares que levam à contração das células mesangiais e, assim, dos glomérulos, justificando a redução do ritmo de filtração glomerular (LARANJA, 1991; NAZIROGLU *et al.*, 2013).

Vários estudos buscam medidas profiláticas para prevenção de NIC, dentre eles estudos realizados com N-acetilcisteína, bicarbonato, diuréticos, solução salina, etc. Atualmente, a medida mais eficaz para prevenir NIC é a hidratação efetiva com solução salina (DOWNES, 2006; INDA FILHO *et al.*, 2014; NAZIROGLU *et al.*, 2013). Estudo realizado com 500 pacientes randomizados em centro único mostrou que não existe superioridade na prevenção de NIC realizada com solução salina associada a bicarbonato ou altas doses de N-acetilcisteína, quando comparada com solução salina sozinha (INDA FILHO *et al.*, 2014).

Estudos com animais sugerem um efeito tóxico direto do contraste em células tubulares renais, levando à apoptose celular tempo-dependente e dose-dependente, e contribuindo para patogênese da NIC (NETTI *et al.*, 2014; ROMANO *et al.*, 2008). Enquanto em estudos *in vitro* com cultura celular, foi demonstrado que o contraste causa alterações em várias moléculas de sinalização, responsáveis pela homeostasia celular e que podem mediar morte celular e inflamação (MICHAEL *et al.*, 2014).

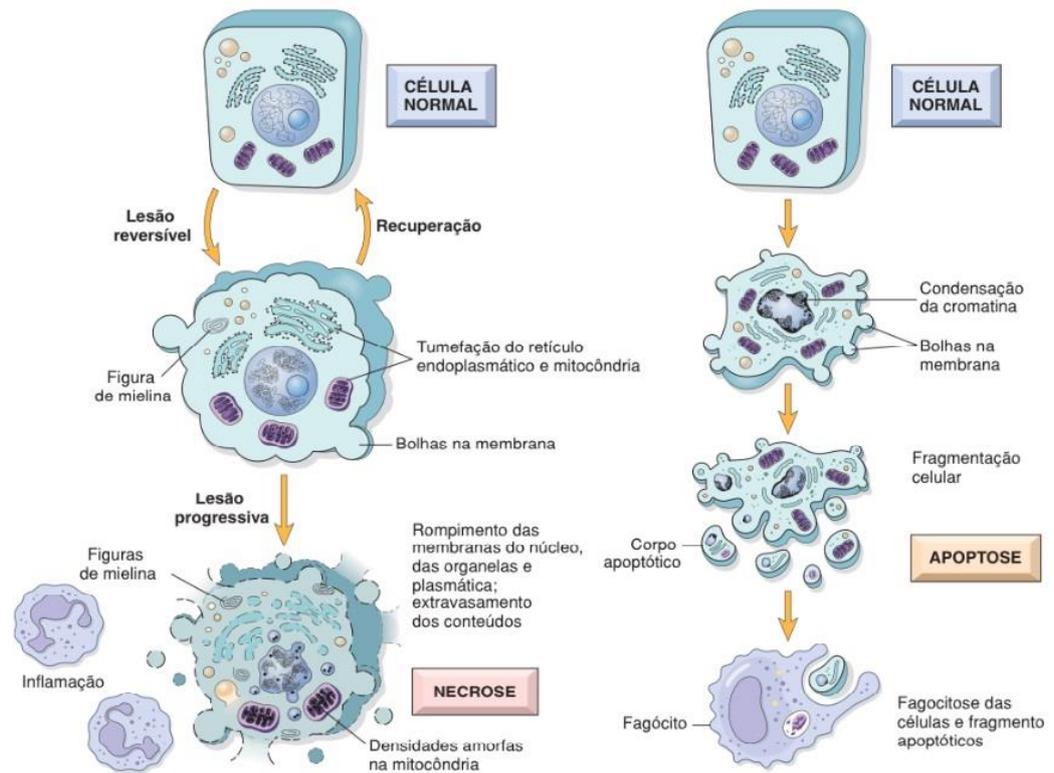
## 1.5 Morte Celular

Os organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células para seu desenvolvimento e manutenção. A homeostasia celular é atingida pelo controle de suas demandas fisiológicas por meio de seu estado de metabolismo, diferenciação e especialização. Quando a célula sofre um estresse fisiológico mais excessivo e/ou alguns estímulos patológicos, ela é capaz de sobreviver e continuar funcionando com estas novas alterações constantes, por meio de adaptações, que são respostas estruturais e funcionais reversíveis (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; ROBBINS; COTRAN, 2010).

No momento em que os limites da resposta adaptativa forem ultrapassados ou se as células forem expostas à agentes lesivos ou estresse, privadas de nutrientes essenciais, ou ficarem comprometidas por mutações que afetam os constituintes celulares essenciais, sobrevém uma sequência de eventos denominada lesão celular. Esta lesão celular pode ser reversível até certo ponto, mas, de acordo com a persistência do estímulo ou sua intensidade, a célula pode sofrer uma lesão irreversível, com perda de sua estrutura e função vital, caracterizando-se como morte celular (PAROLIN; REASON, 2001; ROBBINS; COTRAN, 2010).

A morte celular é um processo normal e essencial na embriogênese, no desenvolvimento dos órgãos e na manutenção da homeostasia. Os dois tipos mais comuns de morte celular, são a necrose e a apoptose, que se diferenciam pela morfologia, pelos mecanismos e pelos papéis na fisiologia e na doença. A necrose celular é um processo passivo e acontece quando ocorre um dano acentuado às membranas, levando ao extravasamento das enzimas lisossômicas para o citoplasma, que devem digerir a célula e proporcionar o escape do conteúdo celular. A apoptose celular é um processo ativo que necessita de reserva de ATP e acontece nos casos em que o DNA ou as proteínas celulares são lesadas de modo irreparável, levando a célula a cometer suicídio (Figura 2) (PAROLIN; REASON, 2001; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Figura 2 – Mecanismos de morte celular



Fonte: ROBBINS; COTRAN (2010).

### 1.5.1 Necrose celular

Na necrose, ocorrem a desnaturação de proteínas intracelulares e a digestão enzimática das células lesadas. As células necróticas são incapazes de manter a integridade da membrana, levando ao extravasamento de seus conteúdos. Com esse processo, inicia-se a inflamação do tecido circundante. A célula necrótica é digerida por enzimas derivadas dos lisossomos das próprias células que estão morrendo ou dos lisossomos dos leucócitos que são recrutados como parte da reação inflamatória. Todo o processo de digestão dos conteúdos celulares e a resposta ao hospedeiro podem levar horas para se desenvolverem (Figura 2) (ROBBINS; COTRAN, 2010). Alguns estudos sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG; THOMPSON, 2006).

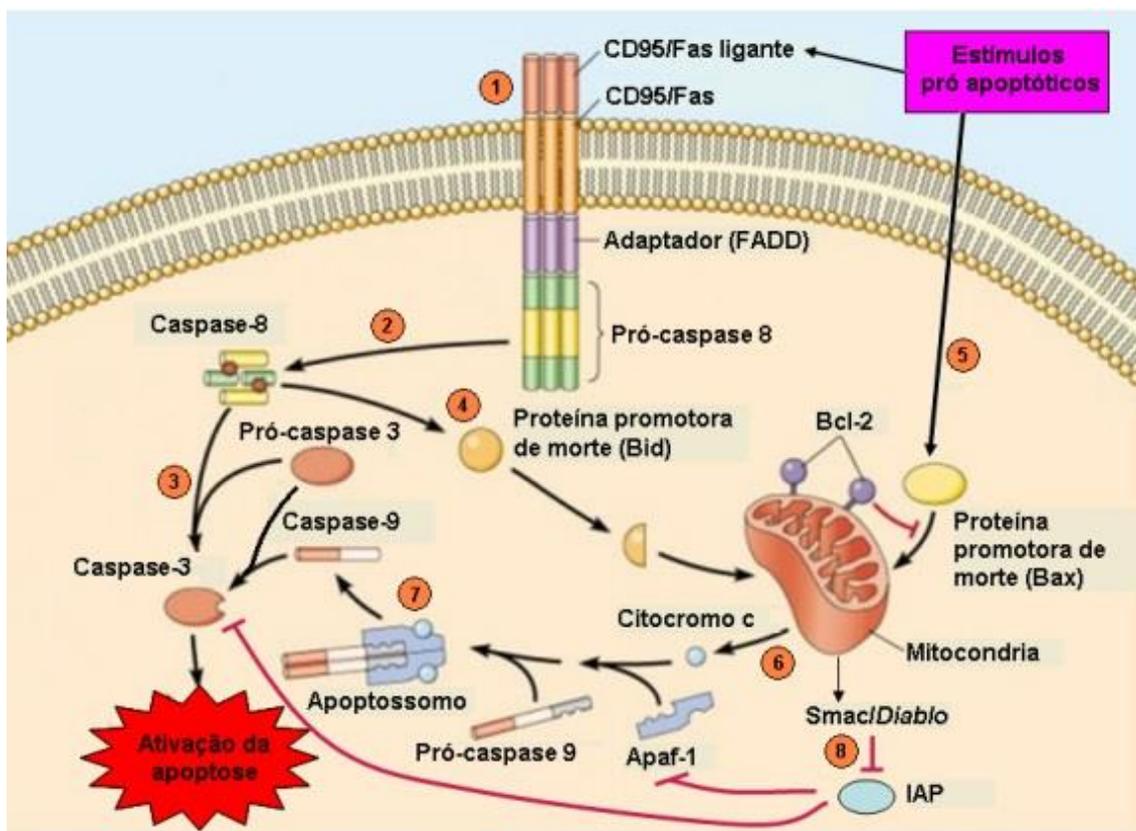
### ***1.5.2 Apoptose Celular***

Apoptose é tradicionalmente conhecida como morte celular programada e possui características morfológicas próprias (HUGHES; GOBE, 2007). A via de morte por apoptose é induzida por um programa de suicídio estritamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu próprio DNA, bem como suas proteínas nucleares e citoplasmáticas (ROBBINS; COTRAN, 2010).

As células que sofrem apoptose passam por algumas alterações morfológicas. Inicialmente, ocorre uma retração celular, na qual a célula apresenta-se menor, com o citoplasma denso, e as organelas, embora aparentemente normais, encontram-se mais compactadas. A característica mais marcante das células em apoptose é a condensação da cromatina, que ocorre com a agregação da cromatina à membrana nuclear, podendo levar ao rompimento nuclear e à produção de dois ou mais fragmentos. Na célula apoptótica também formam-se bolhas citoplasmáticas superficiais e extensas, que sofrem fragmentação e formam os corpos apoptóticos envoltos por membranas, compostos de citoplasma e organelas estreitamente acondicionadas, com ou sem fragmentos nucleares. Estes corpos apoptóticos são rapidamente ingeridos pelos fagócitos e degradados pelas enzimas lisossômicas dos fagócitos (Figura 2). O processo de apoptose divide-se em duas fases: de iniciação, durante a qual algumas caspases tornam-se cataliticamente ativas, e a fase de execução, durante a qual outras caspases iniciam a degradação de componentes celulares críticos. Os sinais de início da apoptose originam-se principalmente por duas vias distintas: a via intrínseca ou mitocondrial, e a via extrínseca ou morte iniciada por receptor (PIRES, 2008; ROBBINS; COTRAN, 2010).

A via mitocondrial é o principal mecanismo de apoptose em células mamíferas, tendo já seu papel bem estabelecido em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. Essa via resulta no aumento da permeabilidade mitocondrial e na liberação de moléculas pró-apoptóticas indutoras de morte dentro do citoplasma. Ela é desencadeada por estresse intracelular, quando, na maioria das vezes, o principal mediador é a mitocôndria. (Figura 3) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; LUCINDA, 2009; PAROLIN; REASON, 2001; PIRES, 2008; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Figura 3 - Esquema das vias de apoptose



Fonte: PIRES (2008)

Legenda: Apoptose desencadeada pela via extrínseca (1), ou morte iniciada por receptor de morte. Ativação da caspase-8 (2). Clivagem e ativação da pró-caspase-3 (3). Interação da via intrínseca com a via extrínseca, por meio da ativação da proteína Bid (4). Apoptose desencadeada pela via intrínseca ou mitocondrial (5). Liberação do citocromo c pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (6). Formação do apoptossomo (7). Liberação da *Smac/Diablo* (8).

Alterações no potencial de membrana mitocondrial estão presentes na apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial, causadas pelo aumento da permeabilidade da membrana, como consequência de um dano celular (BARACCA *et al.*, 2003; PETIT, 1992).

A via extrínseca de apoptose é iniciada por receptores de morte presentes na membrana plasmática. Esses receptores são membros da família dos receptores de morte CD95/Faz/Apo1 e fator de necrose tumoral (TNF), que possuem um domínio citoplasmático, chamado domínio de morte, o qual é essencial para sinalização de apoptose (Figura 3) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; PIRES, 2008, ROBBINS; COTRAN, 2010).

As vias intrínseca e extrínseca convergem para uma cascata de ativação de apoptose que modulam a fase final da apoptose. A via mitocondrial ativa a caspase-9 desencadeante, e a via

de receptor de morte ativa a caspase-8 desencadeante. As caspases desencadeantes são clivadas e geram sua forma ativa, que devem ativar as caspases-3 e -6 executoras, que devem atuar em muitos componentes celulares, que culminarão em apoptose (Figura 3) (ROBBINS; COTRAN, 2010).

## 1.6 Biomarcadores Renais

Atualmente, a avaliação da função renal é feita utilizando a dosagem sérica de ureia, creatinina e análise urinária. Várias evidências mostraram que esses biomarcadores clássicos utilizados não são eficazes para o diagnóstico precoce da doença renal, pois apresentam pouca sensibilidade e especificidade em detectar alterações renais no início de uma lesão. Um biomarcador pode ser definido como um parâmetro estrutural, bioquímico, fisiológico ou de alterações genéticas, que indique a presença, a severidade ou o progresso de uma doença (LUO *et al.*, 2014; WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015). A brevidade na identificação de pacientes com comprometimento da função renal é importante para oferecer um tratamento precoce e melhorar o prognóstico (WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015).

A ureia e a creatinina séricas não são marcadores de função renal muito sensíveis e específicos, pois podem ser influenciadas por fatores renais e não renais. A proteinúria e a albuminúria também são biomarcadores utilizados para avaliação do declínio da função renal, contudo apresentam algumas desvantagens, como pouca especificidade, aparecimento tardio após a lesão renal ter ocorrido e não estão presentes em todos os tipos de doença renal. A TFG, por meio do cálculo do *clearance* de creatinina, é mais um biomarcador utilizado para avaliação da função renal, mas, por ser calculado utilizando a dosagem da creatinina sérica, que possui uma acurácia bastante afetada por variáveis independentes, sugere não ser um marcador eficaz (EDELSTEIN, 2011). Além disso, diversos critérios utilizados atualmente para o diagnóstico de lesão renal aguda (LRA) baseiam-se na creatinina sérica e TFG estimada pela creatinina, como os critérios *Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Kidney Disease* (RIFLE), *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) e *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) (LEVI *et al.*, 2013).

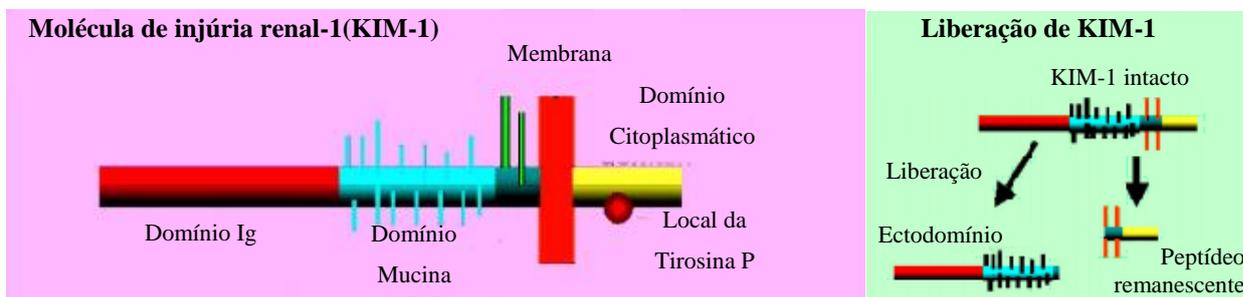
Recentemente, estudos com novos biomarcadores renais têm sido valiosos na detecção específica e precoce de lesão renal, e na estratificação de seu risco. Dentre os biomarcadores mais estudados, destacam-se a molécula de injúria renal 1 (KIM-1), a lipocaína associada à

gelatinase neutrofílica (NGAL), a cistatina C urinária e a interleucina 18 (IL-18) urinária (WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015).

O KIM-1 é uma glicoproteína transmembrana com uma imunoglobulina e um domínio mucina, mais especificamente um receptor fosfatidilserina, que é expressa na membrana apical de células tubulares proximais após isquemia ou injúria tóxica renal (FIELD *et al.*, 2014; ICHIMURA *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2014; WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015).

A molécula completa do KIM-1 possui 104 kDa, sendo dividida em domínio citoplasmático e ectodomínio extracelular (Figura 4) (ICHIMURA; SHAN, 2008). O ectodomínio extracelular (aproximadamente 90 kDa) é clivado pelas metaloproteinases e liberado pelas células do túbulo proximal para urina de roedores e humanos após a injúria tubular proximal renal. Durante a injúria, o KIM-1 assume os atributos de fagócito endógeno e fagocita *debris* de células necróticas e apoptóticas, favorecendo o reparo tecidual e restauração da função (ICHIMURA *et al.*, 2008).

Figura 4 – Modelo esquemático da molécula de KIM-1



Fonte: Adaptada de ICHIMURA *et al* (2008)

A excreção urinária de KIM-1 é altamente específica para injúria renal, pois nenhum outro órgão mostra expressão de KIM-1 capaz de alterar as suas concentrações urinárias (WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015). Outra importante característica deste biomarcador é que ele não é expresso pelo rim normal (HAMIDEH *et al.*, 2014). Uma vez na urina, o KIM-1 apresenta uma alta estabilidade, não sofrendo interferência do pH urinário e nem de outras variáveis (VAIDYA *et al.*, 2005). Somado a isso, o aumento precoce da expressão de KIM-1 seletiva pelas células tubulares proximais lesadas e a consequente liberação na urina são características importantes que estimulam a pesquisa do KIM-1 urinário como biomarcador de dano renal (BONVENTRE, 2014).

Recentemente, foram identificadas sua sensibilidade e sua especificidade para injúria renal, possibilitando a identificação da doença renal na fase pré-clínica (BONVENTRE, 2014). Em diversos estudos que avaliaram diferentes contextos clínicos de LRA, o KIM-1 urinário apresentou boas sensibilidade e especificidade. Na maioria dos estudos, o KIM-1 urinário foi mais precoce que a creatinina e a ureia séricas, sendo algumas vezes um biomarcador independente de lesão renal. Além disso, o KIM-1 apresentou associação com outros marcadores de lesão renal, como a proteinúria, e teve boa correlação com a gravidade das lesões (BONVENTRE, 2014; LUO *et al.*, 2014; WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os contrastes iodados têm sido utilizados mundialmente por mais de 60 anos. Com base em dados atuais, são realizados anualmente nos Estados Unidos 2 milhões de cateterismos cardíacos e em torno de 30 milhões de tomografias computadorizadas com contraste, além do uso nas angiografias. Em uma tomografia computadorizada, injetam-se no leito vascular aproximadamente 40 g de iodo. Isso é uma dose muito grande e sinaliza a importância da segurança desse agente (SOLOMON, 2014).

Os meios de contraste iodados estão entre os medicamentos mais amplamente administrados no mundo e, muitas vezes, são necessários para imagens clínicas ideais (ROSE JUNIOR; CHOI, 2015). Apesar da evolução e do desenvolvimento de novos meios de contraste, as complicações decorrentes da utilização dos meios de contraste ainda persistem, sendo a mais comum a NIC. Trata-se de um importante problema clínico no seguimento dos pacientes que se submetem a angiografias e intervenções percutâneas, representando a terceira causa mais comum de insuficiência renal adquirida no hospital e estando associada com mortalidade e morbidade significantes - em torno de 19% destes pacientes que desenvolveram NIC persistem com comprometimento renal após a exposição ao meio de contraste. Com essa incidência e as terapias necessárias, os custos dos serviços associados à NIC aumentam substancialmente (EDUARDO *et al.*, 2008; SOLOMON, 2014; ULTRAMARI *et al.*, 2006).

Unidades de radiologia moderna têm abandonado o uso de contraste de alta osmolalidade em pacientes com fatores de risco, devido ao alto risco de desenvolver NIC. Por razões econômicas e por não estar claro se o risco de desenvolver NIC é importante na população geral de pacientes, muitos hospitais no Brasil e ao redor do mundo continuam a utilizar esse tipo de contraste (INDA FILHO *et al.*, 2014).

Clínicos e radiologistas devem estar cientes dos riscos aos quais estão submetendo seus pacientes durante a utilização do meio de contraste. O primeiro passo é assegurar que a utilização é essencial para um diagnóstico seguro (ROSE JUNIOR; CHOI, 2015).

A fisiopatologia da NIC não está completamente caracterizada. Acredita-se ser devido a vários fatores, sendo os dois principais e prováveis mecanismos as alterações mediadas por fatores osmóticos na hemodinâmica renal e injúria tubular direta, por meio da quimiotoxicidade específica da molécula de contraste (MICHAEL *et al.*, 2014; NICOLA *et al.*, 2015; ROSE JUNIOR; CHOI, 2015).

A nefropatia é decorrente da morte celular, que pode ocorrer por necrose ou apoptose, sendo estes mecanismos fisiopatológicos que acontecem a nível celular (BUYUKLU *et al.*, 2014). Alguns estudos *in vitro*, realizados com culturas celulares, demonstraram que os meios de contraste iodado causam alterações em uma variedade de moléculas de sinalização que desempenham importante papel na homeostasia celular (MICHAEL *et al.*, 2014).

Dessa forma, ressalta-se a importância do estudo comparando a função renal de ratos após a administração dos meios de contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os estudos *in vivo* possibilitaram também a análise das alterações dos biomarcadores da função renal. Entre eles, destaca-se o KIM-1 urinário, que tem sido amplamente estudado como novo biomarcador de LRA em diversos estudos experimentais e em diferentes contextos clínicos. Além disso, poucos estudos foram encontrados na literatura com KIM-1 urinário após uso de contraste em animais e humanos. Assim, avaliamos o KIM-1 urinário como biomarcador precoce de NIC.

Adicionalmente, estudamos os efeitos dos contrastes em linhagem de células do túbulo renal proximal LLC-MK2, pois elas representam um tipo celular muito bem caracterizado em termos de propriedades funcionais e composição molecular (HULL; CHERRY; TRITCH, 1962), constituindo um modelo para avaliação de citotoxicidade *in vitro*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Comparar os efeitos renais dos contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, bem como avaliar o papel do KIM-1 como preditor precoce da NIC, em estudos *in vivo* e *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos renais dos meios de contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, por meio da mensuração dos marcadores clássicos.
- Comparar, quanto à indução de NIC, a exposição do meio de contraste de alta osmolalidade, nas doses de 2,5 e 5,0 mL/kg e nos tempos de 24, 48 e 72 horas.
- Estudar o envolvimento do KIM-1 como um biomarcador precoce de nefropatia induzida por contraste.
- Avaliar o envolvimento da via mitocondrial de apoptose em células tubulares renais LLC-MK2, tratadas com meios de contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar.
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmática em células tubulares renais LLC-MK2, tratadas com meios de contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, pesando de 150 a 200 g, pertencentes ao Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Foram mantidos sob condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclo claro-escuro de 12 horas). Comida e água foram fornecidas *ad libitum*.

### 4.2 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará e aprovado sob protocolo número 33/2015. Todos os experimentos foram realizados seguindo as orientações da Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos.

### 4.3 Ensaio *in Vivo*

#### 4.3.1 Grupos experimentais

Os animais foram previamente pesados e colocados em gaiolas metabólicas individuais. A gaiola dispõe de comedouro, bebedouro, coletor de fezes e um Becker coletor de urina. Após um período de 24 horas de adaptação dos animais às novas condições, eles foram novamente pesados e, em seguida, o tratamento dos grupos experimentais ( $n = 5$  por grupo) foi iniciado, a saber:

- Grupo controle: animais não tratados.
- Grupo alta osmolalidade 5 mL/kg, 72 horas: animais tratados com ioxitalamato de meglumina 5 mL/kg, IV, e avaliados 72 horas após o tratamento.
- Grupo baixa osmolalidade 5 mL/kg, 72 horas: animais tratados com iobitridol 5 mL/kg, IV, e avaliados 72 horas após o tratamento.

- Grupo isosmolar 5mL/kg, 72 horas: animais tratados com iodixanol 5 mL/kg, IV, e avaliados 72 horas após o tratamento.
- Grupo alta osmolalidade 2,5 mL/kg, 72 horas: animais tratados com ioxitalamato de meglumina 2,5 mL/kg, IV, e avaliados 72 horas após o tratamento.
- Grupo alta osmolalidade 5 mL/kg, 24 horas: animais tratados com ioxitalamato de meglumina 5 mL/kg, IV, e avaliados 24 horas após o tratamento.
- Grupo alta osmolalidade 5 mL/kg, 48 horas: animais tratados com ioxitalamato de meglumina 5 mL/kg, IV, e avaliados 48 horas após o tratamento.

Para administração das drogas em estudo, os animais foram imobilizados em caixas adaptadas, onde se mantinha exposta apenas a cauda. A veia caudal foi puncionada com agulha 13 x 4,5 G e, em seguida, os meios de contraste foram administrados nas doses de 2,5 ou 5 mL/kg.

Os grupos experimentais foram mantidos em gaiola metabólica 24, 48 ou 72 horas após a administração. Durante as últimas 24 horas, foram avaliados os parâmetros metabólicos, como descrito a seguir.

#### ***4.3.2 Protocolo experimental***

Os animais dos grupos tratados e não tratados foram submetidos à nefrectomia esquerda, 24, 48 ou 72 horas após a administração dos meios de contraste. Para tanto, os animais foram anestesiados previamente com tiopental (50 mg/kg, i.p.). Em seguida, foi realizada laparotomia, por meio de uma incisão na parede abdominal, com base na linha alba, e duas incisões perpendiculares à primeira, para facilitar a manipulação. As vísceras foram rebatidas para o lado direito para visualização do rim esquerdo, seguido pela sua remoção.

Imediatamente antes da retirada do rim esquerdo, a artéria renal esquerda foi seccionada, e foram coletados 2 mL de sangue em dois tubos separados, contendo heparina lítica. Os dois tubos foram centrifugados (3.500 rpm, durante 10 minutos) para obtenção do plasma. As amostras de plasma foram congeladas a -80°C e descongeladas apenas uma vez para análise laboratorial.

A urina das últimas 24 horas antes do sacrifício dos animais foi coletada em Becker contendo óleo mineral. O conteúdo do Becker foi colocado em uma proveta graduada, na qual a urina apresentava-se separada do óleo mineral. A urina de 24 horas foi coletada e armazenada em dois frascos de 1,5mL. Os frascos de urina foram armazenados em freezer -80°C, para posterior análise laboratorial.

#### **4.3.3 Mensuração de parâmetros bioquímicos**

Para aferir os parâmetros bioquímicos, foi utilizado um analisador automático (Roche Diagnostics Limited, Rotkreuz, Suisse). Foram determinadas as concentrações de proteínas e albumina urinárias, respectivamente, proteinúria e microalbuminúria, além de concentrações de creatinina plasmática e urinária. Além disso, foram aferidos os níveis plasmáticos e urinários dos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), utilizando um eletrodo íon-seletivo (Roche Diagnostics Limited, Rotkreuz, Suisse).

#### **4.3.4 Determinação do biomarcador KIM-1**

Os ensaios para a quantificação de KIM-1 na urina e no sobrenadante das células foram realizados por meio da técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) do tipo sanduíche, que apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, utilizando o *kit* da R&D systems. O ELISA sanduíche é baseado em: (1) adição das amostras e do padrão a placa de 96 poços, onde previamente houve a adsorção de anticorpos anti-KIM-1 de rato específicos (anticorpo de captura) pelo fabricante; (2) ligação da molécula de KIM-1 presente nas amostras a esses anticorpos de captura anti-KIM-1 específicos, ligados a placa; (3) adição e ligação de anticorpos conjugados a biotina (biotinilados) anti-KIM-1 de rato a epítomos do KIM-1 fixados nos anticorpos de captura; (4) conjugação da estreptavidina ligada à enzima (peroxidase) com a biotina dos anticorpos biotinilados; (5) e quantificação do complexo biotina-estreptavidina-enzima, pela avaliação da atividade enzimática da peroxidase na presença do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Por fim, essa atividade enzimática é medida por meio de espectrofotômetro, utilizando 450 nm, sendo o aumento da absorbância diretamente proporcional à concentração de KIM-1 na amostra, em ng/mL.

### **4.3.5 Análise histológica**

Após o experimento, os tecidos renais removidos foram colocados em solução a 10% de formol tamponado e, 24 horas após, transferidos para uma solução de etanol a 70%. Após o processamento de tecidos, secções mediana-sagital de 5 µm em parafina foram coradas com hematoxilina-eosina, para avaliação histopatológica e registro fotográfico.

A gradação da injúria renal observada foi subdividida em leve (menos de um terço dos túbulos), moderada (um terço a dois terços) e acentuada (mais de dois terços dos túbulos afetados), considerando toda a extensão do corte histológico avaliado (D'AGATI; JENNETTE; SILVA, 2005).

## **4.4 Ensaio *in Vitro***

### **4.4.1 Obtenção, cultivo e manutenção das células tubulares renais**

Os estudos de toxicidade em cultura de células têm sido amplamente utilizados e representam uma alternativa para redução da utilização de animais de laboratório. Foi utilizada uma linhagem celular, LLC-MK<sub>2</sub>, conforme descrito a seguir.

As células LLC-MK<sub>2</sub> foram obtidas do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo e mantidas em cultivo no Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10% e mantidas em estufa em uma saturação de 5% de gás carbônico a 37°C até atingirem confluência. Para formar a suspensão de trabalho, as células foram deslocadas com tripsina/EDTA e centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspensão, e uma alíquota foi utilizada para quantificação em câmara de Neubauer, pelo método de exclusão do azul de Tripán (0,1%). A concentração celular para realização dos experimentos foi ajustada a  $1 \times 10^5$  células/mL.

#### 4.4.2 Avaliação do tipo de morte celular

A avaliação do tipo de morte induzido pelos contrastes em estudo foi realizada pela determinação das características celulares indicativas de morte, se por necrose ou apoptose.

Foi utilizada a citometria de fluxo como a metodologia para estudar os eventos celulares, pois este instrumento possui como característica a manutenção das condições vitais das células após sua manipulação, permitindo investigações seguras do comportamento biológico da população em estudo, avaliando, inclusive, características funcionais. No citômetro, as células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida que, ao interceptarem o feixe de luz, geralmente proveniente de um *laser*, causam sua dispersão em várias direções, dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e da densidade óptica de cada célula (MACEY, 1994), as quais estão diretamente correlacionadas com a morfologia celular, que pode ser apreciada em preparados corados com diferentes fluorocromos. Neste contexto, o feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado com o tamanho celular (*forward light scatter* – FSC), enquanto aqueles que captam o desvio ortogonal aos eixos do fluido celular e do *laser* (*side light scatter* – SSC) estão relacionados com a complexidade celular interna, em particular sua granularidade. Após a análise simultânea destes parâmetros, gráficos de coordenada *x* e *y* são, então, gerados (MACHADO JUNIOR *et al.*, 2006).

##### 4.4.2.1 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo

Neste estudo, foi analisada a capacidade de os contrastes iodados ioxitalamato de meglumina, iobitridol e iodixanol induzirem apoptose e/ou necrose, utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V com o *kit* BD Pharmingen™ Annexin V-PE. A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolipídios de membrana plasmática, por meio de suas cargas negativas, na presença de íons cálcio. Quando o sinal de morte celular ocorre, a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana. A exposição da fosfatidilserina parece começar durante as fases precoces da apoptose - enquanto a membrana celular continua intacta - até os estágios finais, nos quais a célula se fragmenta, formando os corpos apoptóticos (VAN ENGELAND *et al.*, 1998). Dessa forma, a externalização da fosfatidilserina e a ligação de anexina V é uma evidência da apoptose (ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006). A

anexina V pode ser conjugada com fluorocromos como o ficoeritrina (PE), que serve como uma sonda sensível para análises por citometria de fluxo das células que estão sofrendo apoptose. A necrose, por outro lado, é acompanhada pela perda da integridade da membrana celular e é avaliada ao se adicionar o corante vital *7-aminoactinomycin D* (7-AAD). O corante 7-AAD se liga ao DNA e emite alta fluorescência quando excitado pelo *laser*. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do 7-AAD, no entanto, as células com membrana rompida permitem sua entrada, e o 7-AAD se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência. As células viáveis apresentarão baixa fluorescência, podendo distinguir as células em apoptose precoce (Anexina V-PE positivas) daquelas em necrose (7-AAD positivas). As células viáveis também são diferenciadas por serem Anexina V-PE e 7-AAD negativas. No entanto, células em apoptose tardia se coram com ambos, Anexina V-PE e 7-AAD, devido ao estágio final de desintegração celular, não havendo como diferenciar células em necrose de células em apoptose tardia por este ensaio (BOERSMA *et al.*, 2005).

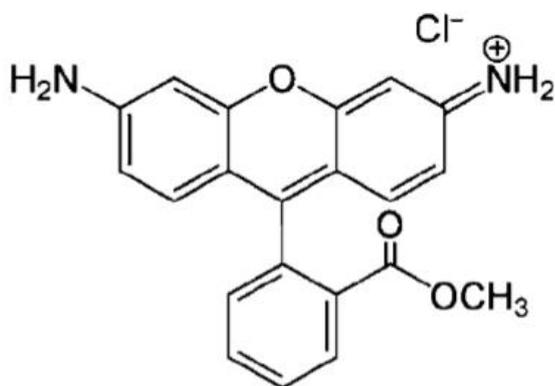
#### 4.4.2.1.1 Protocolo experimental

As células LLC-MK<sub>2</sub> foram tratadas com os contrastes ioxitalamato de meglumina, iobitridol e iodixanol 15 mgI/mL. Foi utilizada esta concentração por ser equivalente à concentração de 5mL/kg, utilizada nos estudos *in vivo*. Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi coletado, colocado em um tubo (50 mL) e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos para coletar células em suspensão. As células aderidas à placa foram lavadas com solução tampão de fosfato (PBS) três vezes e tripsinizadas. O *pellet* obtido após a tripsinização foi ressuspensionado no meio que foi retirado do frasco e separado previamente. As células foram centrifugadas novamente, e o *pellet*, então, ressuspensionado em 500 µL de tampão do *kit* para detecção de apoptose e necrose. Foram retirados 100 µL dessa suspensão e colocados em frasco para citômetro. Em seguida, foram adicionados 5 µL de Anexina V-PE, 7-AAD, ou de ambos, em cada frasco do citômetro, os quais ficaram em incubação por 15 minutos protegidos da luz. Por fim, foram adicionados 400 µL do tampão, e os frascos foram levados para o citômetro de fluxo. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD, New Jersey, USA). Os dados foram obtidos e analisados com o *software* CellQuest®.

#### 4.4.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

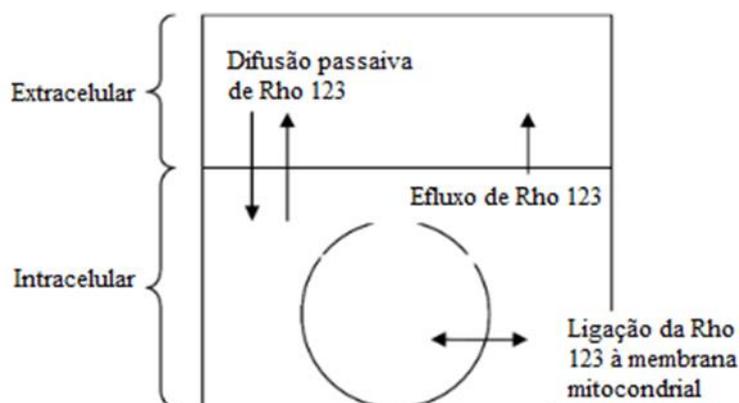
Para a análise do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o corante rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas e emitindo fluorescência vermelha (Figura 5). Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectadas em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde citosólica em detrimento da vermelha mitocondrial, indicando uma difusão do Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas (JOHNSON *et al.*, 1980) (Figura 6). Assim, o fluorocromo Rho 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada por meio do filtro de fluorescência vermelha (FL2) (YANG *et al.*, 2012).

Figura 5 - Estrutura química do fluorocromo catiônico rodamina 123



Fonte: JOHNSON *et al.* (1980).

Figura 6 - Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente rodamina 123 (Rho123) e sua respectiva ligação à membrana mitocondrial funcional



Fonte: YANG *et al.* (2012).

#### 4.4.3.1 Protocolo experimental

As células LLC-MK<sub>2</sub>, após 24 horas de tratamento com os contrastes ioxitalamato de meglumina, iobitridol e iodixanol 15 mgI/mL, tiveram seu meio de cultura transferido para um tubo (5 mL), sendo, posteriormente, centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos para coleta das células em suspensão. As células aderidas à placa foram lavadas com PBS três vezes, tripsinizadas, e a suspensão obtida foi adicionada ao meio de cultura coletado inicialmente. As amostras foram centrifugadas novamente, e o *pellet* foi ressuspensão em 500 µL de solução salina (PBS). Posteriormente, foram adicionados 5 µL da solução de Rho123 (5 mg/mL) em etanol, sendo as amostras incubadas por 15 minutos a 37°C. Por fim, os tubos foram levados ao citômetro de fluxo para leitura (515 a 530 nm) (LIMA, 2005). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Os dados foram obtidos e analisados por meio do *software* CellQuest®.

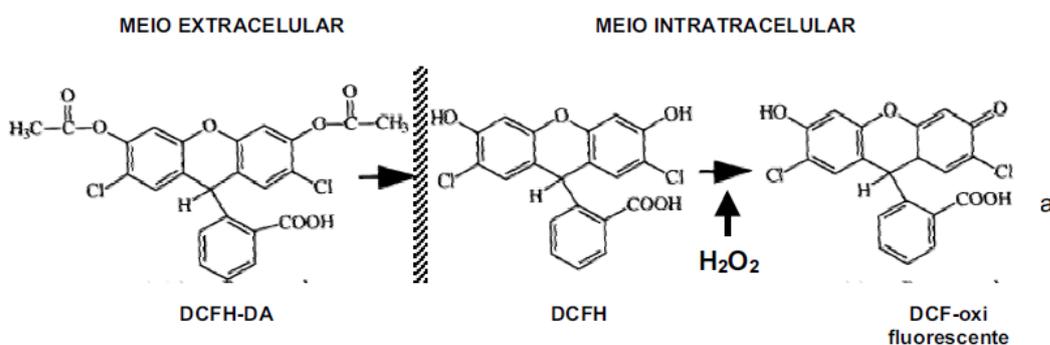
#### 4.4.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas

Com o intuito de avaliar o papel das espécies reativas de oxigênio no efeito renal dos contrastes utilizados, foi utilizado um marcador para estresse oxidativo da célula, o DCFH. O

princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda não fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, provendo um substrato oxidável (DCFH). O DCFH-DA é um composto estável não fluorescente lipofílico, que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA, para formarem a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), a qual, devido à sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH, formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com emissão em 510 a 530 nm (Figura 7). A intensidade da fluorescência intracelular verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à presença de metabólitos oxidativos produzidos pelas células. (BASS *et al.*, 1983).

Para a incorporação do DCFH no interior das células, 5  $\mu\text{L}$  (concentração final 100  $\mu\text{M}$ ) da solução estoque foram adicionados aos poços da placa de 24 poços contendo as células em cultivo 3 horas após o tratamento com contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, como previamente descrito (BASS *et al.*, 1986). Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas, e o *pellet* de células foi processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde (FL1).

Figura 7 - Princípio do ensaio de oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), pelo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi fluorescente)



#### **4.5 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como mediana, percentil 25 e 75. Para as comparações estatísticas entre os grupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e, em seguida, a comparação entre os pares foi feita utilizando-se o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22.0.

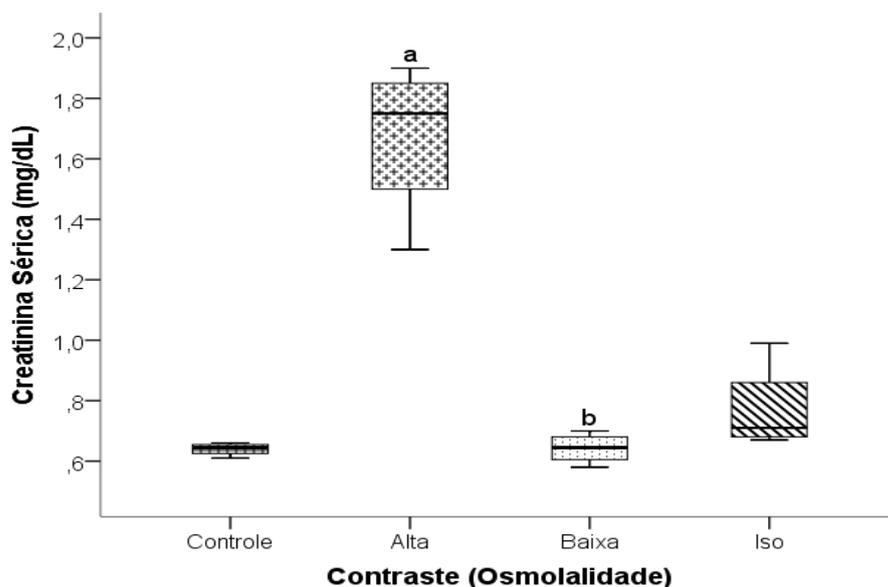
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise dos Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados com Contrastos Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas

Para avaliar os parâmetros bioquímicos, foram realizadas dosagens de creatinina sérica, *clearance* de creatinina, TFG, proteinúria, albuminúria, fração de excreção de sódio, fração de excreção de cloreto e fração de excreção de potássio em animais que receberam solução salina (n = 5), contraste de alta osmolalidade (n = 5), contraste de baixa osmolalidade (n = 5) e contraste isosmolar (n = 5). Essas dosagens foram realizadas 72 horas após a administração do contraste iodado e com os animais mantidos em gaiola metabólica.

Foi observado um aumento significativo de creatinina sérica no grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, quando comparado aos grupos controle e ao que recebeu contraste de baixa osmolalidade (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Creatinina sérica (mg/dL) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

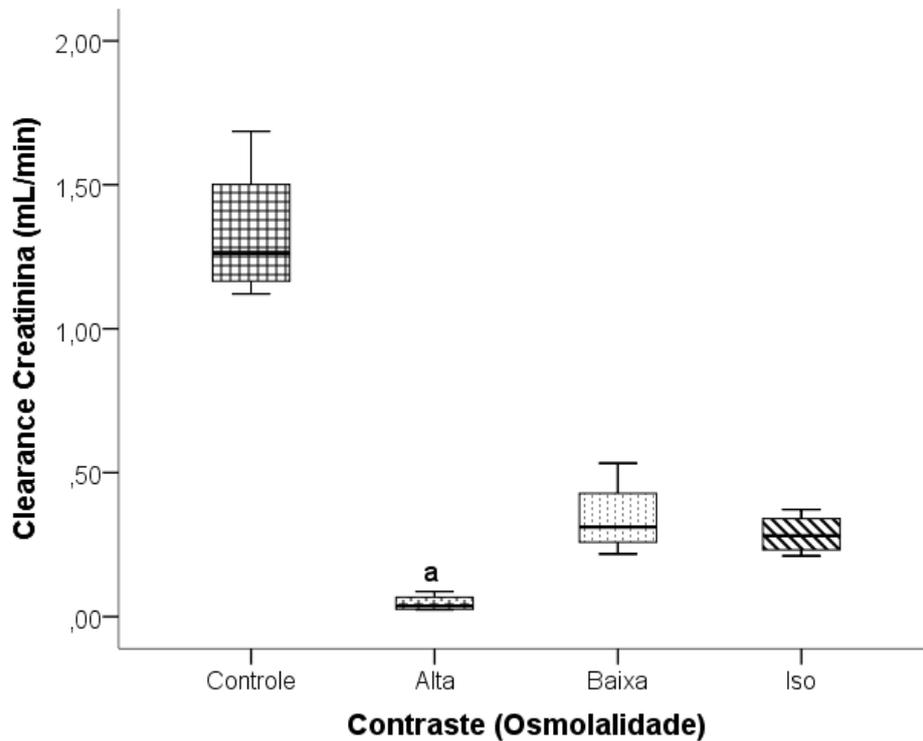
Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta

Ao avaliar a TFG, por meio do *clearance* de creatinina, foi verificada uma redução significativa no grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 2).

Gráfico 2 - *Clearance* de creatinina (mL/min) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo 72 horas



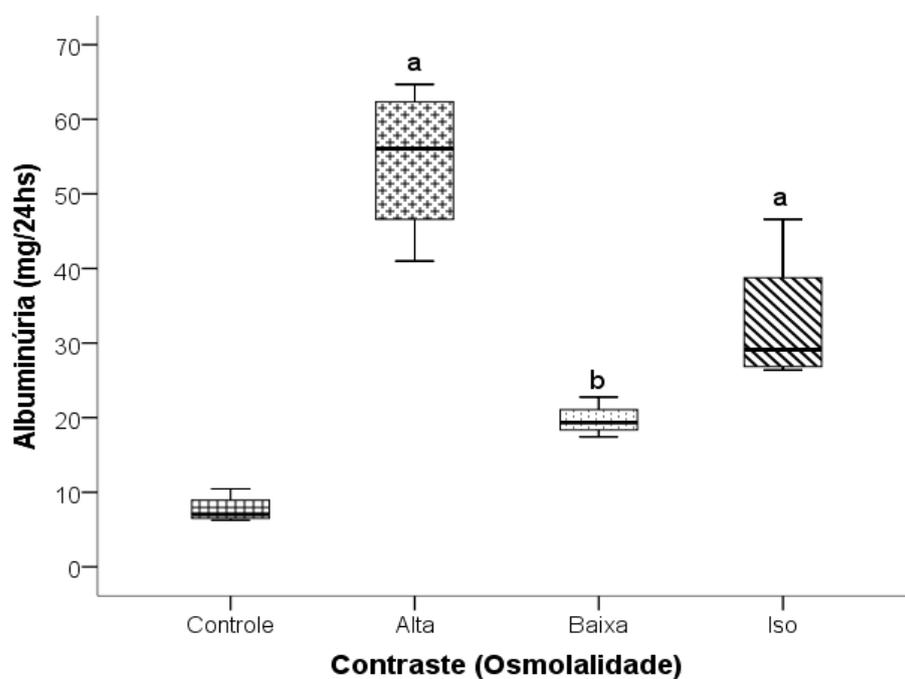
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

Avaliando os resultados da albuminúria, foi observado um aumento significativo nos grupos que receberam contraste de alta osmolalidade e isosmolar. Foi também observado um aumento da albuminúria no grupo de alta osmolalidade, quando comparado ao de baixa osmolalidade (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Albuminúria (mg/24 horas) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta

Analisando os níveis de proteinúria e as taxas de excreção de sódio, potássio e cloreto não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os três grupos que receberam contraste iodado (Tabela 2).

Tabela 2 - Proteinúria (mg/24 horas), fração de excreção de sódio (FE-Na<sup>+</sup>), fração de excreção de potássio (FE-K<sup>+</sup>) e fração de excreção de cloreto (FE-Cl<sup>-</sup>) no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas

	Controle		Alta		Baixa		Iso	
	Mediana (p25-p75)		Mediana (p25-p75)		Mediana (p25-p75)		Mediana (p25-p75)	
Proteinúria (mg/24hs)	96,26	(81,04-118,75)	99,62	(84,17-110,3)	93,40	(77,86-105,99)	100,92	(98,92-110,86)
FE-Na <sup>+</sup> (%)	0,32	(0,24-0,41)	0,32	(0,25-0,44)	0,38	(0,20-0,50)	0,49	(0,37-0,62)
FE-K <sup>+</sup> (%)	31,19	(30,62-33,43)	33,31	(30,86-34,75)	37,39	(32,69-40,35)	28,83	(26,69-32,14)
FE-Cl <sup>-</sup> (%)	0,87	(0,80-0,93)	0,94	(0,83-1,04)	0,97	(0,79-1,02)	1,03	(0,98-1,14)

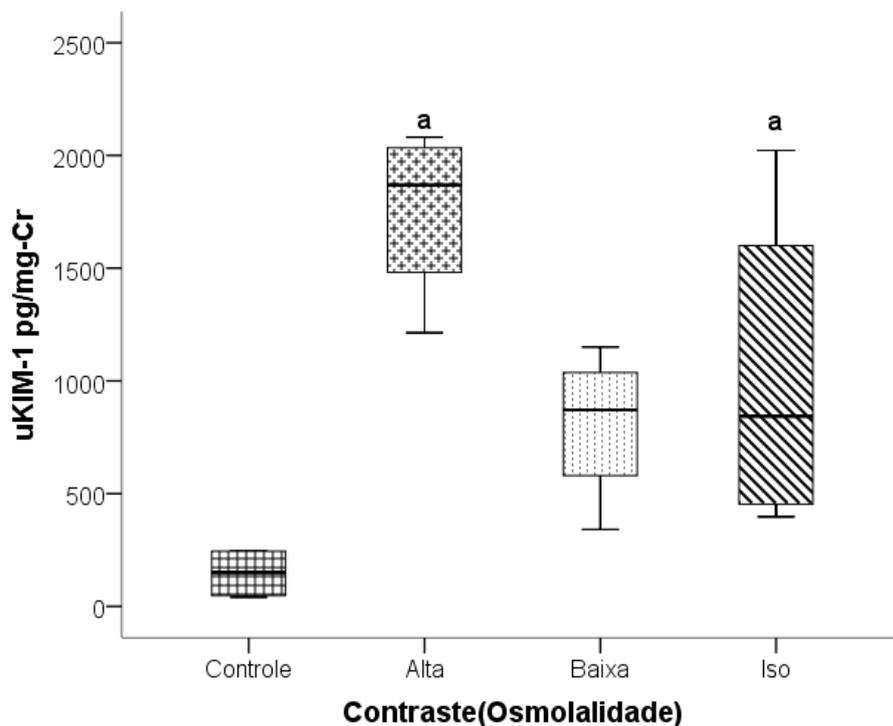
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: P25: percentil 25; P75: percentil 75.

## 5.2 Mensuração da Expressão de KIM-1 Urinário nos Animais Tratados com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas

Foi avaliada a expressão de KIM-1 urinário, pelo método ELISA, nos grupos tratados com contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, sendo observado aumento na expressão de KIM-1 nos grupos tratados com contraste de alta osmolalidade e isosmolar, quando comparados ao grupo controle (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Expressão de KIM-1 urinário no grupo controle (n = 5), e grupos tratados com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5), iobitridol (baixa osmolalidade) (n = 5) e iodixanol (isosmolar) (n = 5), na dose de 5mL/kg e tempo de 72 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:

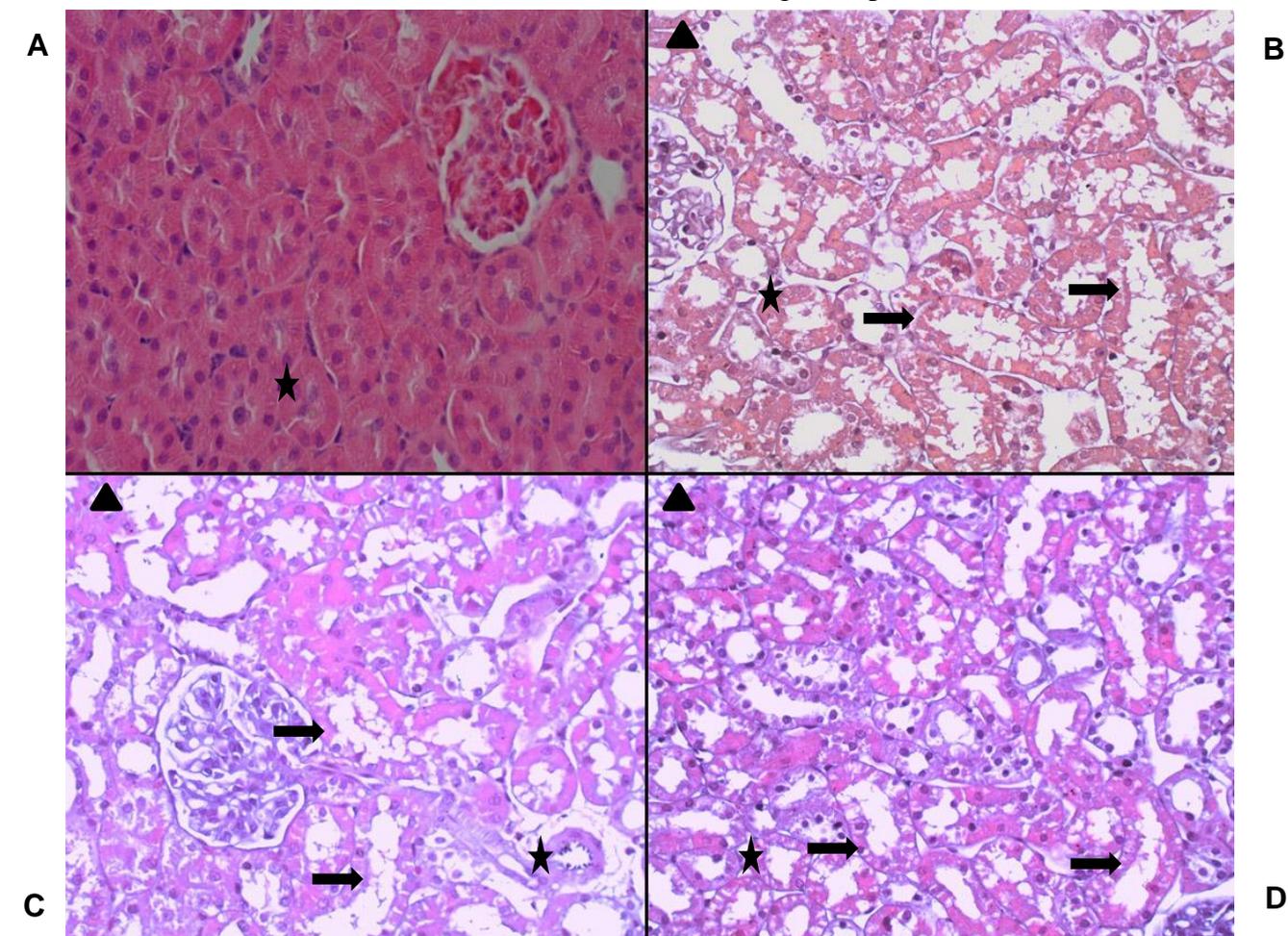
a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta

### 5.3 Análise Histológica dos Rins dos Animais Tratados com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas

Nas análises histológicas dos rins dos animais tratados com contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, foram evidenciadas alterações tubulares leves nos três grupos tratados. Nas demais estruturas, como glomérulo, interstício, arteríolas e outros vasos, não foram encontradas alterações histológicas (Figura 8).

Figura 8 - Prancha representativa da fotomicrografia dos rins dos animais do grupo controle, tratados com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), iobitridol (baixa osmolalidade) e iodixanol (isomolar), na dose de 5 mL/kg e tempo de 72 horas



Fonte: Elaborada pelo autor.

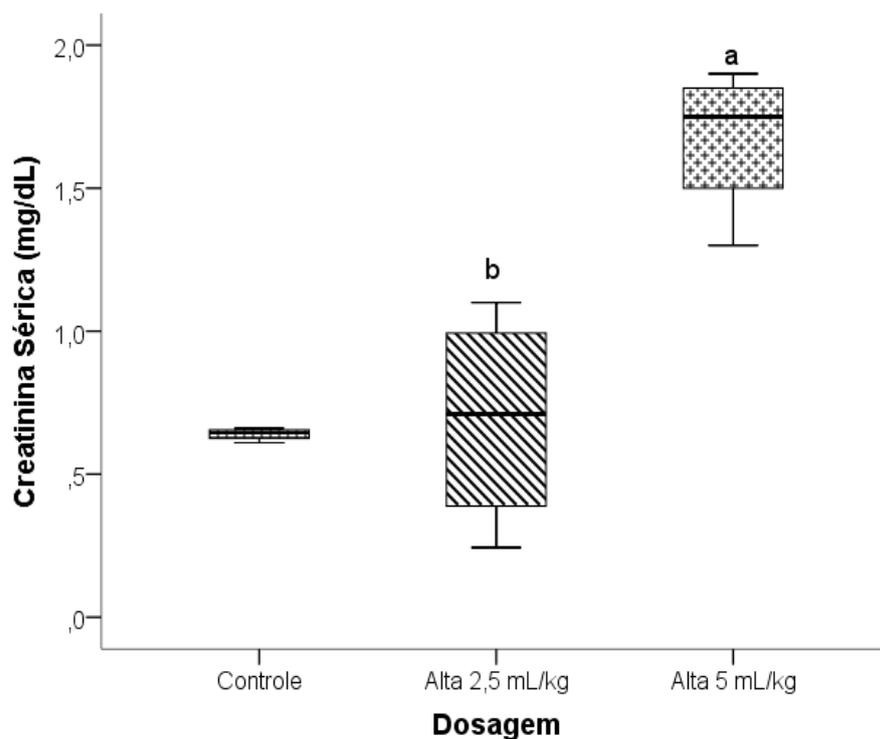
Legenda: (A) controle; (B) alta osmolalidade; (C) baixa osmolalidade; (D) isomolar. Coloração de hematoxilina-eosina, 400x. Microscópio Olympus VX 41®. Câmera Image planet 20 mpX®. Software Infinity capture.

- ★ Célula tubular proximal normal (circular, bordas regulares e lúmen livre).
- Célula tubular proximal com alteração (achatada, bordas irregulares, presença de *debris* no lúmen).
- ▲ Lâmina com alterações leves (até 1/3 das células tubulares proximais comprometidas).

#### 5.4 Análise Comparativa dos Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados com Contraste Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) nas Doses de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 horas

Os resultados encontrados nas dosagens de creatinina sérica do grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 2,5 mL/kg, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle. Quando comparados com o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 5 mL/kg, o grupo que recebeu maior dosagem apresentou aumento estatisticamente significativo (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Creatinina sérica (mg/dL) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5), no tempo de 72 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

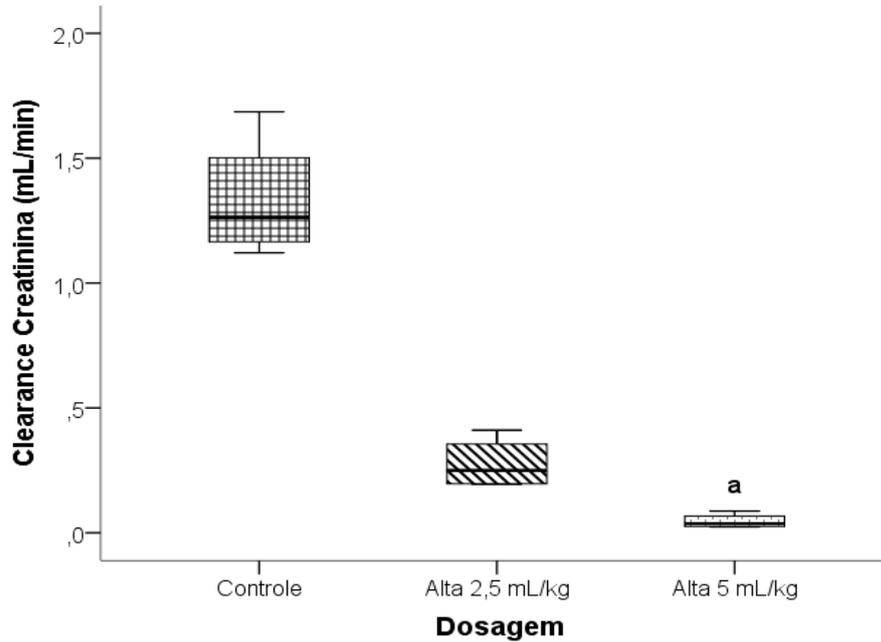
Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta 5 mL/kg

Os valores encontrados nas dosagens de *clearance* de creatinina do grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 2,5 mL/kg, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos do grupo controle e do grupo que recebeu a maior dosagem (Gráfico 6).

Gráfico 6 - *Clearance* de creatinina (mL/min) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5), no tempo de 72 horas



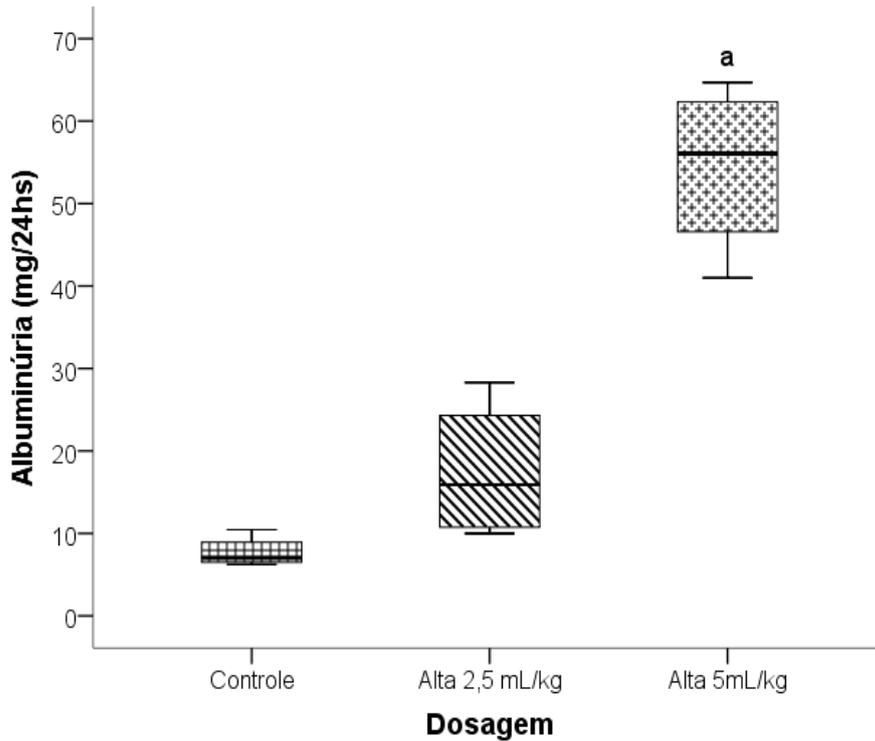
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

Na análise dos resultados da albuminúria, foi observado que o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 2,5 mL/kg, não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle e ao grupo que recebeu a maior dosagem (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Albuminúria (mg/24horas) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5) no tempo de 72 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

Foi observado, ao se analisarem os resultados encontrados para proteinúria, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos expostos ao contraste de alta osmolalidade nas dosagens de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e o grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Proteinúria (mg/24horas), fração de excreção de sódio (FE-Na<sup>+</sup>), fração de excreção de potássio (FE-K<sup>+</sup>) e fração de excreção de cloreto (FE-Cl<sup>-</sup>) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 2,5 mL/kg (n = 5) e 5 mL/kg (n = 5) no tempo de 72 horas

	Controle	Alta 2,5 mL/kg	Alta 5 mL/kg
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)
Proteinúria (mg/24hs)	96,26 (81,04-118,75)	95,60 (78,65-110,15)	99,62 (84,17-110,3)
FE-Na <sup>+</sup> (%)	0,32 (0,24-0,41)	0,38 (0,25-0,52)	0,32 (0,25-0,44)
FE-K <sup>+</sup> (%)	31,19 (30,62-33,43)	31,92 (27,62-38,22)	33,31 (30,86-34,75)
FE-Cl <sup>-</sup> (%)	0,87 (0,8-0,93)	0,91 (0,66-0,99)	0,94 (0,83-1,04)

Fonte: Elaborada pelo autor.

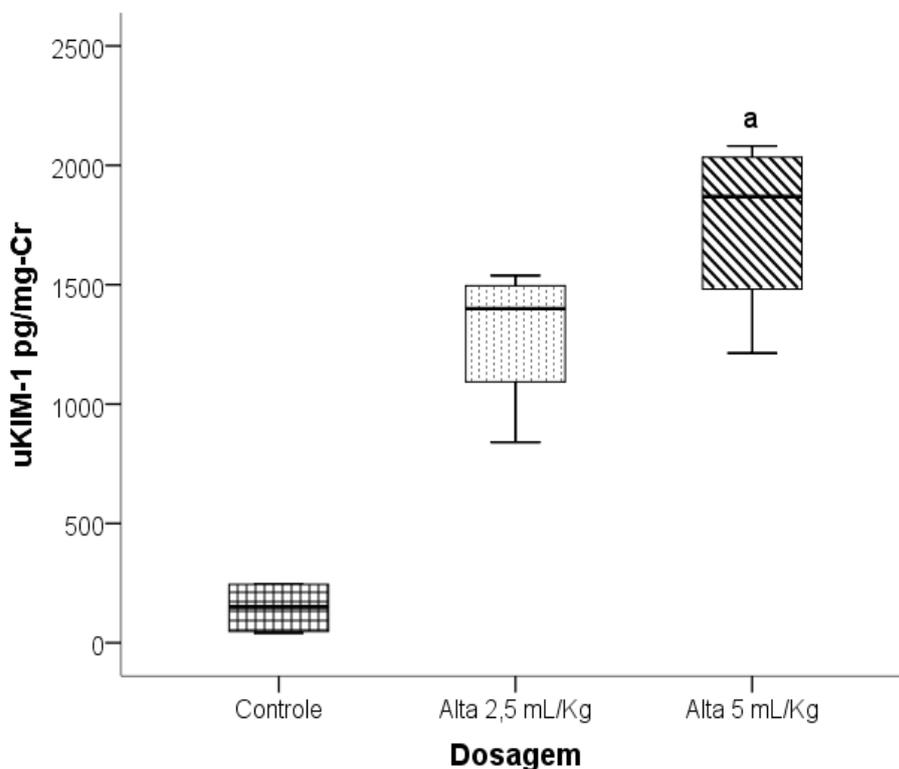
Legenda: P25: percentil 25; P75: percentil 75.

Na análise das taxas de excreção de sódio, potássio e cloreto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos expostos ao contraste de alta osmolalidade, nas dosagens de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e o grupo controle

### **5.5 Análise Comparativa da Expressão de KIM-1 Urinário nos Animais Tratados com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) nas Doses de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas**

A avaliação da expressão de KIM-1 urinário nos animais tratados com contraste de alta osmolalidade, na dose de 2,5 mL/kg, não mostrou aumento significante quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com a dose de 5 mL/kg (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Expressão de KIM-1 urinário no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas doses de 5 mL/kg (n = 5) e 2,5 mL/kg (n = 5) no tempo de 72 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

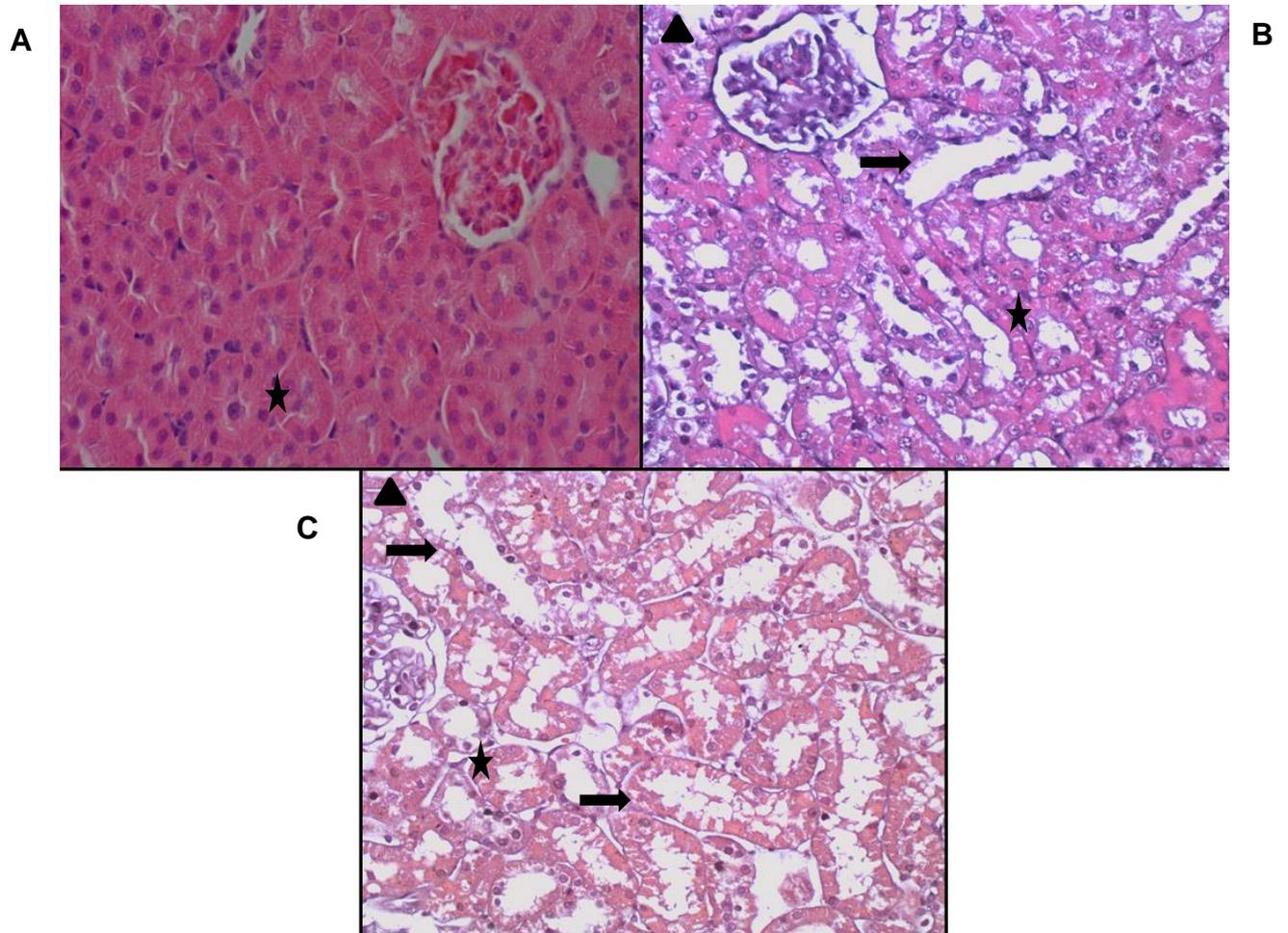
Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

### 5.6 Análise Comparativa das Alterações Histológicas dos Rins dos Animais Tratados com contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) nas Doses de 2,5 mL/kg e 5 mL/kg e Mantidos em Gaiola Metabólica por 72 Horas

Nas análises histológicas dos rins dos animais tratados com contraste de alta osmolalidade nas dosagens de 5 mL/kg e 2,5 mL/kg, foram evidenciadas alterações tubulares leves nos dois grupos tratados. Nas demais, como glomérulo, interstício, arteríolas e outros vasos, não foram encontradas alterações histológicas (Figura 9).

Figura 9 - Prancha representativa da fotomicrografia dos rins dos animais do grupo controle, tratados com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), nas dosagens de 5 mL/kg e 2,5 mL/kg, no tempo de 72 horas



Fonte: Elaborada pelo autor.

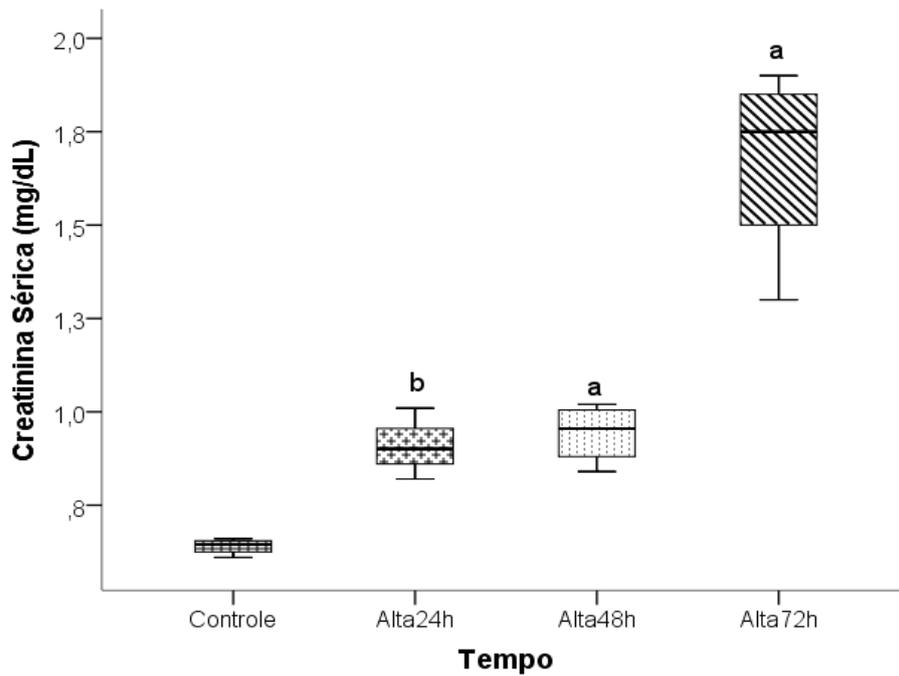
Legenda: (A) controle; (B) 2,5 mL/kg; (C) 5 mL/kg. Coloração de hematoxilina-eosina, 400x. Microscópio Olympus VX 41®. Câmera Image planet 20 mpx®. Software Infinity capture.

- ★ Célula tubular proximal normal (circular, bordas regulares e lúmen livre).
- Célula tubular proximal com alteração (achatada, bordas irregulares, presença de *debris* no lúmen).
- ▲ Lâmina com alterações leves (até 1/3 das células tubulares proximais comprometidas).

### 5.7 Análise Comparativa dos Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados com Contraste Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) na Dose de 5 mL/kg e Tempos de 24, 48 e 72 Horas Mantidos em Gaiola Metabólica

Na análise da creatinina sérica, foi evidenciado um aumento estatisticamente significativo nos tempos de 48 e 72 horas, quando comparado ao controle, e no tempo de 24 horas, quando comparados ao tempo de 72 horas (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Creatinina sérica (mg/dL) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)



Fonte: Elaborado pelo autor.

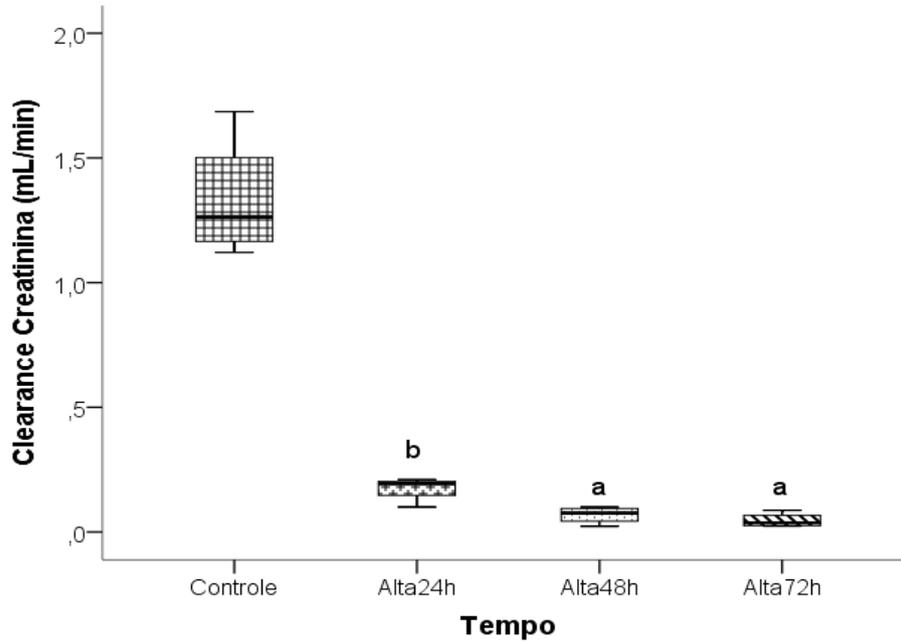
Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta 72h

Em relação ao *clearance* de creatinina, foi observada redução estatisticamente significativa nos tempos de 48 e 72 horas, quando comparada à do grupo controle, e no tempo de 24 horas, em relação ao tempo de 72 horas (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Clearance de creatinina (mL/min) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)



Fonte: Elaborado pelo autor.

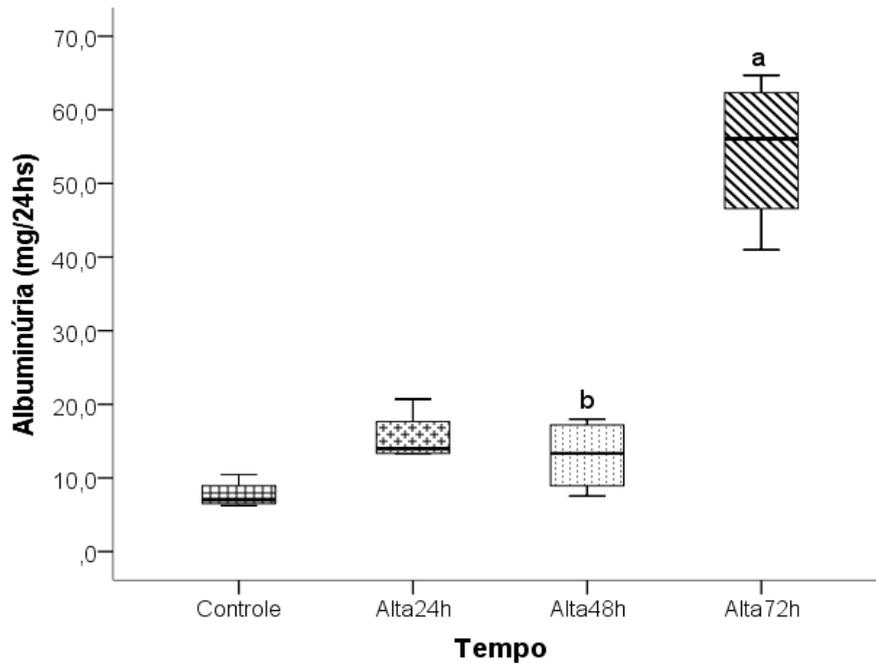
Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta 72h

Na análise das dosagens de albuminúria, foi evidenciado um aumento no grupo avaliado com 72 horas, quando comparado aos grupos controle e de 48 horas (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Albuminúria (mg/24 horas) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta 72h

A proteinúria e as taxas de excreção de sódio, potássio e cloreto não alteraram nos três tempos avaliados, quando comparados ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Proteinúria (mg/24 horas), fração de excreção de sódio (FE-Na<sup>+</sup>), fração de excreção de potássio (FE-K<sup>+</sup>) e fração de excreção de cloreto (FE-Cl<sup>-</sup>) no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)

	Controle	Alta 24h	Alta 48h	Alta 72h
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)
Proteinúria (mg/24hs)	99,90 (81,04-118,75)	107,30 (99,05-115,56)	94,15 (87,04-101,26)	97,23 (84,17-110,3)
FE-Na <sup>+</sup> (%)	0,32 (0,24-0,41)	0,37 (0,28-0,47)	0,36 (0,32-0,41)	0,35 (0,25-0,44)
FE-K <sup>+</sup> (%)	32,03 (30,62-33,43)	33,02 (29,88-36,15)	33,94 (30,97-36,91)	32,81 (30,86-34,75)
FE-Cl <sup>-</sup> (%)	0,86 (0,8-0,93)	0,94 (0,89-1,00)	0,97 (0,94-0,99)	0,94 (0,83-1,04)

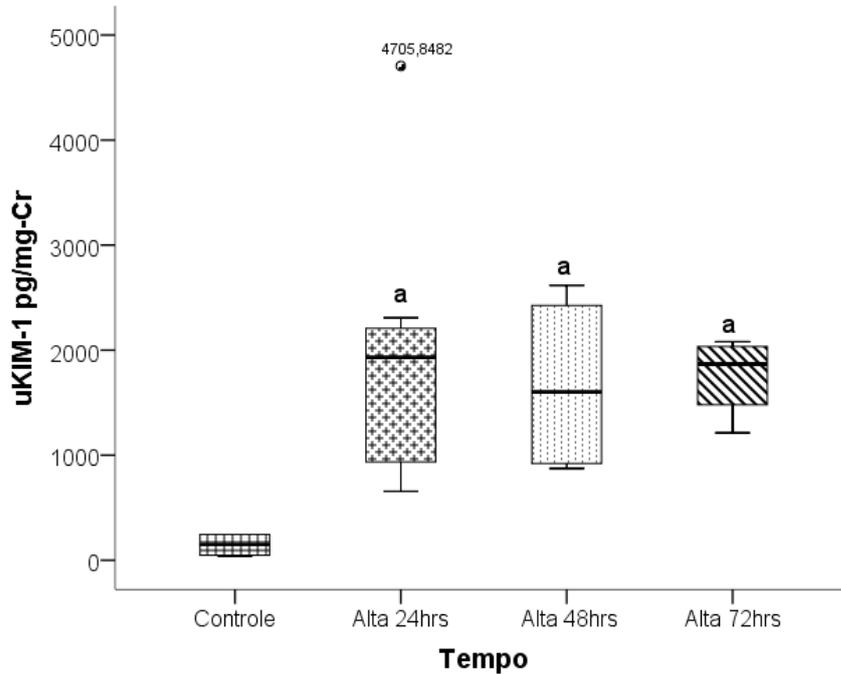
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: P25: percentil 25; P75: percentil 75.

### **5.8 Análise Comparativa da Expressão de KIM-1 Urinário nos Animais Tratados com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) Na Dose de 5 ml/Kg e Tempos de 24, 48 e 72 Horas Mantidos em Gaiola Metabólica**

Foi observado um aumento estatisticamente significativo nos três grupos tratados com contraste de alta osmolalidade e avaliados nos tempos de 24, 48 e 72 horas, quando comparados ao controle (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Expressão de KIM-1 urinário no grupo controle (n = 5), e grupo tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dose de 5 mL/kg e tempos de 24 horas (n = 5), 48 horas (n = 5) e 72 horas (n = 5)



Fonte: Elaborado pelo autor.

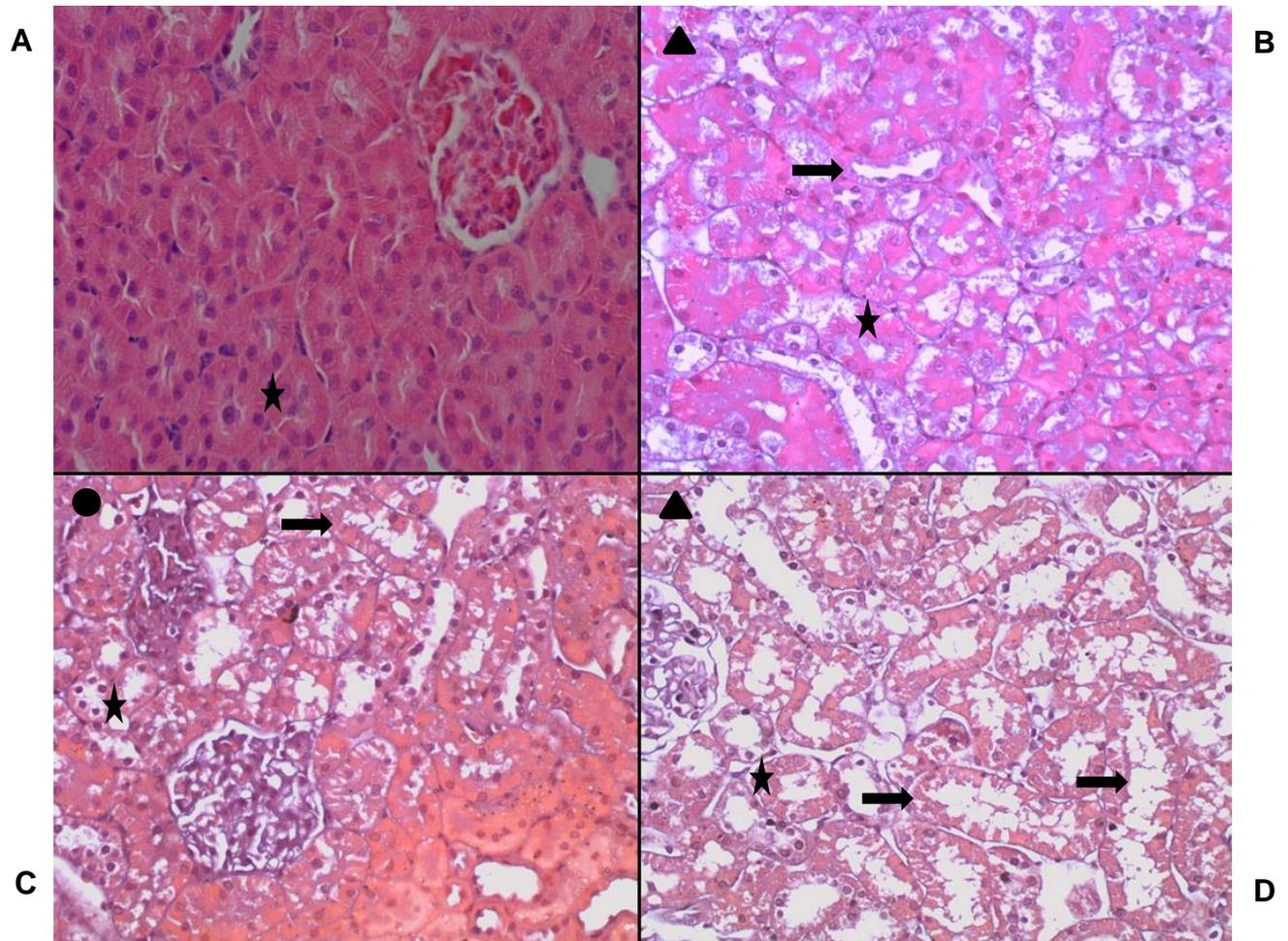
Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

### 5.9 Análise Histológica dos Rins dos Animais Tratados com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade) na Dose de 5 mL/kg e Tempos de 24, 48 e 72 Horas Mantidos em Gaiola Metabólica

Nas análises histológicas dos rins dos animais tratados com contraste de alta osmolalidade na dosagem de 5 mL/kg e tempos de 24, 48 e 72 horas foram evidenciadas alterações tubulares leves nos tempos de 24 e 72 horas e moderadas no tempo de 48 horas. Nas demais estruturas como glomérulo, interstício, arteríolas e outros vasos não foram encontradas alterações histológicas (Figura 10).

Figura 10 - Prancha representativa da fotomicrografia dos rins dos animais do grupo controle, tratados com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), na dosagem de 5 mL/kg e tempos de 24, 48 e 72 horas



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Legenda:** (A) controle; (B) 24 horas; (C) 48 horas; (D) 72 horas. Coloração de hematoxilina-eosina, 400x. Microscópio Olympus VX 41®. Câmera Image planet 20 mpx®. Software Infinity capture.

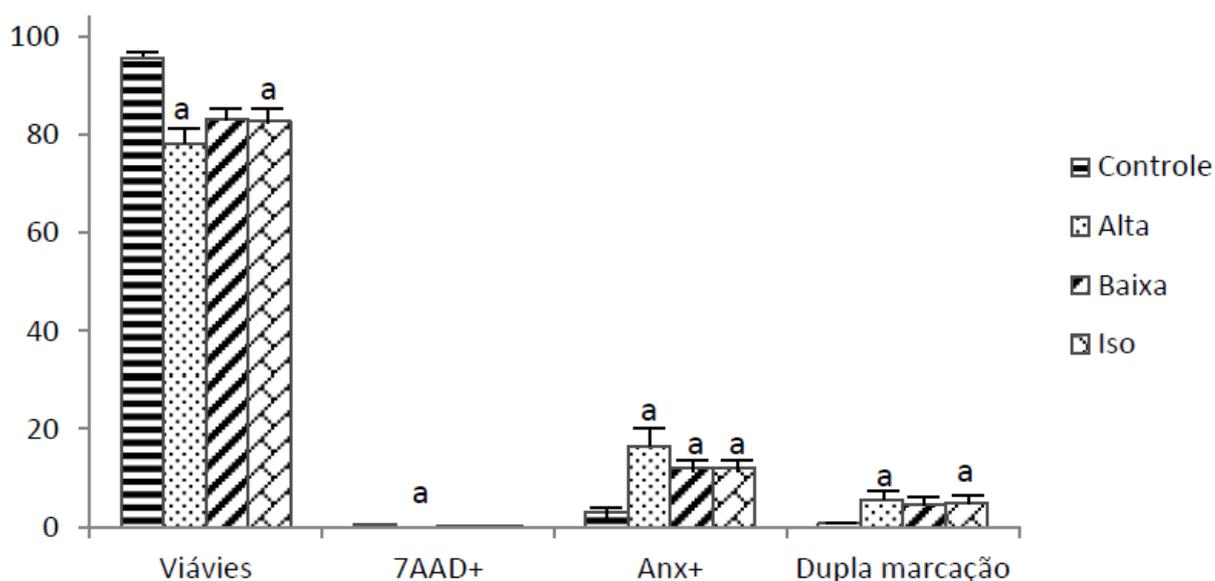
- ★ Célula tubular proximal normal (circular, bordas regulares e lúmen livre).
- Célula tubular proximal com alteração (achatada, bordas irregulares, presença de *debris* no lúmen).
- ▲ Lâmina com alterações leves (até 1/3 das células tubulares proximais comprometidas).
- Lâmina com alterações moderadas (de 1/3 a 2/3 das células tubulares proximais comprometidas).

### 5.10 Avaliação do Tipo de Morte Celular Induzida pelos Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar)

### em Cultura de Células Tubulares Renais Proximais LLC-MK2 na Concentração de 15 mgI/mL, por 24 Horas

Foi evidenciada citotoxicidade em células tubulares renais LLC- MK2, com os contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, na concentração de 15 mgI/mL. Nos ensaios em citometria de fluxo, observou-se maior concentração de células marcadas com anexina V, demonstrando que um grande número de células encontrava-se na fase inicial da apoptose (Gráfico 13 e Figura 11).

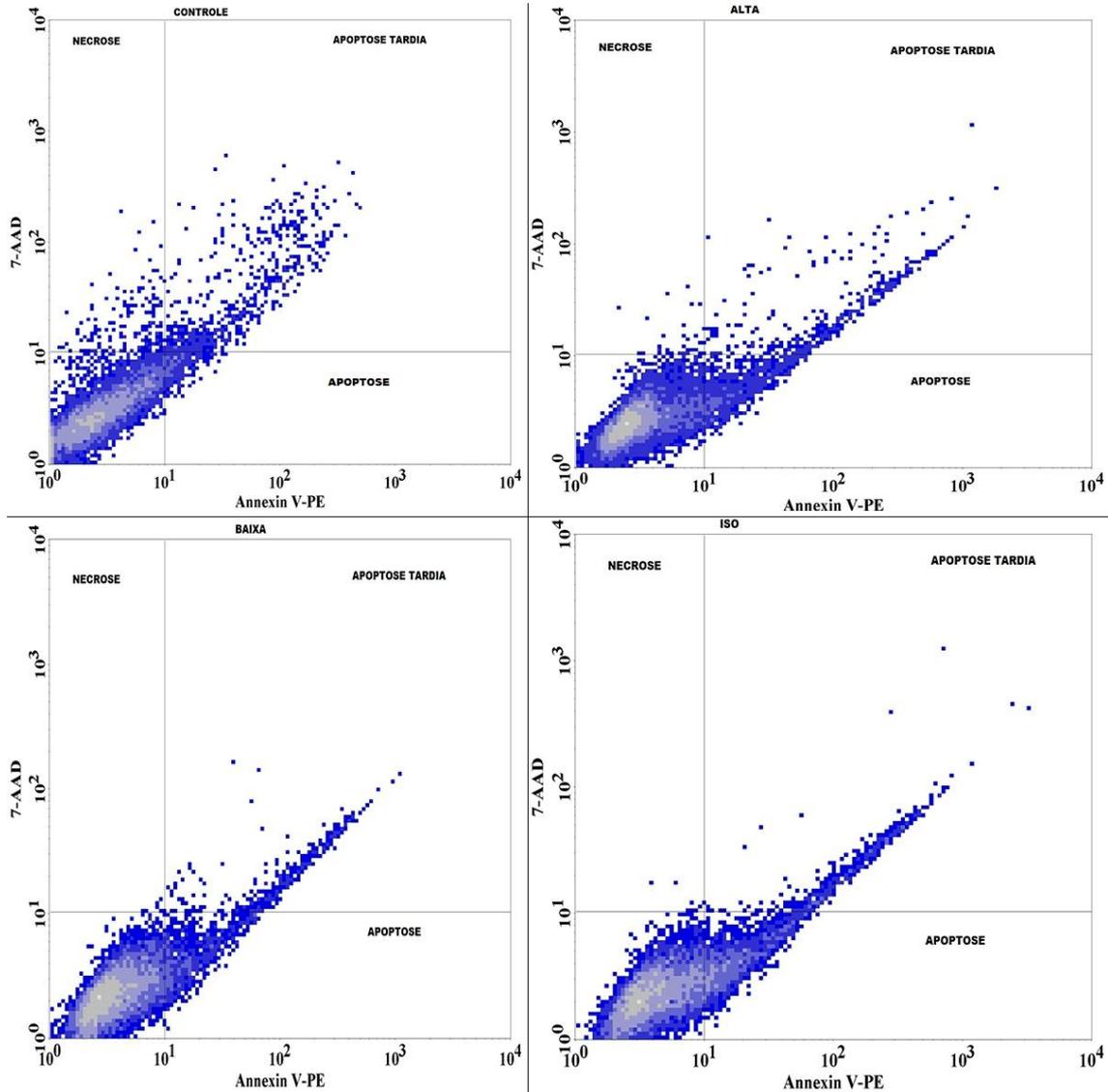
Gráfico 13 - Análise do tipo de morte celular induzida pelos contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar em cultura de células LLC-MK2 na concentração de 15 mgI/mL, por 24 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Viáveis: células vivas; 7-AAD+: necrose; Ax+: apoptose; dupla marcação: apoptose tardia; a:  $p < 0,05$  vs. Controle

Figura 11 – *Dot plot* das citometrias com células tubulares renais LLC- MK2



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.11 Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial em Células LLC-MK2 com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 15 mgI/mL

Na análise do potencial transmembrânico mitocondrial, não foram evidenciadas alterações significativas entres os grupo controle e os três grupos tratados com contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar (Tabela 5)

Tabela 5 - Efeito dos contrastes sobre o potencial de membrana mitocondrial em cultura de células tratadas com os contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), iobitridol (baixa osmolalidade) e iodixanol (isosmolar), na dose de 15 mgI/mL

	Controle	Alta	Baixa	Iso
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)
Intensidade de fluorescência	1,02 (0,97-1,15)	1,07 (1,02-1,13)	0,99 (0,89-1,09)	0,93 (0,83-1,09)

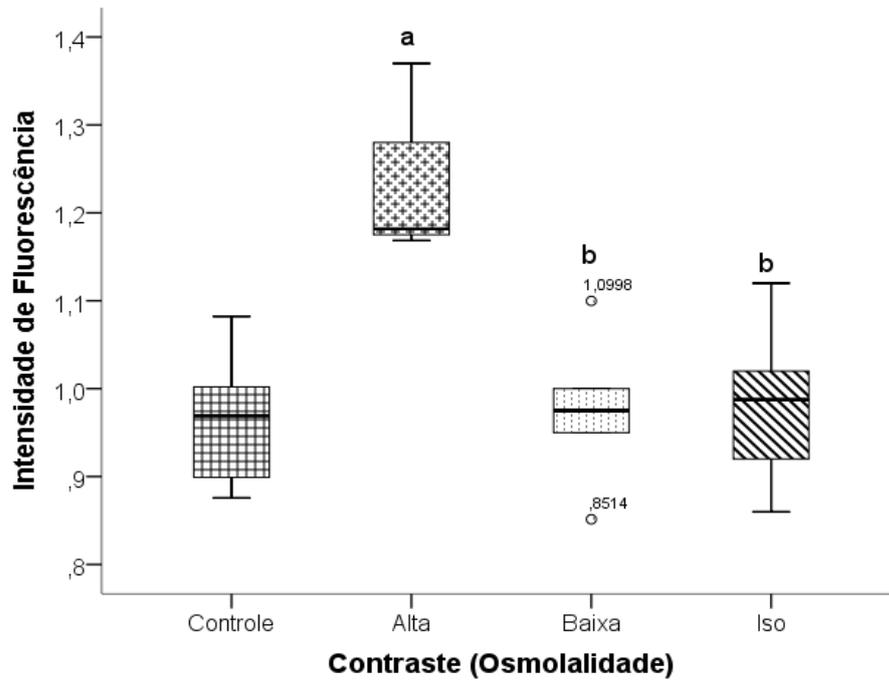
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: P25: percentil 25; P75: percentil 75.

### **5.12 Análise das Espécies Reativas de Oxigênio em Células LLC-MK2 com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar) na Dose de 15 mgI/mL**

Na análise do DCF, foram observadas alterações significativas no grupo de células tratadas com contraste de alta osmolalidade, quando comparado aos grupos controle e naqueles tratados com baixa osmolalidade e isosmolar (Gráfico 14 e Figura 12).

Gráfico 14 - Produção de espécies reativas de oxigênio em cultura de células tratadas com contrastes ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), iobitridol (baixa osmolalidade) e iodixanol (isosmolar), na dose de 15 mgI/mL



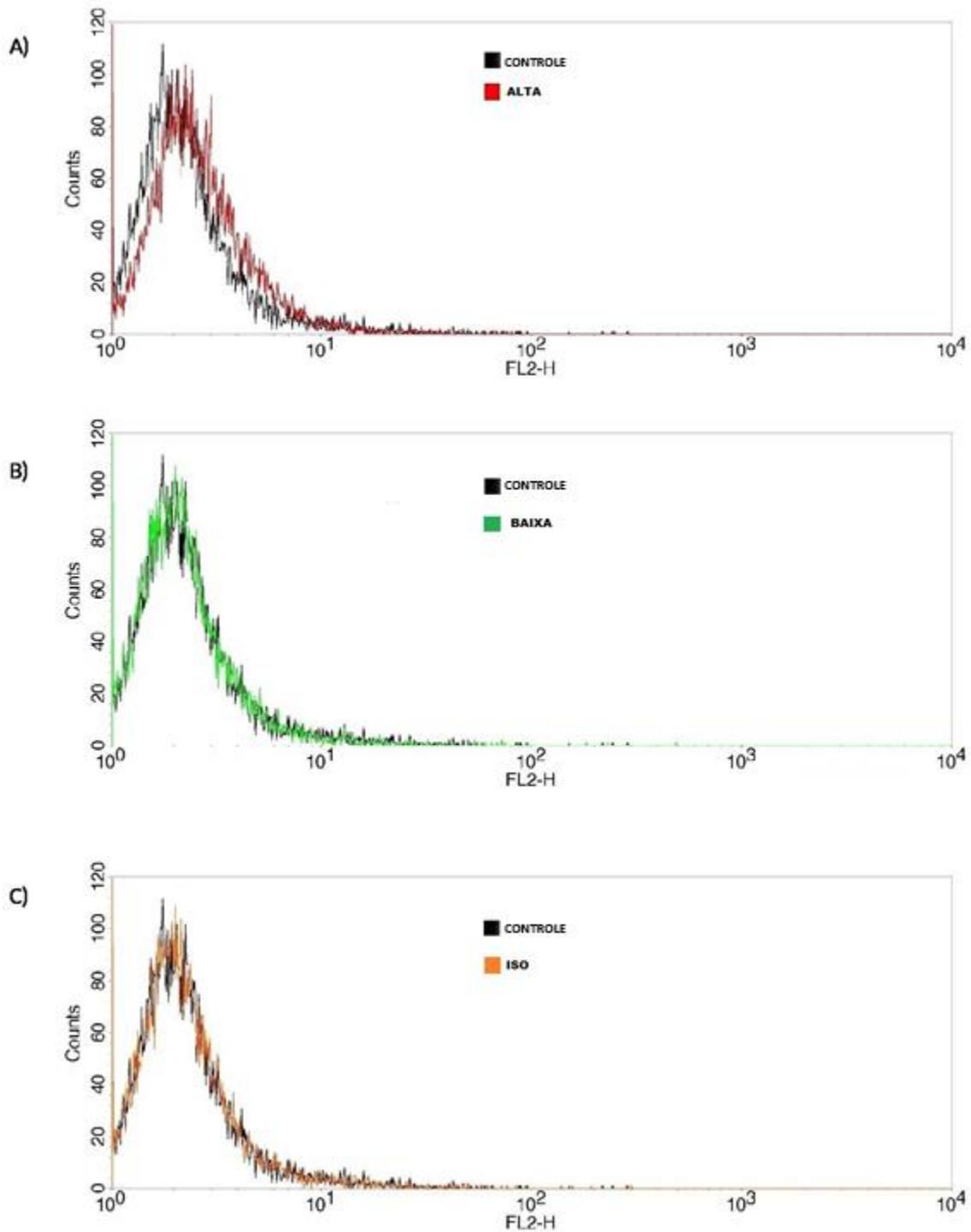
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:

a:  $p < 0,05$  vs. Controle

b:  $p < 0,05$  vs. Alta

Figura 12 - Histograma representativo da formação de espécies reativas de oxigênio pela técnica de diacetato de diclorofluoresceína



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (A) alta osmolalidade; (B) baixa osmolalidade; (C) isosmolar.

### **5.13 Análise do KIM-1 no Sobrenadante de Células LLC-MK2 Tratadas com Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (Alta Osmolalidade), Iobitridol (Baixa Osmolalidade) e Iodixanol (Isosmolar), na Dose de 15 MgI/mL.**

A liberação da molécula de KIM-1 foi detectada apenas no sobrenadante das células tratadas com contraste de alta osmolalidade. Nos sobrenadantes das células tratadas com contraste de baixa osmolalidade e isosmolar, a molécula de KIM-1 não foi detectada, sugerindo que essas células não tiveram lesão para liberar KIM-1.

## 6 DISCUSSÃO

A NIC é uma séria, mas subdiagnosticada, complicação apresentada pelos pacientes que necessitam utilizar contraste iodado. Isto ocorre durante a realização de procedimentos diagnósticos ou terapêuticos em diversas especialidades. A utilização de contraste em procedimentos está em crescimento contínuo e, conseqüentemente, aumenta o número de pacientes expostos ao contraste iodado, resultando no aumento da incidência de NIC (MICHAEL *et al.*, 2014).

Estudos sobre NIC são frequentemente realizados, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa patologia e proporcionar uma maior segurança na utilização do contraste na prática clínica. Neste estudo, foram realizados ensaios *in vivo* e *in vitro*, buscando um melhor entendimento sobre a NIC.

Durante a análise dos achados *in vivo*, foram avaliados os parâmetros bioquímicos dos animais tratados com meio de contraste iodado, por via IV, na dose de 5 mL/kg e, em seguida, esses animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 72 horas. Níveis de creatinina sérica, *clearance* de creatinina, albuminúria, proteinúria e eletrólitos foram analisados e comparados entre os grupos controle, alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar.

Foi feita a opção por trabalhar com a dose de 5 mL/kg, tomando por base a literatura que recomenda como dose máxima 5 mL/kg divididos pelo valor da creatinina sérica (BRIGUORI; TAVANO; COLOMBO, 2003; EBISAWA *et al.*, 2016), que, por sua vez, varia entre 0,6 e 1,3 mg/dL, quando normal. Considerando o valor de 1,0 como a média dos extremos do valor normal da creatinina, optou-se por trabalhar com essa dose.

Alguns estudos consideram que um volume de contraste maior que 100 mL está associado com o aumento do risco de NIC (WONG *et al.*, 2012). Inicialmente, foi escolhido o tempo de 72 horas relacionando aos achados na literatura que mencionam o aparecimento da NIC, por meio de alterações na creatinina sérica, entre 48 e 72 horas após a administração do meio de contraste (EBISAWA *et al.*, 2016; INDA FILHO *et al.*, 2014; NICOLA *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi observado um aumento significativo da creatinina sérica do grupo que utilizou contraste de alta osmolalidade, quando comparado ao grupo controle e ao grupo baixa osmolalidade, além de uma redução do *clearance* de creatinina do grupo que utilizou contraste de alta osmolalidade, quando comparado ao grupo controle.

A definição de NIC mais frequentemente encontrada na literatura é o aumento absoluto na creatinina  $> 0,5$  mg/dL ou o aumento relativo de 25% no período entre 48 a 72 horas após a administração do meio de contraste iodado, atingindo seu pico entre 3 a 5 dias, e retornando aos seus níveis basais entre 7 a 10 dias (NICOLA *et al.*, 2015; WONG, *at al*, 2012). O desenvolvimento da NIC relaciona-se diretamente com algumas propriedades do meio de contraste, como viscosidade e osmolalidade (WU *et al.*, 2013). Metanálise que incluiu 25 estudos compara os contrastes de alta e baixa osmolalidade quanto ao desenvolvimento da NIC e sugere que, geralmente, o contraste de alta osmolalidade é mais nefrotóxico que o de baixa osmolalidade (WONG *et al.*, 2012).

A dosagem da creatinina sérica não é considerada um biomarcador ideal, por ser uma substância secretada e reabsorvida pelo próprio organismo. Alterações nos níveis de creatinina sérica podem ser reflexos da excreção e/ou reabsorção, sem alterações na filtração glomerular (SOLOMON, 2014). Atualmente, considera-se a creatinina sérica como um biomarcador de disfunção renal, amplamente utilizado na prática clínica, provavelmente por seu fácil acesso e baixo custo.

O *clearance* de creatinina, que estima a TFG, mostra-se severamente comprometido, antes do aumento da creatinina sérica. Isto ocorre devido à creatinina se distribuir em todo o líquido corporal, resultando em aumento lento dos níveis séricos (SOLOMON, 2014).

É conhecido que a ativação do *feedback* tubuloglomerular pode ser responsável pela NIC. A alta osmolalidade do contraste causa diurese e natriurese, que estimulam a mácula densa a liberar adenosina, para ativar os receptores A1 da adenosina, resultando na vasoconstrição da arteríola aferente do glomérulo e também do leito vascular da medula, resultando na redução da TFG (WONG *et al.*, 2012).

Neste estudo, foi observado o aumento da albuminúria nos grupos que utilizaram contraste de alta osmolalidade e isosmolar, quando comparados ao grupo controle. Foi também observado um aumento da albuminúria no grupo de alta osmolalidade quando comparado ao de baixa osmolalidade. Com relação à proteinúria, não foi observado aumento significativo em nenhum dos grupos de intervenção, quando comparado ao controle.

O glomérulo produz a primeira urina por filtração sanguínea e retém as proteínas com peso molecular maior que 60 kd, incluindo a maior parte da albumina sérica, pois possui peso molecular de 67 kd. A maioria das proteínas, com peso molecular menor que 60 kd, atravessa livremente a membrana basal do glomérulo e é ativamente reabsorvida pelo sistema tubular.

Albuminúria é definida como eliminação urinária de mais de 30 mg de albumina em 24 horas, sendo considerada um bom preditor de progressão para o estágio final da insuficiência renal disponível na prática clínica, e estando, em alguns pacientes, presente mesmo sem redução da TFG (GORRIZ; MARTINEZ-CASTELAO, 2012; HAMIDEH *et al.*, 2014). Estudo de Komenda, Rigato e Tangri (2014) sugere que TFG e albuminúria são preditores essenciais para risco de insuficiência renal.

Historicamente, os níveis de proteinúria eram considerados fora da normalidade, quando seus valores eram maiores que 150 mg por dia. Não existe uma descrição universal de um valor de proteinúria normal, e fatores como idade devem ser levados em consideração. Atualmente, é consensual que a proteinúria não apresenta importantes alterações na lesão renal aguda, sendo um importante marcador de progressão de doença renal crônica. Por outro lado, a albuminúria encontra-se particularmente elevada nas lesões renais agudas (GORRIZ; MARTINEZ-CASTELAO, 2012).

No presente estudo, foram utilizados três tipos de contrastes com características diferentes, o ioxitalamato de meglumina, meio de contraste de alta osmolalidade que possui uma osmolalidade de 2.160 mOsm/kg de água e uma viscosidade de 7,5 cP a 37°C (TELEBRIX, 2013); o iobitridol, de baixa osmolalidade, que possui uma osmolalidade de 915 mOsm/kg de água e uma viscosidade de 10,0 cP a 37°C (HENETIX, 2013); e o iodixanol, isosmolar, que possui uma osmolalidade de 290 mOsm/kg de água e viscosidade de 11,8 cP a 37°C (VISIPAQUE, 2015).

Fatores como alta osmolalidade dos meios de contraste e alta viscosidade podem estar envolvidos na diminuição do ritmo de filtração glomerular e no aumento da albuminúria encontrados nos resultados do presente estudo, quando comparamos os três tipos de contraste em estudo.

As taxas de excreção de sódio, potássio e cloro foram avaliadas nos três grupos em estudo, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle.

Nesse estudo, foi avaliado como novo biomarcador renal o KIM-1 urinário, que é específico para injúria tubular proximal. No Brasil, ele ainda não é utilizado na clínica. Uma de suas vantagens é sua característica de ser liberado unicamente pelos rins. O KIM-1 foi avaliado em diversos contextos clínicos, apresentando-se elevado em até 48 horas antes de qualquer alteração clínica se manifestar. Os biomarcadores comumente utilizados na prática médica,

como a creatinina sérica, a TFG e a proteinúria, não são sensíveis o suficiente para detecção precoce de um comprometimento renal, por se mostrarem alterados tardiamente, limitando a aplicação de intervenções valiosas (LUO *et al.*, 2014; WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015).

Um dos parâmetros que foi avaliado nos estudos *in vivo* foi a expressão de KIM-1 no túbulo proximal por meio da quantificação do KIM-1 urinário nos animais que receberam contraste iodado. Foi encontrado um aumento estatisticamente significativo na expressão deste biomarcador na urina dos animais que receberam 5 mL/kg de contraste de alta osmolalidade e isosmolar, quando comparados ao grupo controle. Isso sugeriu lesão tubular proximal no grupo de alta osmolalidade e isosmolar. O KIM-1 não é apenas um bom indicador biológico de LRA, mas também age como uma molécula funcional que participa do processo de reparo do dano tubular renal (LI *et al.*, 2015).

A viscosidade é outro parâmetro que pode reduzir o fluxo sanguíneo medular renal, em decorrência da vasculatura medular renal e dos vasos retos serem compostos por longos vasos de pequeno diâmetro. O fluxo sanguíneo nessa região é facilitado pela manutenção da baixa viscosidade, que pode ser alterado pela presença do meio de contraste. O aumento da viscosidade pode também aumentar a pressão tubular intersticial, levando à redução do fluxo sanguíneo medular (RUDNICK, 2015). Os meios de contraste são agentes extremamente viscosos, e o contraste isosmolar possui uma maior viscosidade quando comparado aos demais. Como consequência da alta viscosidade, a filtração glomerular torna-se mais difícil, reduzindo a diurese e aparecendo em altas concentrações nos túbulos. Consequentemente, ocorrerá um aumento da pressão intra-tubular e redução no fluxo sanguíneo renal e pressão de oxigênio (LISS *et al.*, 1998).

Diante dos resultados encontrados com o contraste de alta osmolalidade e os achados na literatura relacionados às doses seguras de contraste na vivência clínica, decidimos ampliar nosso estudo e analisar uma dosagem menor de contraste, que equivale à metade da dosagem inicialmente utilizada. Outro parâmetro que foi também analisado, para ampliar a avaliação, foi o tempo de indução da nefrotoxicidade, buscando detectar precocemente alterações de marcadores renais.

Com base nessas informações, foi feita a opção por administrar uma dose de 2,5 mL/kg, metade da dose utilizada anteriormente, e manter os animais por 72 horas na gaiola metabólica, seguindo o protocolo inicial.

Ao se analisarem os resultados encontrados nas dosagens de creatinina sérica do grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 2,5 mL/kg, não foi observada diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo controle. Quando comparado com o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 5 mL/kg, o grupo que recebeu maior dosagem apresentou um aumento estatisticamente significativo.

A variação do *clearance* de creatinina do grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 2,5 mL/kg, não mostrou diferença estatisticamente significativa, quando comparada à do grupo controle e do grupo que recebeu a maior dosagem.

Na análise dos resultados da albuminúria, foi observado que o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 2,5 mL/kg, não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle e ao grupo que recebeu a maior dosagem.

Na análise da proteinúria, foram comparados o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade na dose de 5 mL/kg e o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade na dose de 2,5 mL/kg, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Na análise da fração de excreção de sódio, potássio e cloro, foi comparado o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade na dose de 5 mL/kg com o grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade na dose de 2,5 mL/kg, sem ter sido evidenciada alteração estatisticamente significativa.

O volume de contraste é um importante fator de risco modificável para NIC, e a redução do volume de contraste utilizado parece ser uma estratégia fundamental para prevenir a NIC. Estudos investigaram a hidratação e a intervenção farmacêutica para prevenir NIC. Os achados mostraram que essas medidas são insuficientes (EBISAWA, 2016; INDA FILHO *et al.*, 2014; YASUDA; SUZUKI; ISHII, 2014). Poucos estudos têm investigado um volume seguro para administração de meio de contraste em pacientes com função renal normal e faz-se necessária a determinação desse volume, especialmente para os idosos. Estudo de Liu, Y. e colaboradores (2015) mostrou que pacientes com função renal normal, antes da administração de contraste, podem desenvolver NIC com resultados clínicos semelhantes aos dos pacientes com IRC.

Analisando os resultados encontrados, com o auxílio das informações disponíveis na literatura, pode-se sugerir que a administração de um menor volume de contraste iodado mostra-se mais segura para utilização na clínica. Esses achados reforçam a importância de se desenvolverem novos estudos que busquem um limite mínimo de dose segura e efetiva de

contrastes iodados, para pacientes com função renal normal. O investimento em estudos com este objetivo pode se mostrar mais vantajoso do que a pesquisa de drogas para prevenção da NIC.

No presente estudo, as análises da expressão do KIM-1 urinário dos animais que receberam a dose de 2,5 mL/kg de contraste de alta osmolalidade não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle e ao grupo que recebeu a maior dosagem.

Inicialmente, foi avaliado apenas o tempo de 72 horas, com base nos achados relacionados aos marcadores clássicos, como creatinina, TFG e albuminúria. Buscando identificar alterações de biomarcadores em um tempo mais precoce, foram avaliados os animais que receberam contraste de alta osmolalidade nos tempos de 24, 48, 72 horas, os quais foram comparados entre si e com o grupo controle. Na análise da creatinina sérica, observa-se um aumento estatisticamente significativo nos tempos de 48 e 72 horas, quando comparado ao controle, e o tempo de 24 horas, quando comparado ao grupo de 72 horas. Com relação ao *clearance* de creatinina, evidencia-se uma redução estatisticamente significativa nos tempos 48 e 72 horas, quando comparada à do grupo controle, e o tempo de 24 horas, em relação ao tempo de 72 horas.

O diagnóstico precoce da LRA é crítico para prevenção de complicações, possibilitando que seja oferecida uma intervenção precoce e, conseqüentemente, melhorando o prognóstico. Importantes biomarcadores renais estão surgindo para permitir a realização de diagnósticos mais precisos, prever resultados e estratificar riscos. A utilização apenas dos biomarcadores clássicos pode levar a tomadas de decisões inadequadas, afetando os resultados (LI *et al.*, 2015; WASUNG; CHAWLAB; MADERO, 2015).

Alguns estudos em diversos contextos clínicos utilizam a mensuração do KIM-1 para diagnóstico precoce de LRA. Lahoud *et al.* (2015) utilizaram este biomarcador para diagnóstico precoce de LRA, no pós-operatório de cirurgia renal, sendo realizado clampeamento vascular renal e conseqüente interrupção temporária do fluxo sanguíneo renal. Eles consideraram o KIM-1 o melhor biomarcador de injúria isquêmica tubular. Outro estudo, em pacientes com anemia falciforme, patologia que evolui com dano renal, comparou os biomarcadores de lesão renal, albuminúria e KIM-1, para o diagnóstico de LRA nestes pacientes. Os resultados encontrados sugerem que a expressão deste biomarcador precede o aparecimento da albuminúria (HAMIDEH *et al.*, 2014). Estudo realizado em doador de rim, com diagnóstico de

morte encefálica quantificava o KIM-1 antes da doação e acompanhava a evolução dos receptores. Foi observado que, nos doadores que mostraram elevação significativa dos níveis de KIM-1 e creatinina normal, os rins doados, subsequentemente, apresentaram disfunção pós-transplante (FIELD *et al.*, 2014).

Nicola *et al.* (2015) mencionam o aparecimento da NIC relacionado ao aumento da creatinina sérica, entre 48 e 72 horas após a administração do meio de contraste. Relatam ainda que o pico da creatinina sérica ocorre entre o segundo e terceiro dias, retornando aos seus níveis basais dentro de 14 dias. Nossos achados vão de encontro ao que está descrito na literatura, ao se observar uma crescente nos valores da creatinina sérica, mostrando-se significante nos tempos de 48 e 72 horas, atingindo seu pico no tempo de 72 horas. Os valores encontrados para o *clearance* de creatinina também estão de acordo com os dados da literatura, encontrando-se reduzidos nos tempos de 48 e 72 horas, e seu pico ocorreu 72 horas após a administração do meio de contraste.

O aumento da albuminúria foi observado no grupo avaliado no tempo de 72 horas quando comparado aos grupos controle e 48 horas. Com relação à proteinúria e às frações de excreção de sódio, potássio e cloreto, não foram observados aumentos significativos em nenhum dos tempos avaliados, quando comparados ao grupo controle.

As análises de KIM-1 foram realizadas nos grupos de animais que receberam contraste de alta osmolalidade, na concentração de 5 mL/kg, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A expressão de KIM-1 já se encontrava aumentada no tempo de 24 horas, persistindo com os níveis elevados nos tempos de 48 e 72 horas.

Wu *et al.* (2013) realizaram estudo no qual era induzida a insuficiência renal em ratos com indometacina e L-NAME e, em seguida, era administrado contraste de alta osmolalidade na dose de 10mL/kg. Após a administração do contraste, eles avaliaram a expressão de KIM-1 com 24 e 48 horas, sendo evidenciado um aumento da expressão desse biomarcador renal. Comparando com nossos achados, é importante ressaltar que não induzimos insuficiência renal e que utilizamos a dose de contraste usual na prática clínica, quando observamos a expressão de KIM-1 aumentada a partir do tempo de 24 horas, mantendo-se em níveis elevados até o tempo de 72 horas, conforme avaliado.

Foram realizadas análises histológicas de cortes renais dos animais tratados nas diferentes etapas deste estudo. Foram evidenciadas alterações tubulares em todos os grupos tratados. No grupo que utilizou contraste de alta osmolalidade na dose de 5 mL/kg, no tempo

de 48 horas, foram evidenciadas alterações tubulares moderadas e, nos demais grupos que utilizaram contraste de baixa osmolalidade e isosmolar, no tempo de 72 horas, alta osmolalidade na dose de 2,5 mL/kg, no tempo de 72 horas, e 5 mL/kg, nos tempos de 24 e 72 horas, foram encontradas alterações tubulares leves. Nas demais estruturas, como glomérulo, interstício, arteríolas e outros vasos, não foram encontradas alterações histológicas.

A distribuição das lesões no néfron depende da etiologia da lesão. Lesões com etiologia tóxica, como a observada neste estudo, apresentam dano mais intenso, do ponto de vista histológico. Como o túbulo proximal é a porção comumente responsável pela excreção de toxinas, este é o segmento que mais apresenta lesões (D'AGATI; JENNETTE; SILVA, 2005).

O KIM-1 é um receptor de fosfatidilserina que realiza fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados (BONVENTRE, 2014; YANG *et al.*, 2015). A remoção de células apoptóticas em tempo hábil desempenha um importante papel no remodelamento, regulação da resposta imune e homeostasia tecidual. É importante que o processo seja rápido e eficiente, para evitar danos secundários, como a necrose celular (ICHIMURA *et al.*, 2008). O KIM-1 é uma molécula que transforma células tubulares proximais em fagócitos e, conseqüentemente, proporciona o aumento da depuração das células mortas pelas células tubulares sobreviventes, desempenhando um importante papel na modulação da resposta imune inata, em resposta à LRA. Existe indicação de que o KIM-1 proteja precocemente o rim após uma injúria, captando células apoptóticas (BONVENTRE, 2014).

Yang *et al.* (2015) realizaram estudo com análise histológica de rins, após lesão de isquemia e reperfusão em animais normais e em animais com uma mutação do papel fagocitário do KIM-1, mantendo todas as outras funções do KIM-1 preservadas. Avaliaram com 24, 48 e 72 horas, e observaram que, com 24 horas, os níveis de *debris* de células eram semelhantes nos dois grupos, mas, a partir de 48 horas, o grupo dos animais normais apresentava uma redução significativa, quando comparado ao grupo dos animais com mutação do papel fagocitário do KIM-1.

No presente estudo, foi evidenciada alteração moderada apenas no grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, no tempo de 48 horas, corroborando a literatura e sugerindo que o KIM-1, provavelmente, desempenha um papel fagocitário nos túbulos renais, após a injúria renal aguda, detectado pela melhora dos danos tubulares na histologia do grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, na dose de 5mL/kg, no tempo de 72 horas.

Nas análises *in vitro*, foi avaliada a viabilidade celular em cultura de células proximais LLC-MK2, tratadas com contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, na concentração de 15 mgI/mL e período de incubação de 24 horas, sendo observada apoptose celular por citometria de fluxo nos três grupos estudados.

Algumas críticas são relatadas, com relação a estudos *in vitro* que abordam a apoptose causada pelo meio de contraste iodado, referindo-se a algumas limitações apresentadas por essas análises. Uma destas limitações está relacionada às altas doses de contraste, frequentemente utilizadas para experimentos com cultura celular. Outra importante observação refere-se ao fato de que raramente pesquisas comparam diferentes tipos de contraste, com osmolalidades diferentes, no mesmo estudo (MICHAEL *et al.*, 2014). Fizemos a opção por utilizar, nos nossos experimentos, a concentração de 15 mgI/mL e três tipos de contraste com osmolalidades diferentes - alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar. Estas escolhas deveram-se à tentativa de retratar o que acontece na clínica, utilizando a dosagem que é utilizada na prática diária e os três tipos de contraste frequentemente administrados, tentando, assim, encontrar um resultado mais próximo da realidade que acontece nas células renais dos pacientes que recebem meio de contraste iodado.

O efeito tóxico do meio de contraste iodado em células renais, parece ter um papel no desenvolvimento da NIC. Ademais, os mecanismos envolvidos na citotoxicidade não estão claros, mas os efeitos tóxicos podem incluir falha da energia celular, interrupção da homeostase do cálcio, alteração na polaridade das células tubulares e apoptose (WU *et al.*, 2010).

Previamente, pesquisadores avaliaram a viabilidade celular em cultura de células NRK52E (célula tubular proximal de rato) tratadas com meio de contraste de alta osmolalidade (Urografina®); encontraram uma importante redução da viabilidade celular tempo e dose-dependente, evidenciada pela indução de apoptose celular, mas sem aumento da necrose celular (WU *et al.*, 2010).

Alguns estudos mostraram que o meio de contraste diotrizoato de meglumina (alta osmolalidade) induz à apoptose tempo-dependente e dose-dependente, determinada por citometria de fluxo, em linhagem de célula epitelial tubular proximal renal humana, HK-2. Foram avaliadas as concentrações de 20, 40 e 80 mgI/mL de contraste, sendo detectadas células apoptóticas, com uma maior porcentagem delas na fase inicial da apoptose, sugerindo uma apoptose precoce, e não sendo evidenciada necrose ou apoptose tardia. Dados da literatura sugerem que, com o aumento da concentração para 150 mgI/mL de contraste, deve ser

ocasionada uma inversão do estágio da apoptose, passando, portanto, a ser evidenciado um predomínio de células na fase tardia da apoptose. A apoptose pode ser considerada a alteração fisiopatológica predominantemente induzida pela toxicidade do meio de contraste iodado (PENG *et al.*, 2015; XIONG *et al.*, 2006). Foi também observado apoptose tempo-dependente e dose-dependente em cultura de célula NRK52E, após a exposição ao meio de contraste de baixa osmolalidade (Ioversol®). Observou-se ainda que, em concentrações de até 100 mgI/mL de meio de contraste, havia uma maior concentração de células no estágio precoce da apoptose e com uma dose de 150 mgI/mL, ocorria uma inversão e era evidenciada uma maior quantidade de células na fase tardia da apoptose (XIONG *et al.*, 2006).

Romano *et al.* (2008) avaliaram a viabilidade celular de dois tipos de contraste iodado, sendo um de baixa osmolalidade (Iobitridol®) e outro isosmolar (Iodixanol®), em três linhagens celulares diferentes, sendo uma de rim embrionário humano (HEK 293), uma de células tubulares proximais de porco (LLC- MK2) e outra de células tubulares distais de cão (MDCK). O referido estudo evidenciou redução da viabilidade celular concentração-dependente. Os resultados mostraram-se idênticos nas três linhagens celulares estudadas, e não houve nenhuma interação entre o efeito citotóxico e o tipo de contraste utilizado.

Embora os meios de contraste de baixa osmolalidade tenham reduzido a frequência das complicações, a hiperosmolalidade não explica completamente a patogênese da NIC (XIONG *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi evidenciada citotoxicidade em células tubulares renais LLC-MK2, com os contrastes de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e isosmolar, na concentração de 15 mgI/mL. Foram utilizados contrastes de três osmolalidades diferentes e na concentração utilizada na clínica, pretendendo, com isso, aumentar a confiabilidade dos resultados. Foram encontrados vários estudos com células renais e contraste, mas com uma dosagem bem maior que a utilizada na clínica. Este trabalho se diferencia dos demais por utilizar a dosagem utilizada na prática médica. Nos ensaios em citometria de fluxo, foi observada uma maior concentração de células marcadas com anexina V, demonstrando que um grande número de células encontravam-se na fase inicial da apoptose, corroborando achados da literatura. Estes resultados sugerem que não apenas o fator osmolalidade ou viscosidade, isolados, determinam a NIC, mas, provavelmente, mais de uma variável está envolvida no desenvolvimento desta patologia.

Nesse trabalho, apesar de termos observado o potencial apoptótico sobre células renais com os três tipos de contraste estudados, apenas o contraste de alta osmolalidade apresentou

nefrotoxicidade observada nos ensaios *in vitro*. Isso sugere que a nefrotoxicidade dos contrastes está relacionada principalmente às alterações hemodinâmicas associadas ao uso dessas substâncias, e não somente ao efeito direto desses contrastes sobre as células.

Estudos *in vitro* permanecem como a única maneira apropriada para avaliar os efeitos citotóxicos diretos do meio de contraste em células renais, por não sofrerem interferência de outras variáveis, que podem ser encontradas *in vivo*, como hipóxia, devido a alterações hemodinâmicas. Embora a interação entre o contraste e as células renais seja estática em cultura de células e transitória no cenário clínico, ainda é a opção de escolha (NETTI *et al.*, 2014).

Atualmente, é aceito que o principal fator que desencadeia a NIC é hipóxia medular renal, que pode ser iniciada de três maneiras diferentes: alterações hemodinâmicas induzidas pelo contraste, danos causados pela liberação de espécies reativas de oxigênio e um efeito tóxico direto à célula tubular renal (LI *et al.*, 2015; MICHAEL *et al.*, 2014). Naziroglu *et al.* (2013) demonstraram que a citotoxicidade do meio de contraste pode estar dissociada do estresse oxidativo das células tubulares renais e da entrada de cálcio.

No presente estudo, para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas foi realizado o ensaio com DCFH, sendo observado um aumento da marcação, indicando produção de espécies reativas de oxigênio induzida apenas pelo contraste de alta osmolalidade.

A hipóxia renal, causada pela redução do fluxo sanguíneo renal, conduz a alterações na cadeia de transporte de elétrons, levando à produção de espécies reativas de oxigênio, que pode ter um efeito prejudicial no interior da célula por oxidação de lipídios, inativação de proteínas, oxidação do DNA e ativação das vias de sinalização, que conduzem à inflamação e à morte celular (MICHAEL *et al.*, 2014).

A NIC é resultado de uma combinação de hipóxia e injúria tóxica no parênquima renal. Essa toxicidade pode ser ocasionada pelas espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo é um mecanismo crítico envolvido na NIC (LIU, T. *et al.*, 2015). Estudo relata que o contraste iodado induz a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, por meio da ativação das células fagocitárias, pela hipóxia e por reperfusão (NAZIROGLU *et al.*, 2013).

Para análise do potencial transmembrânico mitocondrial, foi utilizado o corante rodamina, e não foi observada marcação com nenhum dos três tipos de contraste estudados. A atividade metabólica das mitocôndrias, determinada por citometria de fluxo, utilizando a técnica de análise pela Rho123, possibilita a identificação das células viáveis e inviáveis. As

células marcadas com a Rho123 apresentam função mitocondrial inibida e, conseqüentemente, não ocorre transporte de elétrons (LAISO, 2011).

A apoptose é um mecanismo conservador de eliminar as células indesejadas. Ela pode ser induzida pela via intrínseca, sendo desencadeada por vários fatores intracelulares e extracelulares, que convergem para mitocôndria, ou pela via extrínseca, que é desencadeada pela ativação de receptores de morte presentes na superfície das células (NETTI *et al.*, 2014).

O mecanismo de indução de apoptose pelo meio de contraste ainda é desconhecido. O estresse oxidativo pode participar da apoptose das células renais induzida pelo meio de contraste, mas ainda não está completamente compreendido exatamente como ela ocorre. Vários estudos controversos foram encontrados, sugerindo que o mecanismo pelo qual o estresse oxidativo participa da patogênese da indução de apoptose, desencadeada pelo meio de contraste, é complexo, e sinaliza que o estresse oxidativo pode ser um alvo para o tratamento da NIC (PENG *et al.*, 2015).

Avaliando os resultados encontrados no ensaio com a rodamina, não foi observado comprometimento mitocondrial, e a morte celular aparentemente não está relacionada ao metabolismo mitocondrial.

Nos ensaios com células LLC-MK2, a liberação de KIM-1 foi encontrada apenas no sobrenadante das células tratadas com o contraste de alta osmolalidade, sugerindo um dano direto nas células tubulares proximais tratadas com contraste de alta osmolalidade.

## 7 CONCLUSÃO

Após a realização de experimentos *in vivo* e *in vitro*, nos quais foram testados três tipos de contraste iodado, em duas dosagens e três tempos, podemos concluir que :

- O contraste iodado de alta osmolalidade demonstrou ser mais nefrotóxico que os contrastes de baixa osmolalidade e isosmolar em experimentos com animais.
- O contraste de baixa osmolalidade demonstrou ser o menos nefrotóxico dentre os três tipos de contraste.
- O contraste de alta osmolalidade apresentou um comprometimento tubular moderado nas análises histológicas.
- A redução da dose de contraste iodado administrado sugeriu uma maior segurança na prevenção da nefropatia induzida por contraste.
- O KIM-1 mostrou superioridade em relação aos biomarcadores clássicos, no diagnóstico precoce da nefropatia induzida por contraste.
- Os meios de contrastes causaram apoptose em células tubulares renais.
- A morte celular aparentemente não está relacionada ao metabolismo mitocondrial.
- A produção de espécies reativas de oxigênio mostrou-se aumentada com o contraste de alta osmolalidade.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE MODESTO, J. *et al.* BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from Bothrops erythromelas venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, [Oxford], v. 72, n. 3, p. 377-384, July. 2006.
- BARACCA, A. *et al.* Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, [Amsterdam], v. 1606, n. 1-3, p. 137-146, Sept. 2003.
- BASS, D. *et al.* Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**. [Bethesda], v. 130, n. 4, p. 1910-1917, Apr. 1983.
- BASS, D. *et al.* Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 136-141, 1986
- BOERSMA, H. *et al.* Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **Journal of nuclear medicine**, [Reston, VA], v. 46, n. 12, p. 2035-2050. Dec. 2005.
- BONVENTRE, J. Kidney injury molecule-1: a translational journey. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, [Baltimore], v. 125, p. 293-299, 2014.
- BRIGUORI, C.; TAVANO, D.; COLOMBO, A. Contrast agent-associated nephrotoxicity. **Progress in Cardiovascular Diseases**, [Philadelphia], v. 45, n. 6, p. 493-503, May/June. 2003.
- BUYUKLU, M. *et al.* Protective effect of curcumin against contrast induced nephropathy in rat kidney: what is happening to oxidative stress, inflammation, autophagy and apoptosis? **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [Rome], v. 18, n. 4, p. 461-470, 2014.
- CHICAIZA-BECERRA, L.; GARCIA-MOLINA, M.; GAMBOA, O. Cost-effectiveness of iso- versus low-osmolality contrast media in outpatients with high risk of contrast medium-induced nephropathy. **Biomédica**, Bogotá, v. 32, n. 2, abr./jun. 2012.
- D'AGATI, V.; JENNETTE, J.; SILVA, F. Diseases of Renal Tubules. In: \_\_\_\_\_. **Non-neoplastic kidney diseases**. Washington: AFIP, 2005. p. 517-546.
- DOWNES, M. In vitro study of various iodinated contrast media. **Radiology**, [Easton, PA], v. 239, n. 6, p. 918-921, June. 2006. Carta.
- EBISAWA, S. *et al.* Impact of minimum contrast media volumes during elective

percutaneous coronary intervention for prevention of contrast-induced nephropathy in patients with stable coronary artery disease. **Cardiovascular Intervention and Therapeutics**, [Tokyo], v. 31, n. 1, p. 13-20, Jan. 2016.

EDELSTEIN, C. **Biomarkers of Kidney**. London: Elsevier, 2011.

EDUARDO, J. *et al.* Nefropatia induzida por contraste: avaliação da proteção pela n-acetilcisteína e alopurinol em rato uninefrectomizados. **Radiologia Brasileira**, [São Paulo], v.41, n. 3, p. 177-181, maio/jun. 2008.

FIELD, M. *et al.* Urinary biomarkers of acute kidney injury in deceased organ donors--kidney injury molecule-1 as an adjunct to predicting outcome. **Clinical Transplantation**, [Copenhagen], v. 28, n. 7, p. 808-815, July. 2014.

GORRIZ, J.; MARTINEZ-CASTELAO, A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. **Transplantation reviews**, [Orlando], v. 26, n. 1, p. 3-13, Jan. 2012.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira Cancerologia**, [Rio de Janeiro], v. 53, n. 3, p. 335-343, jan. 2007.

HAMIDEH, D. *et al.* Albuminuria correlates with hemolysis and NAG and KIM-1 in patients with sickle cell anemia. **Pediatric Nephrology**, [Berlin], v. 29, n. 10, p. 1997-2003, Oct. 2014.

HENETIX. Responsável técnico Carlos A. Anacleto. Rio de Janeiro: Guerbet, 2013. Bula de remédio.

HUGHES, J.; GOBE, G. Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. **Nephrology**, v. 12, n. 5, p. 452-458, oct. 2007.

HULL, R.; CHERRY, W.; TRITCH, O. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research. **The Journal of experimental medicine**, [New York], v. 115, p. 903-918, May. 1962.

ICHIMURA, T. *et al.* Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, [Ann Arbor], v. 118, n. 5, p. 1657-1668, May. 2008.

ICHIMURA, T.; MOU, S. Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, [Shanghai], v. 6, n. 5, p. 533-538, May. 2008.

INDA FILHO, A. *et al.* Do Intravenous n-acetylcysteine and sodium bicarbonate prevent high osmolal contrast-induced acute kidney injury? a randomized controlled trial. **Plos One**, [San Francisco, CA], v. 9, n. 9, Sept. 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107602>>. Acesso em: 28 set. 2015.

JOHNSON, L.; WALSH, M.; CHEN, L. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [Washington, DC], v. 77, n. 2, p. 990-4, Feb. 1980.

KOMENDA, P.; RIGATTO, C.; TANGRI, N. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria: diagnosis, staging, and prognosis. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, [London], v. 23, n. 3, p. 251-257, May. 2014

LAHOUD, Y. *et al.* Effects of phosphodiesterase-5 inhibitor on ischemic kidney injury during nephron sparing surgery: quantitative assessment by NGAL and KIM-1. **World Journal of Urology**, Berlin, v. 33, n. 12, p. 2053-2062, Dec. 2015.

LAISO, R. A. N. **Mecanismo de citotoxicidade do composto fenólico polifuncional 4formil-2-metoxi-fenolato de sódio (V6) células tumorais e normais**. 2011. 115 f. Dissertação ( Mestrado Profissional em Farmácia) - Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2011.

LARANJA, S. **Avaliação da Nefrotoxicidade do contraste iodado em humanos**. 1991. 98 f. Dissertação (Mestrado em Nefrologia) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo. 1991.

LEVI, T. *et al.* Comparação dos critérios RIFLE, AKIN e KDIGO quanto à capacidade de predição de mortalidade em pacientes graves. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [São Paulo], v. 25, n. 4, p. 290-296, out./dez. 2013.

LI, W. *et al.* Urinary kidney injury molecule-1 as an early indicator to predict contrast-induced acute kidney injury in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention. **Biomedical reports**, [London], v. 3, n. 4, p. 509-512, July. 2015.

LIMA, D. *et al.* Snakevenom: any clue for antibiotics and CAM? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 39-47, Mar. 2005.

LISS, P. *et al.* Injection of low and iso-osmolar contrast medium decreases oxygen tension in the renal medulla. **Kidney International**, [New York], v. 53, n. 3, p. 698-702, Mar. 1998.

LIU, T. *et al.* Limb ischemic preconditioning protects against contrast-induced acute kidney injury in rats via phosphorylation of GSK-3 $\beta$ . **Free radical biology & medicine**, [Tarrytown, NY], v. 81, p. 170-182, Apr. 2015.

LIU, Y. *et al.* Safe contrast volumes for preventing contrast-induced nephropathy in elderly patients with relatively normal renal function during percutaneous coronary intervention. **Medicine (Baltimore)**, [Hagerstown, Md], v. 94, n. 290, Mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4553999/>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

LUCINDA, L. **Mecanismos de Indução da Apoptose por Glicocorticóides e seus Efeitos no Câncer**. 2009. 44 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Parasitologia, Microbiologia e Imunologia)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

LUO, Q. H. *et al.* KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, New York, v. 397, n. 1-2, p. 53-60, Dec. 2014.

MACEY, M. G. Flow cytometry: clinical applications. Oxford: Blackwell Science, 1994.

MACHADO JUNIOR, J. C. *et al.* A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [Curitiba], v. 16, suplemento, p. 645-655, Dez. 2006.

McCORMACK, P. Iobitridol: a review of its use as a contrast medium in diagnostic imaging. **Clinical drug investigation**, [Cham], v. 33, n. 2, p. 155-166, Feb. 2013.

MICHAEL, A. *et al.* Molecular mechanisms of renal cellular nephrotoxicity due to radiocontrast Media. **BioMed Research International**, [New York], v. 2014, Mar. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/249810>>. Acesso em: 28 set. 2015.

MICHAEL, A. *et al.* Molecular mechanisms of renal cellular nephrotoxicity due to radiocontrast Media. **BioMed Research International**, [New York], v. 2014, Mar. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/249810>>. Acesso em: 28 set. 2015.

NAZIROGLU, M. *et al.* Role of contrast media on oxidative stress, Ca(2+) signaling and apoptosis in kidney. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 246, n. 2, p. 91-100, Feb. 2013.

NETTI, G. *et al.* Exposure to low- vs iso-osmolar contrast agents reduces NADPH-dependent reactive oxygen species generation in a cellular model of renal injury. **Free Radical Biology & Medicine**, [New York], v.68, p. 35-42, Mar. 2014.

NICOLA, R. *et al.* Contrast-induced nephropathy: identifying the risks, choosing the right agent, and reviewing effective prevention and management methods. **Current Problems In Diagnostic Radiology**, [St. Louis], v. 44, n. 6, p. 501-504, Nov./Dec. 2015.

PAROLIN, M.; REASON, I. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, [São Paulo], v. 38, n. 2, p. 138-144, fev. 2001.

PENG, P.-a. *et al.* Valsartan protects HK-2 cells from contrast media-induced apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress. **Cell Biology International. Cell biology international**, [London], v. 39, n. 12, p. 1408-1417, Dec. 2015.

PETIT, P. Flow cytometric analysis of rhodamine 123 fluorescence during modulation of the membrane potential in plant mitochondria. **Plant physiology**, [Lancaster, Pa.], v. 98, n. 1, p. 279-286, Jan. 1992.

PIRES, A. **Papel dos ácidos graxos na função e morte de neutrófilos de humanos: utilização do exercício intenso como modelo.** 2008. 45 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RIBEIRO, L. **Avaliação da produção de óxido nítrico em cultura de células da Artéria renal de ratos expostas aos diferentes meios de contraste radiológico.** 2003. 97 f. Dissertação (Mestrado em ciências nefrológicas) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003.

ROBBINS, S.; COTRAN, R. Respostas Celulares ao Estresse e aos Estímulos Tóxicos: Adaptação, Lesão e Morte. In: \_\_\_\_\_. **Bases Patológicas da Doenças.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 3-42

ROBINSON, J. Oxygen and nitrogen reactive metabolites and phagocytic cells. In: \_\_\_\_\_. (Ed.); BABCOCK, G. (Ed.). **Phagocyte function: a guide for research and clinical evaluation.** New York: Wiley-Liss, 1998. p. 217-252.

ROMANO, G. *et al.* Contrast agents and renal cell apoptosis. **European Heart Journal**, [Oxford], v. 29, n. 20, p. 2569-2576, May. 2008.

ROSE JUNIOR, T.; CHOI, J. Intravenous imaging contrast media complications: the basics that every clinician needs to know. **The American Journal of Medicine**, [New York], v. 128, n. 9, p. 943-949, Sept. 2015.

ROUSSEFF, P. **Avaliação de risco para nefropatia induzida por contraste iodado após exames de imagem em hospital terciário.** 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em ciências clínicas) – Programa de pós-graduação de ciências aplicadas à saúde do adulto da faculdade de medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RUDNICK, M. Pathogenesis, clinical features, and diagnosis of contrast-induced nephropathy. **UpToDate.** Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-clinical-features-and-diagnosis-of-contrast-induced-nephropathy>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

SANTOS, A. *et al.* Produtos de contraste iodados. **Acta Médica Portuguesa**, [Lisboa], v.22, n. 3 p. 261-274, jan. 2009.

SOLOMON, R. Contrast Media: Are There Differences in Nephrotoxicity among Contrast Media? **BioMed Research International**, [New York], v. 2014, Jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/934947>>. Acesso em: 28 set. 2015.

SUGAWARA, A.; DAROS, K. **Manual de meio de contraste em Rx.** São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2004. 102p.

TELEBRIX 30 Meglumina. Responsável técnico Carlos A. Anacleto. Rio de Janeiro: Guerbet, 2013. Bula de remédio.

THOMSEN, H.; MORCOS, S. Radiographic contrast media. **BJU International**, [Malden], v. 86, p. 1-10, July.2000. Supplement 1.

ULTRAMARI, F. *et al.* Nefropatia induzida pelos meios de contraste radiológico após cateterismo cardíaco diagnóstico e terapêutico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [Rio de Janeiro], v. 87, n. 3, p. 378-390, set. 2006.

VAIDYA, V. S. *et al.* Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. **American journal of physiology. Renal physiology.**, [Bethesda, Md], v. 290, n. 2, p. F517 - F529, Feb. 2006.

VAN ENGELAND, M. *et al.* Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, [New York], v. 31, n. 1, p. 1-9, Jan. 1998.

VISIPAQUE. Princeton: GE Healthcare, 2015. Bula de remédio.

WASUNG, M.; CHAWLAB, L.; MADERO, M. Biomarkers of renal function, which and when? **Clinica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 438, p. 350-357, Jan. 2015.

WONG, P. C. *et al.* Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. **International Journal of Cardiology**, [Amsterdam], v. 158, n. 2, p. 186-192, July. 2012.

WU, C. *et al.* Involvement of caspase-12-dependent apoptotic pathway in ionic radiocontrast urografin-induced renal tubular cell injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [New York], v. 266, n. 1, p. 167-175, Jan. 2013.

WU, C. *et al.* The role of endoplasmic reticulum stress-related unfolded protein response in the radiocontrast medium-induced renal tubular cell injury. **Toxicological sciences**, [Oxford], v. 114, n. 2, p. 295-301, Apr. 2010.

XIONG, X. L. *et al.* Irbesartan attenuates contrast media-induced NRK-52e cells apoptosis. **Pharmacological research**, [London], v. 54, n. 4, p. 253-260, Oct. 2006.

YANG, L. *et al.* KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. **The Journal of clinical investigation**, [Ann Arbor], v. 125, n. 4, p. 1620-1636, Apr. 2015.

YANG, L. *et al.* Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. **Molecular pharmaceutics**, [Washington, DC], v. 9, n. 1, p. 29-36, Jan. 2012.

YASUDA, Y.; SUZUKI, S.; ISHII, H. Minimizing contrast dose according to estimated glomerular filtration rate: prevention strategies for contrast-induced acute kidney injury in chronic kidney disease era. **Circulation Journal**, [Kyoto], v.78, n. 1, p. 59-60, Jan. 2014. Editorial.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, v. 20, p. 1-15, 2006.

## ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ Estudo dos mecanismos de nefrotoxicidade induzidos por meios de contraste de alta e baixa osmolalidade e iso-osmolar em rim isolado e em linhagens de células tubulares proximal e distal”, protocolo nº 33/15, sob responsabilidade de Alice Maria Costa Martins, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 29/04/2015.

Vigência do projeto	16/03/2015 a 30/06/2015
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de Animais	30
Peso/Idade	150-250g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 08 de julho de 2015

Rodrigo Siqueira

Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
RÓDRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sisaep: 1520734