



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

ERIKA GONDIM GURGEL RAMALHO LIMA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIS INDUZIDAS PELOS MEIOS DE  
CONTRASTE DE ALTA E BAIXA OSMOLALIDADE**

FORTALEZA

2011

ERIKA GONDIM GURGEL RAMALHO LIMA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIIS INDUZIDAS PELOS MEIOS DE  
CONTRASTE DE ALTA E BAIXA OSMOLALIDADE**

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

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

L697e Lima, Erika Gondim Gurgel Ramalho  
Estudo das alterações renais induzidas pelos meios de contraste de alta e baixa osmolalidade / Erika Gondim Gurgel Ramalho Lima. – 2011.

90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

1. Meios de Contraste 2. Insuficiência Renal I. Título.

CDD 615.1

---

ERIKA GONDIM GURGEL RAMALHO LIMA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIS INDUZIDAS PELOS MEIOS DE  
CONTRASTE DE ALTA E BAIXA OSMOLALIDADE**

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

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

**BANCA EXAMINADORA:**

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves  
Universidade Federal do Ceará - UFC

À DEUS pela força nos momentos  
mais difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos **Luana, Fabrizio e Felipe**, pela compreensão e apoio em todos os meus momentos de ausência;

Ao meu esposo **Flávio** pelo seu grande amor e confiança;

Aos meus pais **Tereza e Eduardo** pelo eterno amor e incentivo;

Aos **meus irmãos Duda e Ivo** por acreditarem em mim;

A minha avó **Dindinha** que sempre me apoiou e torceu por mim;

A minha tia **Marilena**, que mesmo sem saber, influenciou nas minhas decisões e lutas como profissional da saúde, um constante exemplo para mim;

Aos meus cunhados **Eduardo, Mirela, Adriano, Denise, Roberto, Smênia e Marina** pelo estímulo;

Ao amigo **Rodrigo**, pessoa que abriu todas as portas para mim, desde a escolha do orientador, processo seletivo do mestrado e conclusão deste trabalho, mostrando-se sempre solícito com companheirismo e incentivo;

Ao amigo **Daniel Freire**, que nunca mediu esforços para me ensinar, ajudar e apoiar em todas as dificuldades que passei durante meus experimentos e conclusão da dissertação;

Ao meu chefe e amigo **Eriertônio** por sua confiança;

As minhas amigas **Celiane, Antonielle, Isrraelly, Nadja, Renata, Sônia, Viviane e Samara** que me compreenderam e ajudaram;

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

Às minhas colegas de plantão **Adriana, Ana Nery, Rosangela, Janaína e Ana Rosana** pelo incentivo;

Às minhas amigas do CEAPS/SECEN, **Rita, Cícera, Verônica, Fátima, Vera, Ana e Selda** pela amizade;

À **Eugênia** pela sua ajuda;

À **Aura Rhanes**, pela sua freqüente resolutividade sempre que solicitamos;

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

Aos colegas de outros laboratórios **Pedro, Rafael Ximenes, Roberta, Neto e Natasha** pelo apoio;

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

Ao **Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas** e sua coordenadora **Dra. Helena Serra Azul**, pelo espaço sempre disponível;

À Banca examinadora pelo aceite do convite;

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

À todos o meu muito obrigada.

## **OS FRUTOS DA FÉ**

O maior indutor da fé é o sofrimento, que nos faz sentir sede de DEUS.

Na dor, ela nos conforta com a paciência e a humildade.

Na tristeza nos alegra com sua luz.

Nas preocupações nos mostra as soluções.

Quando ofendido nos ensina a perdoar.

Quando odiamos nos desperta para amar.

No desespero nos acalma com a esperança.

Quando vacilamos nos mostra a natureza, que nos prova que DEUS existe e que nos deu tudo de bom para sermos felizes, porque nos ama.

Não rejeites angustiado os teus sofrimentos, mas procure assimilá-los como fermento para tua fé e oferece-os a DEUS em reparação pelos teus pecados, e a JESUS, em solidariedade aos seus sofrimentos.

Lidia Ponte Gondim



## RESUMO

Os meios de contraste iodado (MCI) são imprescindíveis na prática médica atual, durante as intervenções diagnósticas e terapêuticas. A nefropatia induzida por meio de contraste (NIMC) é a terceira causa iatrogênica de insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos renais dos meios de contraste ioxitalamato de meglumina e iobitridol, podendo contribuir para a descoberta de ferramentas farmacológicas e/ou elucidar os mecanismos de nefrotoxicidade. Os efeitos dos meios de contraste iodado (MCI) foram avaliados em ratos Wistar mantidos em gaiolas metabólicas, a cada 24 horas, por um período de até 72 horas após a administração do contraste por via intravenosa. No grupo controle foi administrado solução salina, enquanto os grupos tratados receberam ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) e iobitridol (baixa osmolalidade). Foram analisadas diariamente diurese, ingestão de água e alimento. A função renal foi avaliada através da perfusão de rim isolado de ratos após 72 horas da administração do MCI, onde a perfusão foi realizada com solução de Krebs Henseleit modificada com 6g% de albumina bovina. Os dados foram comparados através do teste Bonferroni e ANOVA, com significância de  $p < 0,05$ . A ingestão de água aumentou no grupo tratado com contraste de alta osmolalidade ( $26,00 \pm 2,00$ ) quando comparado ao grupo controle ( $19,00 \pm 1,175$ ) no tempo de 24 horas. A diurese do grupo tratado com contraste de alta osmolalidade ( $6,84 \pm 0,767$ ), no tempo de 24 horas, aumentou significativamente quando comparada ao grupo controle ( $3,57 \pm 0,696$ ). Em perfusão de rim isolado de rato, foi observado aumento da pressão de perfusão (PP) nos grupos que receberam contraste de alta ( $98,40 \pm 2,467$ ) e de baixa osmolalidade ( $126,8 \pm 0,936$ ) quando comparados ao grupo controle ( $89,13 \pm 0,818$ ), no tempo de 30 minutos. O ritmo de filtração glomerular sofreu redução nos grupos de alta osmolalidade ( $0,297 \pm 0,039$ ) e baixa osmolalidade ( $0,390 \pm 0,053$ ), quando comparado ao controle ( $0,741 \pm 0,042$ ), no tempo de 120 minutos. Em relação ao transporte de eletrólitos, foi observado alteração no transporte tubular de cloreto no grupo de baixa osmolalidade ( $72,41 \pm 0,892$ ) quando comparado aos grupos controle ( $83,68 \pm 0,951$ ) e de alta osmolalidade ( $79,72 \pm 1,335$ ), no tempo de 120 minutos; em relação ao transporte tubular de potássio foi evidenciado uma redução no grupo de alta osmolalidade ( $53,86 \pm 5,847$ ) quando comparado aos grupos controle ( $79,64 \pm 1,710$ ) e de baixa osmolalidade ( $69,34 \pm 2,479$ ), no tempo de 120 minutos. Na análise histológica, os rins que receberam contraste de alta e de baixa osmolalidade, no tempo de 72 horas, foi observado uma intensa deposição cilíndrica em todos os túbulos, tanto no córtex quanto na medula. Os glomérulos não apresentaram deposição. Na cultura de células MDCK foi evidenciado citotoxicidade dos contrastes de alta e de baixa osmolalidade, com predomínio de apoptose através da avaliação por citometria de fluxo. Estes resultados demonstram que os contrastes de alta e baixa osmolalidade induzem alterações no metabolismo diário dos ratos e nos parâmetros vasculares e renais avaliados na perfusão de rim isolado e possui ação citotóxica sobre as células MDCK.

Palavras-chave: Meio de contraste iodado, perfusão renal, gaiola metabólica

## ABSTRACT

Iodinated contrast media (ICM) is important in current medical practice during diagnostic and therapeutic interventions. Nephropathy induced by contrast medium (CMIN) is the third iatrogenic cause of acute renal failure in hospitalized patients. The objective of this work was to study the renal effects of contrast media meglumine and ioxitalamato Iobitridol and may contribute to the discovery of pharmacological tools and / or elucidate the mechanisms of nephrotoxicity. The effects of contrast media ioado (MCI) were evaluated on male Wistar rats housed in metabolic cages, every 24 hours for a period of 72 hours after the administration of intravenous contrast. In the control group was administered saline, while groups received ioxitalamato meglumine (high osmolality) and Iobitridol (low osmolality). We analyzed daily urine output, water intake and food. Renal function was assessed by perfusion of isolated rat kidney after 72 hours of administration of the MCI, where perfusion was performed with Krebs Henseleit modified 6g% bovine albumin. Data were compared by ANOVA and Bonferroni test, with significance of  $p < 0.05$ . The water intake increased in the group treated with high-osmolality contrast ( $\text{mL}/24\text{hs}$   $26.00 \pm 2.00$ ) compared to the control group ( $19.00 \pm 1.175 \text{ mL}/24\text{hs}$ ) at the time of 24 hours. Diuresis contrast the group treated with high osmolality ( $6.84 \pm 0.767 \text{ mL}/24\text{hs}$ ), at 24 hours, increased significantly when compared to controls ( $3.57 \pm 0.696 \text{ mL}/24\text{hs}$ ). Perfused isolated rat kidney, we observed an increase in perfusion pressure (PP) in the groups receiving high contrast ( $98.40 \pm 2.467 \text{ mmHg}$  \*,  $p < 0.05$ ) and low osmolality ( $126.8 \pm 0.936$  \*  $\text{mmHg}$ ,  $p < 0.05$ ) when compared to the control group ( $89.13 \pm 0.818 \text{ mmHg}$ ) at the time of 30 minutes. The glomerular filtration rate was reduced in the groups of high osmolality ( $0.297 \pm 0.039 \text{ mm.g-1.min-1}$  \*\*,  $p < 0.05$ ) and low osmolality ( $0.390 \pm 0.053 \text{ mm.g-1.min-1}$  \*\*  $p < 0.05$ ) when compared with controls ( $0.741 \pm 0.042 \text{ mm.g-1.min-1}$ ) at time 120 minutes. Regarding the transport of electrolytes was observed for the percentage of tubular transport of chloride in the group of low osmolality ( $72.41 \pm 0.892\%$  MCI-) compared with control groups ( $83.68 \pm 0.951\%$  MCI-) and high osmolality ( $79.72 \pm 1.335\%$ -TCL), in time of 120 minutes, in relation to the tubular transport of potassium was observed a reduction in high-osmolality group ( $53.86 \pm 5.847\%$  TK +) compared to control groups ( $79.64 \pm 1.710\%$  TK +) and low osmolality ( $69.34\% \pm 2.479$  TK +) at the time of 120 minutes. Histological analysis kidneys receiving high contrast and low osmolality in time of 72 hours, an intense deposition was observed in all cylindrical tubules both the cortex and spinal cord. The glomeruli showed no deposition. In MDCK cell culture cytotoxicity was evident contrasts of high and low osmolality, with a predominance of apoptosis by flow cytometric evaluation. The results demonstrate that the high contrast and low osmolality induce changes in the metabolism of rats daily and vascular parameters assessed in the kidney and kidney perfusion isolated and have cytotoxic activity on MDCK cells.

Keywords: Method of iodinated contrast, renal perfusion, metabolic cage

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1– Características morfológicas da apoptose e da necrose. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 2 – Etapas do processo de morte celular por apoptose: condensação, fragmentação e liberação dos corpos apoptóticos. ....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3 – Vias de sinalização da apoptose. Na via extrínseca há ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 4 – Via intrínseca de ativação da apoptose.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5 - Fotografias da gaiola metabólica vista anterior (A) e lateral (B).....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 6 - Fotografia da administração da droga.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 7 - Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 8 - Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9 - Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 10 - Valores de volume de solução salina (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 11 - Administração de manitol (300mg/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado. ....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 12 - Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 13 - Identificação (A) e canulação (B) do ureter do rim direito de rato Wistar..</b>	<b>47</b>
<b>Figura 14 - Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C).....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 15 - Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 16 - Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 17 - Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 18 - Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 19 - Consumo de água nos grupos controle (n=10), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19). ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 20 - Diurese nos grupos controle (n=10), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19). ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 21 - Consumo de alimento nos grupos controle (n=10), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19). ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 22 - Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5). ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 23 - Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5). ....</b>	<b>63</b>

<b>Figura 24 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).</b> .....	<b>64</b>
<b>Figura 25 - Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl-) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).</b> .....	<b>65</b>
<b>Figura 26 - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK+) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).</b> .....	<b>66</b>
<b>Figura 27 - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa+) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).</b> .....	<b>67</b>
<b>Figura 28 - Fotomicrografia do rim esquerdo de animal tratado com salina. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=6).....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 29 - Fotomicrografia do rim direito de animal tratado com salina antes da perfusão. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Rim direito perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit modificada, mostrando que a perfusão não altera a fisiologia renal. Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=3).....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 30 - Fotomicrografia do rim direito de animais tratados com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), no tempo de 72 horas. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Visualiza-se intensa deposição cilíndrica nos túbulos da região cortical (A) e medular (B). Alguns glomérulos mostraram de leve a moderada deposição de material protéico. Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; (n=5).....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 31 - Fotomicrografia do rim direito de animais tratados com iobitridol (baixa osmolalidade), tempo de 72 horas. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Visualiza-se intensa deposição cilíndrica nos túbulos da região cortical (A) e medular (B). Alguns glomérulos mostraram de leve a moderada deposição de material protéico. Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; (n=5).</b> .....	<b>70</b>
<b>Figura 32 - Gráficos representativos do perfil de marcação simultânea de células MDCK com anexina V – FITC (quadrante inferior direito das plotagens – indício de apoptose), PI (quadrante superior esquerdo das plotagens – indício de necrose). No quadrante inferior esquerdo das plotagens, estão representadas as células sem marcação (células viáveis). No quadrante superior direito das plotagens estão representadas as células com dupla marcação (indício de necrose secundária). A – Controle; B – Baixa osmolalidade 10 µg/mL; C – Controle; D – Alta osmolalidade 10 µg/mL.....</b>	<b>71</b>

<b>Tabela 1 – Consumo de água (mL) nos grupos controle (n=10), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).....</b>	<b>57</b>
<b>Tabela 2 – Diurese (mL) nos grupos controle (n=10), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 3 – Consumo de alimento (g) nos grupos controle (n=10), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).....</b>	<b>59</b>
<b>Tabela 4 – Pressão de Perfusão (mmHg) nos grupos controle (n=3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 5 – Fluxo Urinário (mL.g-1. min-1) nos grupos controle (n=3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).....</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 6 – Ritmo Filtração Glomerular (mL.g-1. min-1) nos grupos controle (n=3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).....</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 7 – Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl-) nos grupos controle (n = 3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).....</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 8 – Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK+) nos grupos controle (n = 3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).....</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 9 – Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa+) nos grupos controle (n = 3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).....</b>	<b>66</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Meios de Contraste Iodados (MCI).....</b>	<b>16</b>
1.1.1 Classificação dos contrastes.....	16
<b>1.2 Farmacologia dos meios de contraste.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Farmacocinética dos meios de contraste .....	18
1.2.2 Reações adversas dos meios de contraste.....	19
<b>1.3 Função renal.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Nefropatia Induzida por Meio de Contraste (NIMC).....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Fatores de Risco para NIMC.....	24
<b>1.5 Morte celular.....</b>	<b>25</b>
1.5.1 Necrose Celular.....	26
1.5.2 Apoptose Celular.....	27
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>36</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Animais de Experimentação.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Avaliação do Metabolismo Diário.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Grupos Experimentais.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Administração da Droga do Estudo.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 Nefrectomia Esquerda.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6 Perfusão de Rim Isolado.....</b>	<b>40</b>
4.6.1 Sistema de Perfusão.....	41
4.6.2 Calibração do Sistema.....	43
4.6.3 Solução Perfusora.....	44
4.6.4 Técnica Cirúrgica.....	44
4.6.5 Grupos Experimentais.....	49
4.6.6 Protocolo Experimental.....	49
4.6.7 Análises Bioquímicas dos Perfusatos e Urinas.....	50
4.6.8 Cálculo dos Parâmetros Funcionais Renais.....	50
4.6.9 Análise Histopatológica.....	52

<b>4.7 Ensaio com Cultura de Células</b> .....	<b>52</b>
4.7.1 Cultivo das Células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney).....	52
4.7.2 Avaliação de morte celular por apoptose/necrose.....	52
4.7.2.1 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo.....	52
<b>4.8 Análise Estatística</b> .....	<b>55</b>
<b>4.9 Aspectos Éticos</b> .....	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
<b>5.1 Avaliação do metabolismo diário de animais tratados com contrastes Ioxitalamato de Meglumina (alta osmolalidade) e Iobitridol (baixa osmolalidade) e mantidos em gaiola metabólica</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2 Efeitos dos Contrastos Ioxitalamato de Meglumina (alta osmolalidade) e Iobitridol (baixa osmolalidade) em Rim Isolado</b> .....	<b>60</b>
<b>5.3 Análise histológica dos rins que receberam contrastes Ioxitalamato de Meglumina (alta osmolalidade) e Iobitridol (baixa osmolalidade)</b> .....	<b>67</b>
<b>5.4 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo</b> .....	<b>70</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>81</b>

# **INTRODUÇ ÃO**





## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Meios de Contraste Iodados (MCI)

Os meios de contraste iodados são imprescindíveis na prática médica atual. No mundo estima-se em mais de 80 milhões/ano o número de intervenções diagnósticas ou terapêuticas que são realizadas com o auxílio de meios de contraste. Nos Estados Unidos, o número de cateterizações cardíacas e procedimentos invasivos coronarianos no ano de 2003 foi de mais de 2 milhões, o que representa um aumento superior a 300% nas duas últimas décadas (EDUARDO *et al.*, 2008).

Os agentes de contraste diferem significativamente com respeito às suas propriedades físico-químicas e efeitos fisiológicos peculiares, que podem influenciar na sua eficácia e efetividade. As propriedades básicas do meio de contraste iodado (MCI), incluem a ionicidade, a osmolalidade, a estrutura química e a viscosidade (EDUARDO *et al.*, 2008, ROUSSEFF, 2010).

Os meios de contraste são substâncias utilizadas para diagnóstico, capazes de aumentar a definição de imagens, possibilitando a obtenção de alta definição. Estes agentes que aumentam a densidade dos raios-X quando introduzidos num órgão são chamados contrastes positivos, enquanto, aqueles que diminuem a densidade dos raios-X são chamados contrastes negativos (SUGAWARA, 2004).

Todos os contrastes utilizados atualmente são modificações químicas do anel benzeno tri-iodado. Podem ser classificados baseado nas suas características físicas e químicas, incluindo a sua estrutura química, osmolalidade, conteúdo de iodo e ionização em solução (SANTOS *et al.*, 2009).

#### 1.1.1 Classificação dos contrastes

Na prática clínica, a classificação baseada na osmolalidade é a mais utilizada (SANTOS *et al.*, 2009). 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, 2004).

a) Alta osmolalidade

Consistem em um anel de benzeno tri-iodado com duas cadeias orgânicas laterais e um grupo carboxil. O anion iodado, diatrizoato ou ioxitalamato, é conjugado com um cátion sódio ou meglumina; o resultado é um monômero iônico. A ionização na ligação carboxil-cation torna o contraste solúvel em água. Assim por cada três átomos de iodo, duas partículas estão presentes em solução (razão 3:2). A sua osmolalidade em solução varia de 600 a 2100 mOsm/Kg, *versus* 290 mOsm/Kg do plasma humano, estando esta alta osmolalidade relacionada com alguns dos seu efeitos adversos (SANTOS *et al.*, 2009).

b) Baixa osmolalidade

Os contrastes de baixa osmolalidade se apresentam de três tipos:

- Monômeros não iônicos
- Dímeros iônicos
- 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 tem grupo carboxil não ionizam em solução. Assim, por cada três átomos de iodo, apenas está presente uma partícula 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 usadas eles tem uma osmolalidade que varia entre 290 e 860mOsm/Kg. São comercializados a iopramida, iobitridol, iohexol, iopamidol e o ioversol (SANTOS *et al.*, 2009).

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. Estes agentes contêm seis átomos de iodo por cada duas partículas em solução (razão 6:2). Sua osmolalidade é de 600mOsm/Kg. O único comercializado é o ioxaglate (SANTOS *et al.*, 2009).

Os dímeros não iônicos consistem na junção de dois monômeros não iônicos. Estas substâncias contêm seis átomos de iodo por cada partícula em solução (razão 6:1). Eles são iso-osmolares com o plasma. Atualmente o único comercializado é o iodixanol (SANTOS *et al.*, 2009).

Estudos clínicos de grande porte e metanálises demonstraram que o uso de agente contrastado de baixa osmolalidade, quando comparados com os de alta osmolalidade, reduz substancialmente a chance de desenvolver nefropatia em pacientes de alto risco (INDA FILHO, 2004).

Existem duas importantes limitações ao uso mais generalizado do contraste de baixa osmolalidade: o 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, estando os contrastes de alta osmolalidade de uso endovascular para ser abandonados (THOMSEN; MORCOS, 2000).

Previamente, foi evidenciado que o contraste não iônico e isosmolar é menos tóxico que o de baixa osmolalidade. No entanto, extensivas investigações demonstraram que com o contraste isosmolar em pacientes de baixo risco não mostraram diferenças significativas na frequência de nefropatia quando comparada com o agente de baixa osmolalidade, concluindo-se que ele é benéfico para os pacientes de risco (INDA FILHO, 2004).

## **1.2 Farmacologia dos meios de contraste**

### **1.2.1 Farmacocinética dos meios de contraste**

Os produtos de contraste iodado são usados em numerosos exames radiológicos: angiografia, urografia intravenosa, tomografia computadorizada, mielografia e técnicas de intervenção (SANTOS *et al.*, 2009).

Após injeção intravascular, o produto é distribuído no sistema intravascular e espaço intersticial, ocorrendo o equilíbrio completo 2h após a injeção. Não é metabolizado e é rapidamente eliminado, inalterado, na urina por filtração glomerular, sem reabsorção tubular. Nos pacientes com função renal normal a meia vida do contraste é de duas horas, sendo que em quatro horas 75% da dose administrada já foi excretada e em 24 horas a eliminação corresponde a 98%. Em pacientes com insuficiência renal, com taxa de filtração glomerular reduzida, a excreção pode prolongar-se por semanas, ganhando relevância a eliminação extra-renal, principalmente biliar e intestinal (SANTOS *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Reações adversas dos meios de contraste

Os meios de contraste, embora possuam uma excreção renal, são responsáveis por consideráveis reações adversas, dentre elas:

- reações sistêmicas de hipersensibilidade;
- efeitos cardíacos como hipotensão, taquicardia, arritmias e insuficiência cardíaca;
- efeitos vasculares como agrupamento e deformação eritrocitária, agregação de plaquetas, trombocitopenia, trombose ou vasoconstrição;
- efeitos renais como insuficiência renal aguda (IRA) de diferentes graus de severidade, vasoconstrição renal reativa, necrose no túbulo proximal devido à alta osmolalidade (RIBEIRO, 2003).

As reações anafiláticas são imprevisíveis, independentes da dose administrada, sendo as mais temíveis, pois não existe profilaxia. Os contrastes de alta osmolalidade são mais nefrotóxicos que os de baixa osmolalidade, particularmente em pacientes com insuficiência renal pré-existente (MORCOS; THOMSEN, 2001). Considera-se um aumento de até 5 vezes no risco de desenvolver reação alérgica, em pacientes que possuem relato prévio de reação alérgica e de até 3 vezes nos pacientes com história de alergia atópica. A história de asma pode indicar um aumento na probabilidade de desenvolver reação ao contraste (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 2010).

Reações de hipersensibilidade ocorrem com mais frequência com o uso dos contrastes de alta osmolalidade, sendo menos frequentes nos contrastes de baixa osmolalidade e isosmolares. A alta osmolalidade do produto de contraste em relação ao meio orgânico

desencadeia uma deslocação de líquidos do espaço intracelular e um aumento na viscosidade do fluido intracelular, precipitando a disfunção celular (THOMSEN; MORCOS, 2000).

A presença de doença cardíaca, tais como: angina, insuficiência cardíaca sintomática aos mínimos esforços, estenose aórtica grave, hipertensão pulmonar primária ou miocardiopatia grave compensada, necessitam de uma atenção especial com relação ao volume e osmolalidade do contraste a ser utilizado (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 2010).

O aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica pode ocorrer pelo efeito tóxico direto dos meios de contraste. Nestas condições o meio de contraste é capaz de alcançar estruturas cerebrais e se difundir nos espaços ventriculares. O uso de contraste não-iônico em todos os pacientes submetidos a procedimentos cerebrais poderia aumentar a segurança nestes casos imprevisíveis (LATCHAW, 1993).

### **1.3 Função renal**

A homeostasia do corpo é exercida pelo sistema renal através de múltiplas funções. O rim é o órgão responsável pela formação e eliminação da urina, através da qual são excretados os compostos indesejados que foram ingeridos ou os metabólitos, resultados do metabolismo. Outra função renal importante é o controle do volume da composição dos líquidos corporais. O mesmo é realizado através da filtração plasmática e remoção de produtos do filtrado em quantidades variáveis, que não são mais necessários ao corpo. Esses produtos incluem uréia (do metabolismo dos aminoácidos), creatinina (da creatina muscular), ácido úrico (dos ácidos nucléicos), produtos finais do metabolismo da hemoglobina (bilirrubina) e metabólitos de vários hormônios. Estes metabólitos devem ser eliminados do organismo tão rapidamente quanto são produzidos. Os rins também eliminam a maioria das toxinas e outras substâncias estranhas. É por meio desta função regulatória que os rins mantêm o ambiente das células estável o suficiente para realização de suas funções (COVIELLO, 2007; GUYTON, 2006).

Outras funções exercidas pelos rins são, dentre elas, regulação do equilíbrio de água e eletrólitos; regulação da osmolalidade dos líquidos corporais e da concentração de eletrólitos; regulação da pressão arterial; regulação do equilíbrio ácido-base; secreção, metabolismo e excreção de hormônios e gliconeogênese (GUYTON, 2006). Pode-se perceber através destas

diversas funções do sistema renal, que este exerce um importante papel no controle da homeostasia do organismo, e que a manutenção estrutural e funcional de suas células garante seu adequado funcionamento.

Em indivíduos normais a filtração glomerular é da ordem de 110 a 120 mL/min correspondente à função de filtração de cerca de 2.000.000 de néfrons (glomérulos e túbulos renais). Em pacientes com insuficiência renal crônica, a filtração se reduz, podendo chegar, em casos avançados, até 5-10 mL/min quando o tratamento dialítico ou o transplante renal se fazem necessários (COSTANZO, 2004). A consequência bioquímica dessa redução de função se traduz pela retenção, no organismo, de uma grande quantidade de solutos tóxicos geralmente provenientes do metabolismo protéico, que podem ser avaliados indiretamente através das dosagens da uréia e creatinina plasmáticas, que se elevam progressivamente (DANTAS, 2010).

Vários fatores podem alterar a função renal, as mais frequentemente encontradas são glomerulonefrite crônica, nefropatia túbulo-intersticial crônica (pielonefrite), necrose cortical renal, hipertensão arterial grave, processos renais obstrutivos crônicos, diabetes, amiloidose, lúpus eritematoso disseminado e doenças hereditárias tais como rins policísticos, síndrome de Alport e envenenamentos por serpentes peçonhentas (COSTA; VIEIRA NETO; MOYSÉS NETO, 2003).

Destaca-se que a lesão renal ocorre algumas vezes na ausência de um fator desencadeante e pode ter caráter progressivo. Acredita-se que com a redução inicial de um determinado número de néfrons, aqueles remanescentes tornam-se hiperfiltrantes, hipertrofiam-se, sofrem alterações da superfície glomerular e modificações de permeabilidade da membrana glomerular às proteínas. Essas alterações levam à produção renal de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, tais como IGF-I (*Insulin-like Growth Factor - I*), IL1 e IL6 (interleucinas 1 e 6), TGF- $\alpha$  e  $\beta$  (*Transforming Growth Factor -  $\alpha$  e  $\beta$* ), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), TNF -  $\alpha$  (*Tumoral Necrosis Factor -  $\alpha$* ), endotelina, Fator Natriurético Atrial, angiotensina II, etc. Esses agentes seriam responsáveis pelos processos de proliferação celular renal, coagulação intraglomerular, recrutamento e proliferação de células imunitárias, aumento da matriz celular, proliferação colágena e fibrose. Desse modo a continuidade da presença de lesões fibróticas glomerulares e intersticiais acabaria por determinar perda progressiva dos néfrons e da filtração glomerular (DRAIBE, 2002).

A adaptação do organismo ocorre continuamente a esta situação, no sentido de manter a homeostase: os néfrons remanescentes aumentam a excreção fracional de muitos solutos, que continuam a ser produzidos a taxas normais. A própria elevação de um determinado soluto no plasma, aumenta a sua excreção renal devido à elevação de sua carga filtrada. Ocorre um acúmulo

de substâncias tóxicas no meio interno, seja por excreção deficiente, seja por excesso de produção devido a distúrbios metabólicos. Excetuando-se excessos ou privações, o balanço de sódio, potássio e água são mantidos até fases avançadas da insuficiência renal crônica. Vários solutos, entretanto, mantêm sua concentração plasmática em níveis normais, graças à elevação progressiva de hormônios reguladores. É o caso, por exemplo, da maior excreção fracional de sódio que fica progressivamente dependente, entre outros, do aumento da concentração plasmática do fator natriurético atrial. As concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo são mantidas em níveis normais às custas, quase exclusivamente, da progressiva elevação do paratormônio (PTH). Perdas de função renal de até 50% não se manifestam clinicamente de forma consistente. Reduções maiores causam a síndrome urêmica, conjunto de sinais, sintomas e complicações que atingem praticamente todos os órgãos e sistemas do organismo e que resultam da retenção de solutos tóxicos ou no aumento dos mecanismos homeostáticos, reguladores da concentração plasmática de solutos vitais ao organismo (RIBEIRO *et al.*, 2008; ZATZ, 1996).

#### **1.4 Nefropatia Induzida por Meio de Contraste (NIMC)**

A definição de nefropatia induzida por meios de contraste (NIMC) ainda não é consensual, sua definição mais aceita é o declínio agudo da função renal, manifestado por um aumento relativo da creatinina sérica em 25% ou um aumento absoluto de 0,5 mg/dL, ocorre um aumento abrupto da creatinina sérica de 24-48 após o exame contrastado, do 3º ao 5º dia alcança o seu pico e retorna aos valores de base entre o 7º e o 10º dia após a administração de contraste, na ausência de outras causas. No exame 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, 2004; ROUSSEFF, 2010; ULTRAMARI *et al.*, 2006).

A NIMC é a terceira causa iatrogênica de insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados e está associada com taxa de mortalidade elevada, superior a 34%, nesta população (EDUARDO *et al.*, 2008).

Alguns mecanismos são descritos como relevantes na patogênese causada pelos meios de contraste, que são alterações estruturais nos túbulos renais, distúrbios funcionais tubulares e alterações na hemodinâmica renal (RIBEIRO, 2003). É o resultado da combinação sinérgica



entre lesão tubular renal por toxicidade do contraste e isquemia medular renal (KRAMER *et al.*, 2008).

É sabido que a medula renal é mais sensível a agressões que o córtex. Na fisiopatologia da NIMC observa-se que o contraste iodado leva à lesão da medula externa e à hipóxia medular. A injúria se dá por efeito tóxico direto e por alterações fisiológicas e bioquímicas induzidas pelo contraste. O aumento da viscosidade, quando comparada ao sangue, diminui o fluxo sanguíneo medular e compromete o suprimento de oxigênio a regiões críticas do rim. A liberação de endotelina, adenosina e PGE-2 estão elevadas e a PGI-1 e o óxido nítrico diminuídos, com consequente diminuição do fluxo sanguíneo renal. Ocorre liberação de radicais livres e diminuição da atividade enzimática antioxidante. A hipóxia medular gera vasoconstrição, diminuição da IGF e precipitação da proteína Tamm-Horsfall, que culmina em obstrução e danos nos túbulos renais (MACHADO *et al.*, 2003; SEELIGER *et al.*, 2007).

Em estudo *in vivo* e *in vitro* foi observado, que após a administração de meio de contraste ocorre necrose da porção espessa da alça de Henle, sendo mais intenso nos que utilizaram contraste de alta osmolalidade (BEERI; SYMON; BREZIS, 1995).

Em estudos prévios foi observado elevação da concentração de cálcio intracelular, adrenalina, angiotensina e vasopressina e diminuição dos níveis de dopamina em cultura de células mesangiais quando expostas a contraste de baixa osmolalidade. Este trabalho sugere que o meio de contraste desencadeia várias respostas celulares que levam à contração das células mesangiais e, portanto, dos glomérulos, justificando a redução do ritmo de filtração glomerular (LARANJA, 1991).

O meio de contraste provoca alterações na reabsorção de água e sódio pelos túbulos renais, levando a uma oferta maior de sódio, na porção espessa da alça de Henle, propiciando uma diminuição da filtração glomerular devido à vasoconstrição da arteríola aferente, mecanismo conhecido como *feedback* túbulo glomerular. Pesquisas em ratos mostraram que o mecanismo *feedback* túbulo glomerular foi responsável por quase 50% do aumento da resistência vascular renal, quando administrado contraste de alta osmolalidade, e não acontecendo com a administração de contraste de baixa osmolalidade por este não ativar este mecanismo, induzindo diurese e natriurese discretas (RIBEIRO, 2003).

A incidência de NIMC varia substancialmente em vários estudos, dependendo dos critérios diagnósticos utilizados e dos fatores de risco individuais apresentados pelos

pacientes. Estima-se que ocorra em 1 a 6 % dos indivíduos em grupos não selecionados; porém, podem acometer até 40 a 90% dos pacientes de alto risco, particularmente aqueles com insuficiência renal crônica (IRC) e diabetes mellitus (DM). A incidência de insuficiência renal aguda (IRA) induzida por meios de contraste também é variável de acordo com a definição utilizada: 2% (aumento de 1,0mg/dL na creatinina sérica) (BARTHLOMEW *et al.*, 2004); 3,3% (aumento de 0,5mg/dL na creatinina sérica) (RIHAL *et al.*, 2002); e 14,5% (aumento de 25% na creatinina sérica) (MCCULLOUGH *et al.*, 1997).

Vários estudos foram realizados para identificação dos principais fatores de risco para NIMC. Foram reconhecidos, entretanto, certos grupos com maior probabilidade para o desenvolvimento de IRA após exames contrastados e vários fatores de risco foram sugeridos, incluindo: IRC preexistente, DM, volume do contraste administrado, desidratação, doença aterosclerótica, insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, cirrose hepática, uso concomitante de drogas nefrotóxicas, uso de contrastes de alta osmolalidade, idade, sexo masculino, mieloma múltiplo, hipoalbuminemia e hiponatremia (WAYBILL; WAYBILL, 2001).

A probabilidade de efeitos colaterais mais severos aumenta proporcionalmente à quantidade de agente de contraste que é utilizada nos procedimentos clínicos. São consideradas altas as doses de mais de 100g de substância, que equivale a aproximadamente 50g de iodo (SANTOS *et al.*, 2000).

Estudos mostram que os meios de contraste são a segunda causa de IRA, correspondendo a 12% dos casos, com relatos de incidência variando de 0 a 92% (RIBEIRO, 2003). A osmolalidade do meio de contraste é outro importante fator na NIMC. Os meios de contraste de alta osmolalidade são mais nefrotóxicos que os de baixa osmolalidade, particularmente em doentes com insuficiência renal pré-existente (VALLS *et al.*, 2003).

Vários estudos buscam medidas profiláticas para prevenção de NIMC. A acetilcisteína é uma das drogas estudadas para esta finalidade, além de antioxidante, apresenta propriedades vasodilatadoras por aumentar a expressão da enzima óxido nítrico sintase, assim poderia prevenir a NIMC, tanto por reduzir o dano oxidativo direto quanto por melhorar as condições hemodinâmicas nos rins (SAFIRSTEIN; ANDRADE; VIEIRA, 2000).

#### 1.4.1 Fatores de Risco para NIMC

Vários são os fatores de risco importantes para o desenvolvimento da nefrotoxicidade.

O diabetes mellitus, considerado um importante fator de risco, quando associado a comprometimento renal formam um grupo com elevado risco para desenvolver NIMC. Os diabéticos sem comprometimento renal possuem risco semelhante aos não diabéticos. A incidência de NIMC em diabéticos com comprometimento renal é de aproximadamente 50% em pacientes submetidos a coronariografia, considerando uma hidratação satisfatória e a utilização de contraste de baixa osmolalidade, onde 15% destes pacientes necessitaram de diálise (RIBEIRO, 2003).

A desidratação é reconhecida como fator de risco para NIMC. Entretanto, é difícil analisar a desidratação como variável independente, em virtude dos rigorosos protocolos de hidratação utilizados; a administração concomitante de meios de contraste (MC) e drogas nefrotóxicas, como antiinflamatórios não-hormonais e aminoglicosídeos, devem ser evitadas; a idade avançada também está associada a um risco aumentado de NIMC e os pacientes idosos que utilizam MC apresentam maior probabilidade de desenvolverem complicações em geral (WAYBILL; WAYBILL, 2001).

Outro considerável fator de risco é a insuficiência cardíaca congestiva, a maioria destes pacientes, possuem um volume plasmático alterado por utilizarem diuréticos. O risco já existente de desenvolverem edema agudo de pulmão, impossibilita uma hidratação satisfatória o que acarretará uma vasoconstrição renal induzida pelo contraste e associada ao baixo fluxo renal, aumentando assim o risco de NIMC (RIBEIRO, 2003).

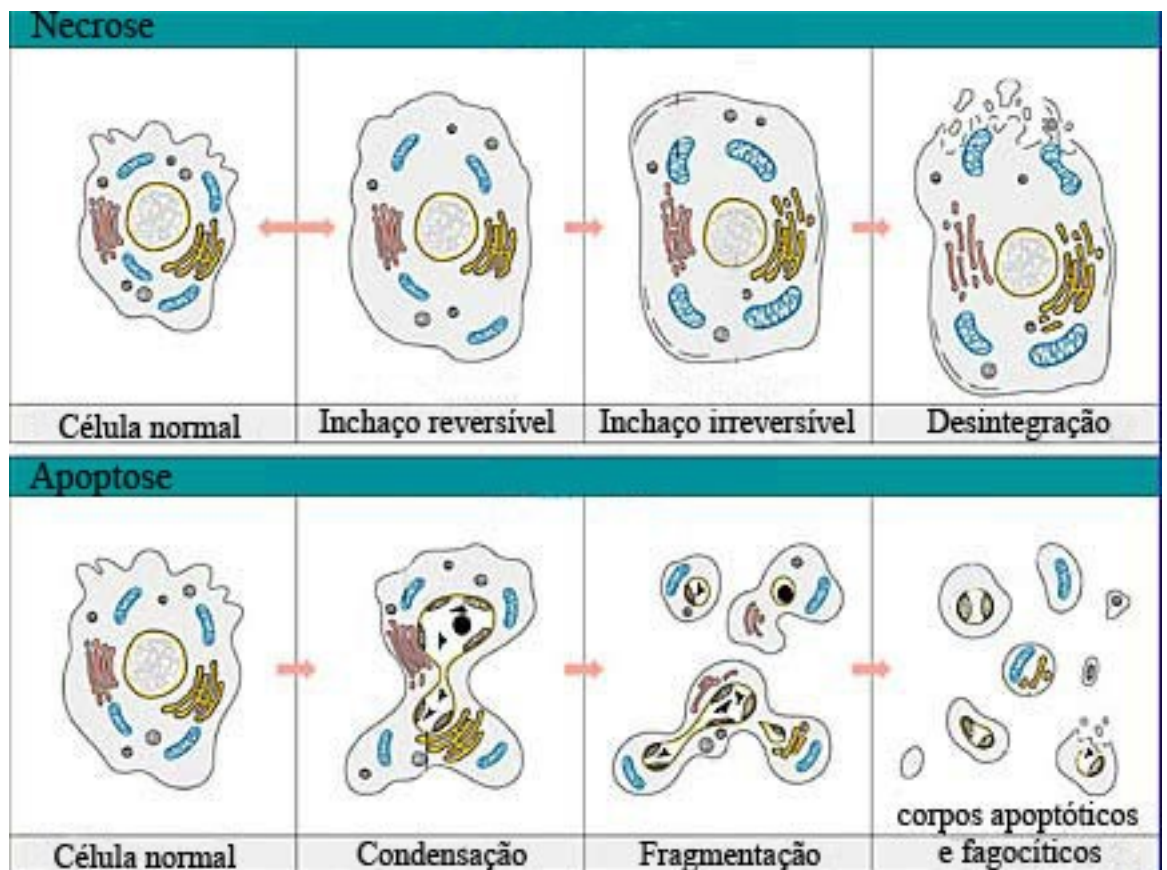
Pacientes com redução da função ou da perfusão renal, representam um importante fator de risco para NIMC, as partículas que constituem os meios de contraste radiológicos induzem mudanças funcionais e estruturais em sua passagem pelos rins. O dano renal é evidenciado por vacuolização citoplasmática e perda da borda em escova das células dos túbulos contorcidos proximais, causadas por toxicidade tubular direta (CAMPOS *et al*, 2010)

É importante ter conhecimento da dose de contraste administrada, volumes maiores que 5 mL/kg estão associados ao desenvolvimento de NIMC com necessidade de tratamento dialítico e, portanto, deve-se sempre que possível administrar doses menores (KRAMER *et al.*, 2008).

## **1.5 Morte celular**

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre suas diversas células. Na fase de desenvolvimento embrionário, algumas células que são produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para formação dos diversos tecidos e órgãos. Por vários anos, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A morte celular é a perda irreversível da estrutura e funções vitais da célula. Esta morte pode acontecer de duas maneiras morfológicamente diferentes: necrose e apoptose (Figura1). A necrose celular é um processo passivo e acontece quando há depleção total do ATP e a apoptose é um processo ativo e necessita de reservas de ATP, pelo menos nas fases iniciais (PAROLIN; REASON, 2001).



**Figura 1**– Características morfológicas da apoptose e da necrose.

Fonte: <http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/bio40/apoptose/index.htm>

### 1.5.1 Necrose Celular

Na necrose acontece a ruptura celular, desencadeada por um insulto sofrido, que resulta no aumento do seu volume, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana e conseqüente ruptura. A liberação do seu conteúdo causa danos as células vizinhas e reação inflamatória local. É considerada uma resposta passiva à injúria celular (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; PAROLIN; REASON, 2001). Como conseqüência tem-se um grande número de células lesadas ao mesmo tempo, ocasionando alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Estudos recentes, sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG; THOMPSON, 2006).

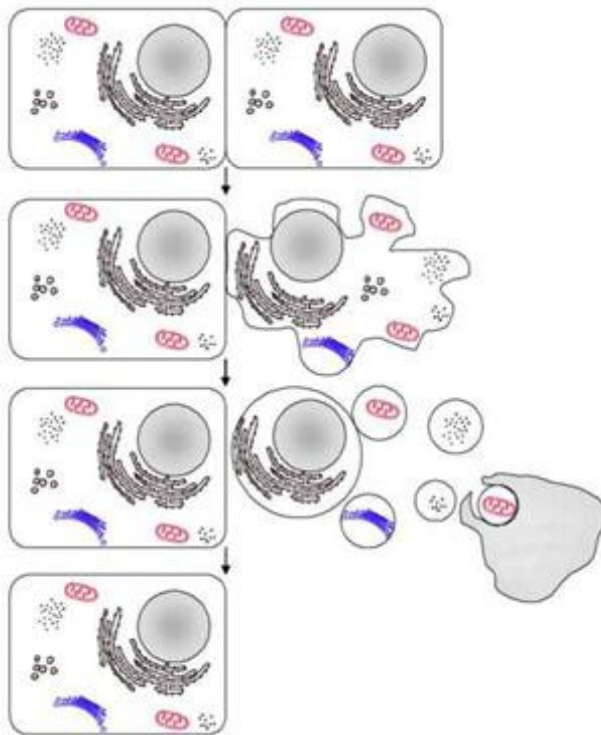
### 1.5.2 Apoptose Celular

Apoptose é tradicionalmente conhecida como morte celular programada, e possui características morfológicas próprias (HUGHES; GOBE, 2007).

A apoptose foi reconhecida morfológicamente, há mais de 30 anos por Kerr, Wyllie e Durrie (1972), como um fenômeno distinto de morte celular programada, que ocorre individualmente e não acarreta morte de outras células. Este tipo de morte celular participa de vários processos fisiológicos como o colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese. O mecanismo de apoptose é rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação entre célula e o meio externo (ISRAELS; ISRAELS, 1999).

Os membros da família de proteínas Bcl-2 participam ativamente como indutoras e repressoras de morte por apoptose. Alguns membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, prevenindo a liberação do citocromo c, são chamados reguladores antiapoptóticos, outros como; Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A expressão de Bcl-2 inibe a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabiliza o potencial de membrana da mitocôndria. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. A proteína supressora de tumor, o TP53, encontra-se implicado na interrupção do ciclo celular e indução de apoptose nas células com danos irreversíveis no DNA, sendo um regulador positivo da expressão da proteína Bax e negativo da proteína Bcl-2 (HALE; SMITH; SUTHERLAND, 1996; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

O processo apoptótico é desencadeado ativamente pela ativação de proteases endógenas e esta ativação compromete a integridade do citoesqueleto, provocando colapso da estrutura celular, acarretando retração da célula com perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares, em sua maioria, mantêm a sua morfologia, exceto as mitocôndrias que podem apresentar ruptura de sua membrana externa. Ocorre condensação da cromatina, concentrando-se junto da membrana nuclear, que encontra-se intacta. Em seguida o núcleo desintegra-se, fragmentando-se envolto pela membrana nuclear (Figura 2). Finalmente a célula fragmenta-se circundada por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas, formando os corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; PAROLIN; REASON, 2001).



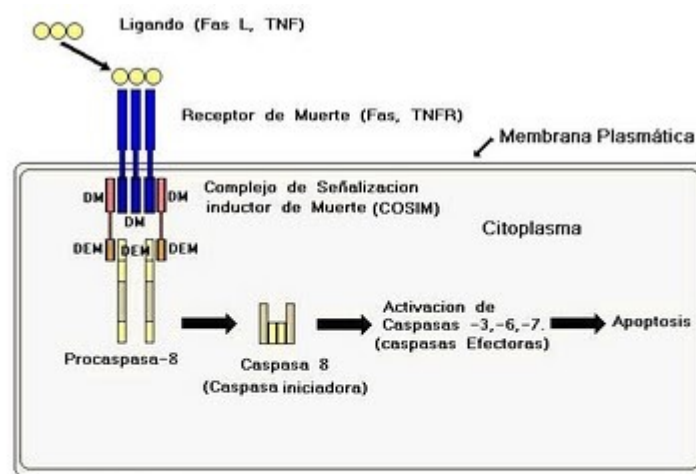
**Figura 2** – Etapas do processo de morte celular por apoptose: condensação, fragmentação e liberação dos corpos apoptóticos.

Fonte: <http://www.artigosobre.com/Aoptose>.

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos (via extrínseca ou citoplasmática), através de receptores específicos, que são receptores de Fator de Necrose Tumoral (rTNF), localizados na membrana celular, denominados receptores da morte, ou por fatores internos (via intrínseca ou mitocondrial) de estresse intracelular, desencadeado por agentes citotóxicos, danos no DNA, radiação, agentes quimioterápicos e níveis aumentados de

espécies reativas de oxigênio. As diferentes vias possuem em comum, a ativação de proteases conhecidas como caspases, que possuem importante papel no processo de morte celular. Atualmente são conhecidas 14 caspases, destas seis participam da apoptose (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10). Elas podem ser classificadas de acordo com o seu papel na apoptose, caspases iniciadoras que estão envolvidas no processo inicial da cascata proteolítica, possuem pró-domínio longo, como exemplo tem-se a caspase-8, e caspases efetoras que são responsáveis pela clivagem de substratos, possuem pró-domínio curto ou inexistente, caspase-3 (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; PAROLIN; REASON, 2001).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos aos receptores, rTNF, presente na membrana celular, esta ligação ativa a cascata das caspases. Ocorre uma trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos, possibilitando a ligação destes a uma proteína adaptadora presente no citosol, denominada Fas, este complexo liga-se aos receptores de morte ativando a caspase-8 (Figura 3). A caspase-8 diretamente ou pela via mitocondrial ativa a caspase-3, uma caspase executora de apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

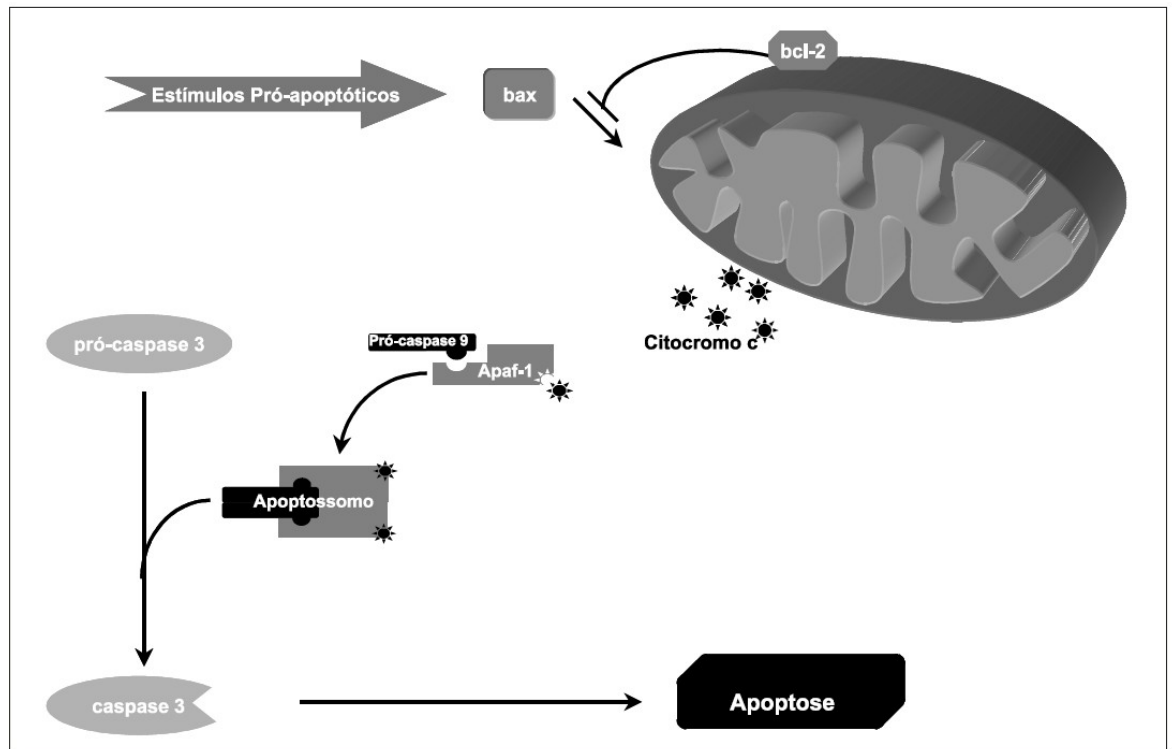


**Figura 3** – Vias de sinalização da apoptose. Na via extrínseca há ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática.

Fonte: <http://senevisionic.blogspot.com/>

A via intrínseca é desencadeada por estresse intracelular, quando na maioria das vezes o principal mediador é a mitocôndria. No momento que aparece sinais de estresse intracelular ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid, etc) do citosol para a mitocôndria (Figura 4), esta translocação resulta na liberação de citocromo-c para o citosol, este está presente no espaço entre a membrana mitocondrial interna e externa. O citocromo-c,

no citosol, forma um complexo com o fator ativador de apoptose-1 (apaf-1), levando a ativação da caspase-9, que ativa caspases efetoras (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; PAROLIN; REASON, 2001).



**Figura 4** – Via intrínseca de ativação da apoptose

Fonte: GRIVICICH, REGNER e ROCHA (2007).

Em tecido renal normal o Fas e a proteína Bcl-2 são pouco expressos. Contudo, em pacientes com doenças glomerulares foram identificadas células positivas para o Fas tanto no mesângio quanto ao longo dos capilares glomerulares. Assim, dados experimentais existentes até o momento são altamente sugestivos de que a apoptose mediada pelo sistema Fas é responsável pela perda deletéria de células glomerulares na evolução dessas afecções (BONINI; MOURA; FRANCO, 2000). Em relação à proteína Bcl-2, durante o desenvolvimento renal normal, sua expressão no condensado de néfrons é essencialmente necessária para evitar altos níveis de apoptose e está relacionada com a formação estrutural da morfogênese tubular e do metanéfron (LIN *et al.*, 1999).

Em estudo experimental foi observado que o meio de contraste induz apoptose das células renais, dose e tempo dependente, através da ativação da via intrínseca ou mitocondrial. Neste estudo foi demonstrado que o meio de contraste induz apoptose de células tubulares



renais por três importantes vias de sinalização, que são elas: Via das espécies reativas de oxigênio (ROS), via das Kinases e via intrínseca da apoptose, que são acionadas pelo meio de contraste nesta sequência. Estimula também a apoptose das células renais por indução do aumento dos membros (BID, BAX e BAK) da família das Bcl2, pró-apoptóticas e por mediar a ativação da caspase 3 (QUINTAVALLE *et al.*, 2011).

# JUSTIFICATIVA

## 2. JUSTIFICATIVA

Os contrastes iodados estão entre as mais prescritas medicações da história da medicina moderna, e em 2003, aproximadamente 80 milhões de doses foram administradas mundialmente, correspondendo a 8 milhões de litros (ROUSSEFF, 2010).

Os meios de contraste iodados são amplamente utilizados em procedimentos médicos, diagnósticos e terapêuticos, tornando-se imprescindíveis na prática médica atual. Apesar da

evolução e desenvolvimento de novos meios de contraste, os contrastes permanecem como a terceira causa iatrogênica de insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados e está associado com taxa de mortalidade elevada, acima de 34% (ULTRAMARI *et al.*, 2006; EDUARDO *et al.*, 2008).

A fisiopatologia da nefropatia induzida por meio de contraste (NIMC) não é totalmente conhecida. Acredita-se que sua etiologia seja multifatorial com contribuição importante de fatores vasculares e tubulares. Parece ser uma combinação de toxicidade tubular direta do contraste e de isquemia medular renal (COSTA; VIEIRA NETO; MOYSÉS NETO, 2003; ULTRAMARI *et al.*, 2006).

A NIMC pode aumentar o tempo de internação, os custos do atendimento e a morbimortalidade intra-hospitalar (ANDRADE; SEGURO, 1997).

Embora tenha-se observado um aumento no número de estudos sobre a nefrotoxicidade causada pelos meios de contraste, ainda existem várias lacunas nos processos envolvidos desde sua fisiopatologia até o tratamento. Estudos detalhados fazem-se necessários para tentar elucidar a patogênese da NIC e, possivelmente futuras intervenções profiláticas e/ou terapêuticas (ULTRAMARI *et al.*, 2006).

Foi observado que a resposta a injúria de células glomerulares e túbulo intersticial em muitas formas de doença renal incluem alteração no número celular (proliferação e apoptose) e hipertrofia (SHANKLAND; WOLF, 2000). O controle da morte celular pode ser de grande importância no tratamento de várias doenças (BONINI; MOURA; FRANCO, 2000). O papel da apoptose está bem definido no desenvolvimento renal normal; entretanto, sua participação na insuficiência renal aguda não está totalmente esclarecida. Existe forte evidência, baseada em achados moleculares, que apontam a importância da apoptose na patogênese da IRA (BASILE; LIAPIS; HAMMERMAN, 1997).

Assim, o referido estudo se propõe a avaliar os efeitos dos contrastes ioxitalamato de meglumina e iobitridol no sistema de perfusão de rim isolado, pois este sistema avalia os efeitos diretos de substâncias nos rins sem interferência de fatores sistêmicos, além de estudar os efeitos dos meios de contrastes também em linhagem de células do túbulo renal MDCK, pois as mesmas representam um tipo celular muito bem caracterizado em termos de propriedades funcionais e composição molecular (COLLARES-BUZATO *et al.*, 1994, 1998

apud PEIXOTO, 2003), constituindo um excelente modelo para avaliação de citotoxicidade *in vitro*.

Os estudos *in vivo*, com ratos em gaiolas metabólicas, após a administração venosa dos meios de contraste ioxitalamato de meglumina e iobitridol, possibilitarão a análise das alterações do metabolismo diário destes animais.

Nesta pesquisa estudamos também o papel da apoptose no efeito renal dos meios de contraste ioxitalamato de meglumina e iobitridol, pois a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência de IRA, bem como com a NIMC são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção desta Patogenia.

# OBJETIVOS

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

- Estudar os efeitos renais dos meios de contraste ioxitalamato de meglumina e iobitridol, na tentativa de elucidar os mecanismos de nefrotoxicidade e/ou contribuir para a descoberta de ferramentas farmacológicas.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar as alterações metabólicas de ratos após a administração venosa dos meios de contraste ioxitalamato de meglumina e iobitridol.

- Estudar os efeitos dos contrastes ioxitalamato de meglumina e iobitridol em rim isolado;

-Estudar os efeitos dos contrastes ioxitalamato de meglumina e iobitridol em células tubulares renais;

- Determinar os efeitos dos contrastes ioxitalamato de meglumina e iobitridol sobre a viabilidade e proliferação da linhagem celular em estudo;

- Avaliar o potencial apoptótico ou necrótico dos contrastes ioxitalamato de meglumina e iobitridol;

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300gr, pertencentes ao Biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.2 Avaliação do Metabolismo Diário

Para avaliação do metabolismo diário, cada animal foi previamente pesado e colocado em uma gaiola metabólica individual em aço inoxidável. A gaiola dispõe de comedouro, bebedouro, coletor de fezes e um Becker coletor de urina (Figuras 5A e 5B). Após um período de 24 horas de adaptação dos animais às novas condições, eles foram novamente pesados e iniciava-se o tratamento com injeção de meio de contraste de alta osmolalidade, baixa osmolalidade e grupo controle com salina 0,9%, e retornavam a gaiola por um período de 24 a 72 horas após a administração do meio de contraste.

Durante o período que permaneciam na gaiola metabólica eram aferidos diariamente, entre 14 e 15 horas, peso, ingesta de ração e água e eliminação de urina. Para cada animal, os seguintes procedimentos foram adotados:

- **Peso corporal:** O peso corporal era aferido em balança digital.
- **Ração** - A quota oferecida (QO) em gramas de dieta (Biotec<sup>®</sup>) era colocada no comedouro. Os rejeitos limpo (RL) e sujo (RS) em gramas, deixados 24 horas depois pelo animal, respectivamente, dentro e fora do comedouro, eram pesados. Todas as pesagens eram realizadas em balança digital.
- **Água** - A quota de água oferecida (QAO) cada dia, em bebedouro é padronizada em 100mL. Após 24 horas, era quantificada em proveta graduada, o rejeito de água (RA) em mL encontrado no bebedouro.
- **Urina** - A urina coletada era medida em proveta graduada.





**Figura 5** - Fotografias da gaiola metabólica vista anterior (A) e lateral (B)

### 4.3 Grupos Experimentais

Grupo Controle: Ratos (n=09) pré tratados com solução salina 0,9% e mantidos na gaiola metabólica por 24, 48 e 72 horas.

Grupo tratado alta osmolalidade 24 horas: Ratos (n=5) pré tratados com meio de contraste de alta osmolalidade, mantidos na gaiola por 24 horas.

Grupo tratado alta osmolalidade 48 horas: Ratos (n=5) pré tratados com meio de contraste de alta osmolalidade, mantidos na gaiola por 48 horas.

Grupo tratado alta osmolalidade 72 horas: Ratos (n=5) pré tratados com meio de contraste de alta osmolalidade, mantidos na gaiola por 72 horas.

Grupo tratado baixa osmolalidade 24 horas: Ratos (n=5) pré tratados com meio de contraste de baixa osmolalidade, mantidos na gaiola por 24 horas.

Grupo tratado baixa osmolalidade 48 horas: Ratos (n=5) pré tratados com meio de contraste de baixa osmolalidade, mantidos na gaiola por 48 horas.

Grupo tratado baixa osmolalidade 72 horas: Ratos (n=5) pré tratados com meio de contraste de baixa osmolalidade, mantidos na gaiola por 72 horas.

Os animais dos grupos de 72 horas eram submetidos à nefrectomia bilateral para perfusão de rim isolado e análise histopatológica.

#### 4.4 Administração da Droga do Estudo

Os animais eram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal (IP). A veia peniana era puncionada com agulha 13x4,5G e administrado a solução salina 0,9%, meio contraste de alta osmolalidade ou meio de contraste de baixa osmolalidade na dose de 5mL/Kg (Figura 6).



**Figura 6** - Fotografia da administração da droga

#### 4.5 Nefrectomia Esquerda

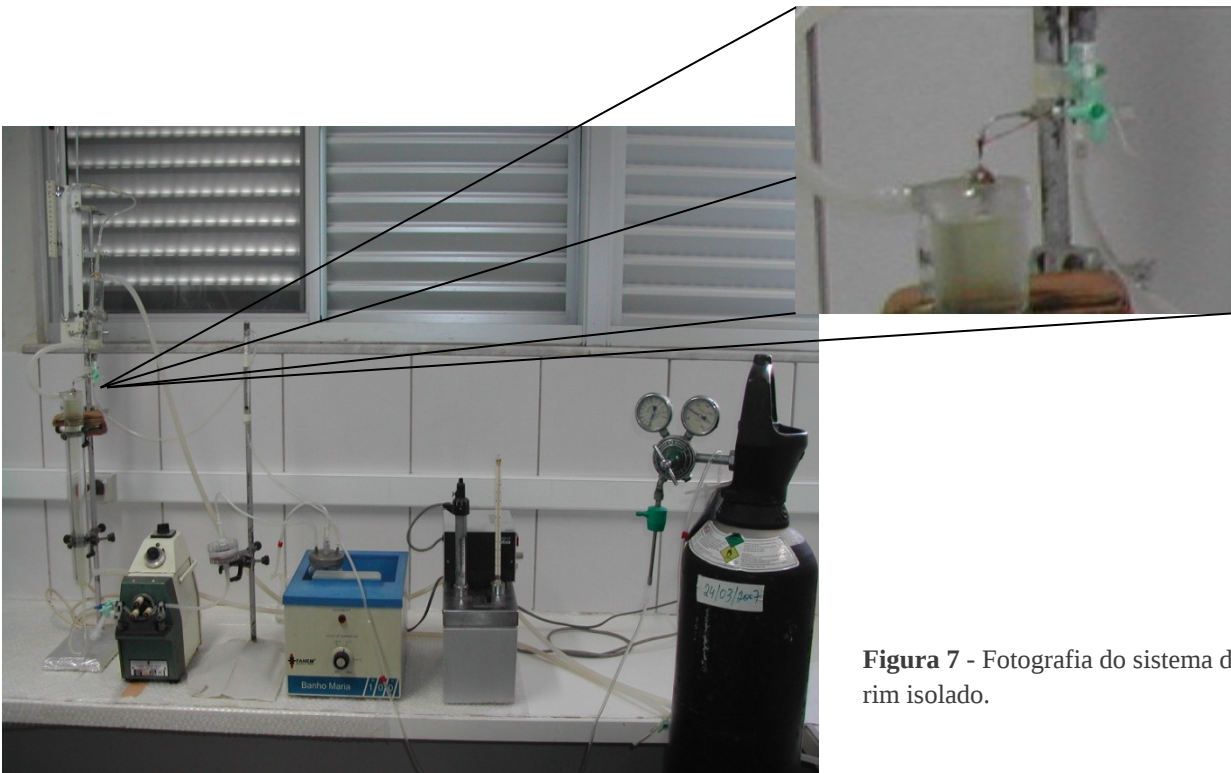
Os animais dos grupos tratados com salina, contraste de alta e baixa osmolalidade com 72 horas, eram submetidos à nefrectomia esquerda e o rim encaminhado para análise histopatológica.

A nefrectomia esquerda, foi realizada através de uma incisão na parede abdominal com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, para facilitar a manipulação. As vísceras eram rebatidas para o lado direito e visualizado o rim esquerdo. O rim era então retirado, dividido ao meio e colocado em solução de formol a 10% e em seguida encaminhado para o Departamento de Patologia e Medicina Legal para confecção das lâminas.

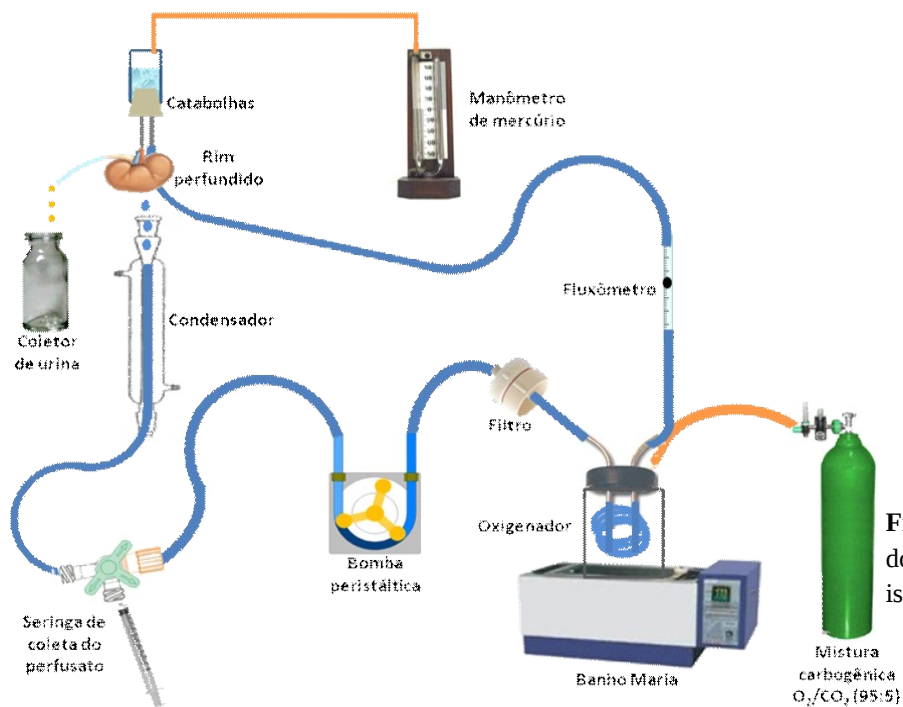
#### 4.6 Perfusão de Rim Isolado

#### 4.6.1 Sistema de Perfusão

A perfusão de rim isolado consiste em um método desenvolvido para o estudo da função renal, onde o rim é mantido fora do organismo em condições semelhantes as observadas no organismo vivo. Este sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles, 1983; Monteiro, 1990; Fonteles, 1999) composto por dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado para perfusão *in vitro*, ambos mantidos a mesma temperatura de 37°C. Esse sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina 6g% na solução Krebs-Hanseleit, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, além de possuir uma oxigenação (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) adaptada ao próprio sistema (Figuras 7 e 8).



**Figura 7** - Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado.



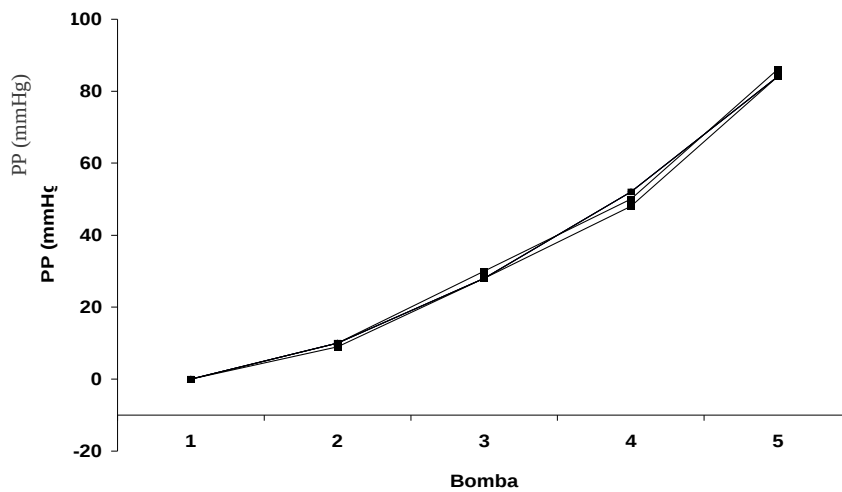
**Figura 7** - Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.

O sistema utilizado de perfusão é constituído pelos seguintes componentes:

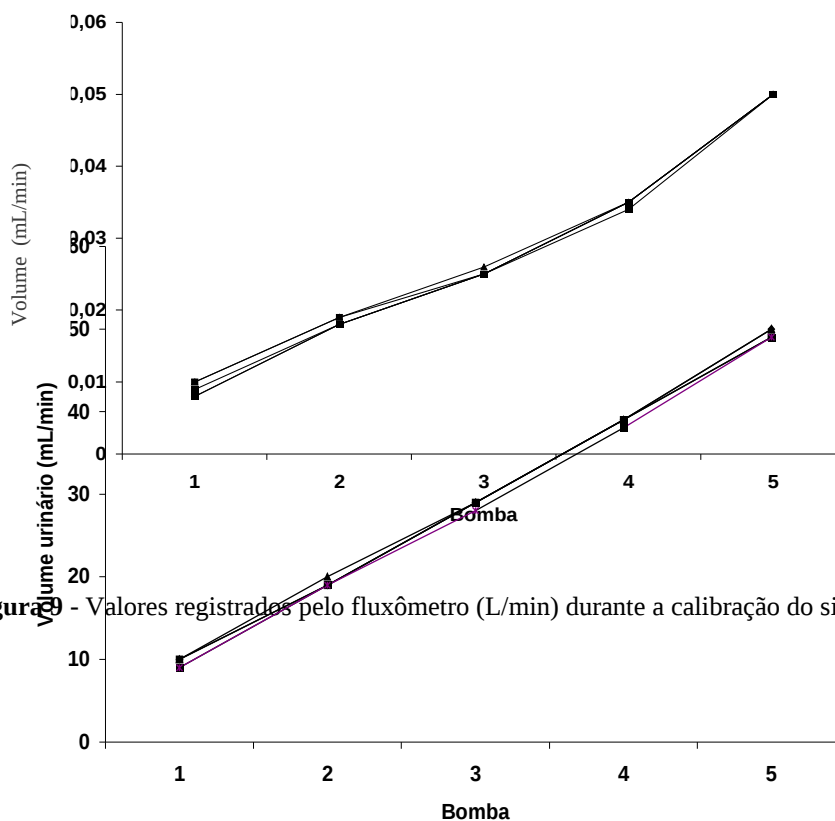
- **Banho-maria** - para a manutenção da temperatura constante do pulmão artificial entre 36 e 37 °C;
- **Bomba aquecedora com termostato** - para manutenção da temperatura do perfusato entre 36 e 37 °C;
- **Bomba de perfusão de Watson** - bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema;
- **Catabolhas** - evita a entrada de bolhas nos rins;
- **Coletor de urina** – frasco que coleta a urina, trocados em intervalos de 10 minutos;
- **Condensador** – reservatório da solução perfusora;
- **Filtro Millipore 5 µm** – filtra a solução perfusora;
- **Fluxômetro** – para mensurar o fluxo de perfusão (mL/hora);
- **Manômetro de mercúrio** – para mensurar a pressão de perfusão (mmHg);
- **Pulmão tipo silástico** – promove as trocas gasosas (95% O<sub>2</sub> e 5%CO<sub>2</sub> );
- **Seringa coletora** – seringa coletora de perfusato, realizada a coleta a cada 10 minutos.

#### 4.6.2 Calibração do Sistema

A calibração do sistema foi realizada antes de cada experimento com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foram registrados para cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5) a pressão de perfusão (mmHg), o fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um min (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As Figuras 9, 10 e 11 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.



**Figura 8** - Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 9** - Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).

**Figura 10** - Valores de volume de solução salina (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

#### 4.6.3 Solução Perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES, 1998), concentrada 20 vezes, continha NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O = 3,2g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO<sub>3</sub> = 4,2g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual adicionou-se albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada auxiliada por homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

A solução de Krebs-Henseleit modificada para diálise foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, a solução perfusora foi acrescida com 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3 a 7,4.

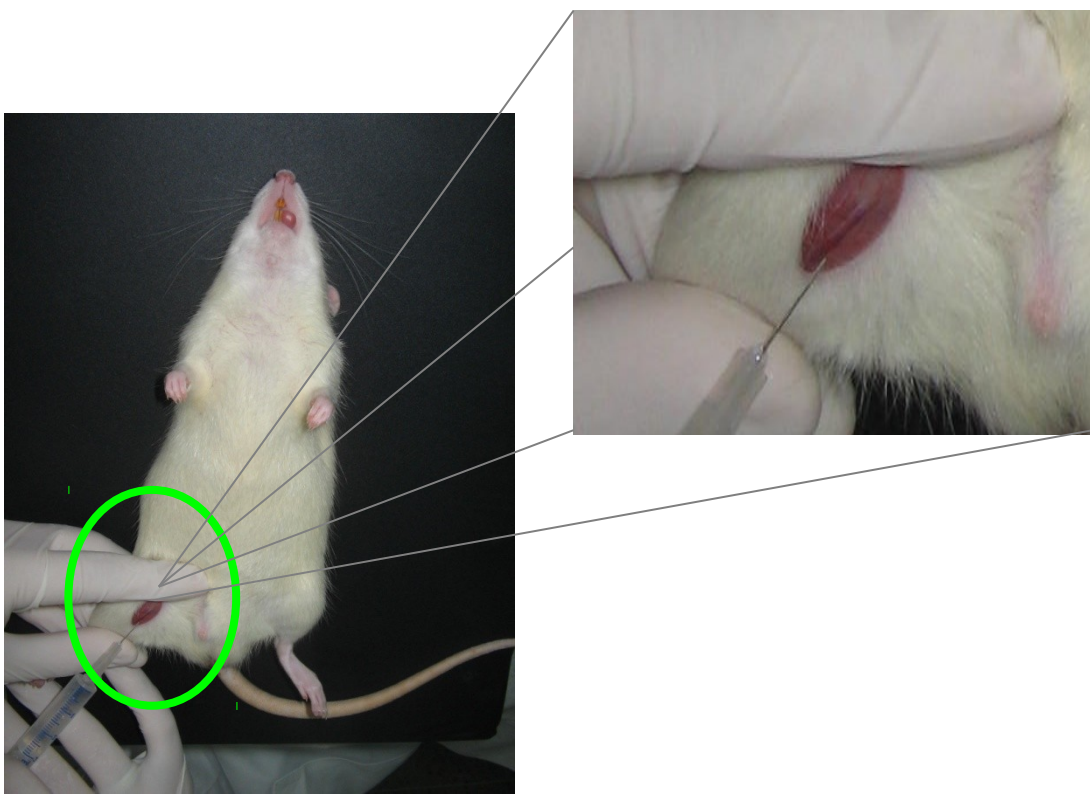
#### 4.6.4 Técnica Cirúrgica

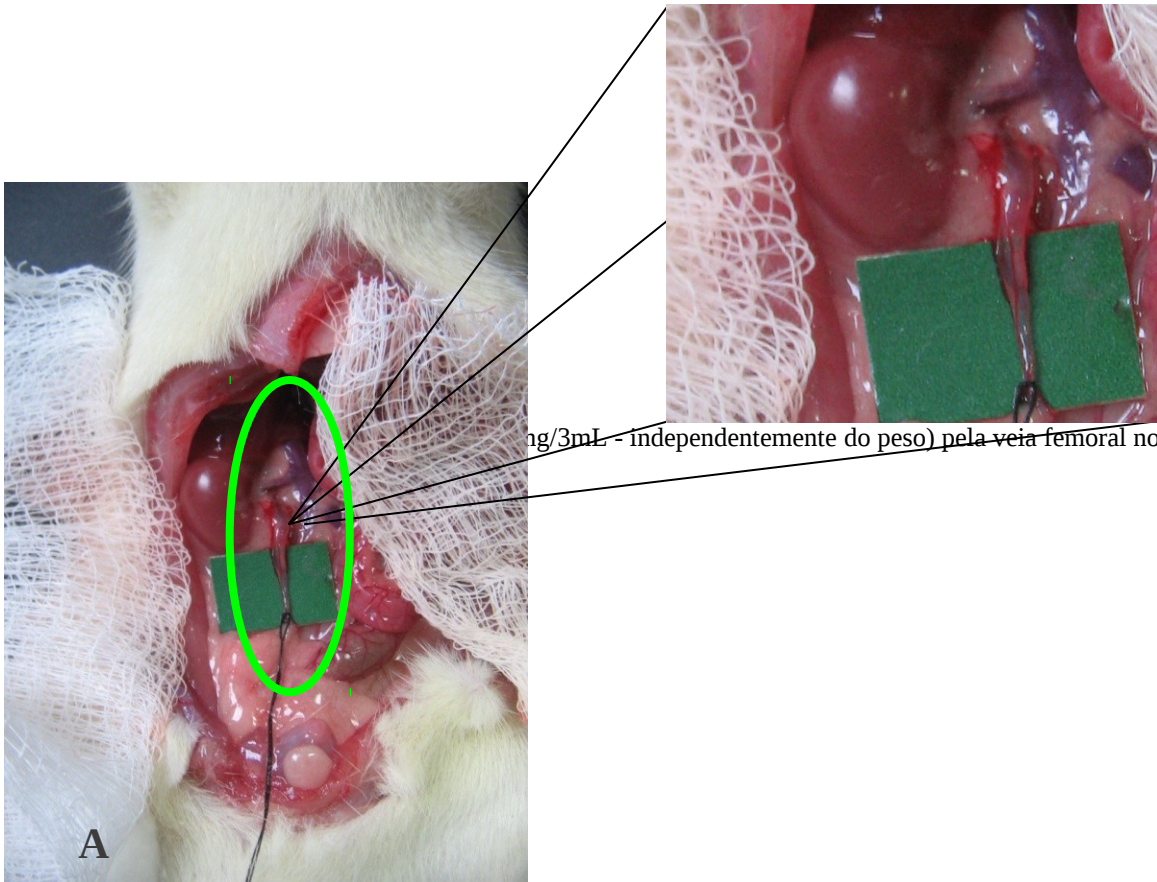
As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhnamann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Nishiitsutji-Uwo *et al.* (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Os animais (n=4) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/kg de peso corporal. Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol (100mg/mL – 3 mL, independentemente do peso) foi administrado (Figura 12), a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatômicas abdominais (Figura 13). Com uma lupa (aumento de 7 x) o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30 (Figura 14).

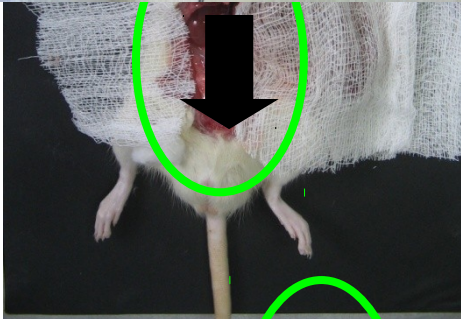
A artéria renal foi isolada (Figura 15B) e canulada (Figura 16) através da artéria mesentérica superior.

Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (Figura 17).





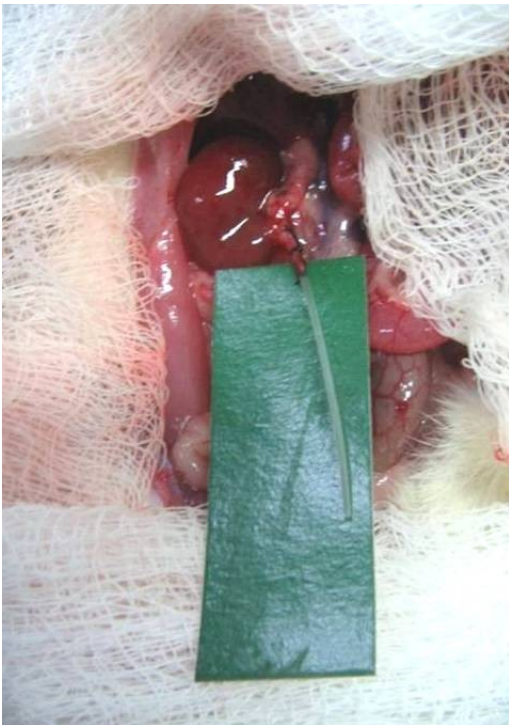
ng/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal



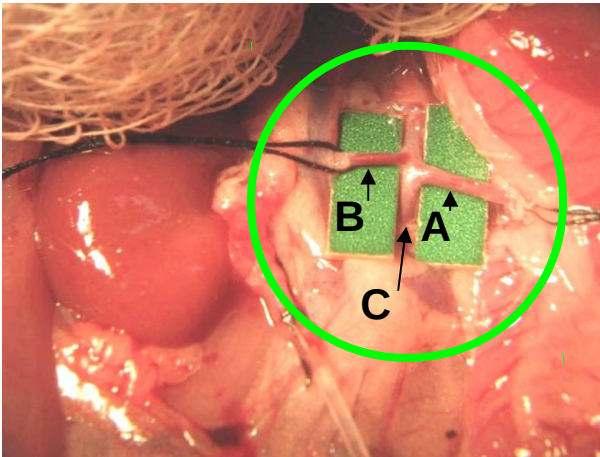
**Figura 12** - Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.

**B**

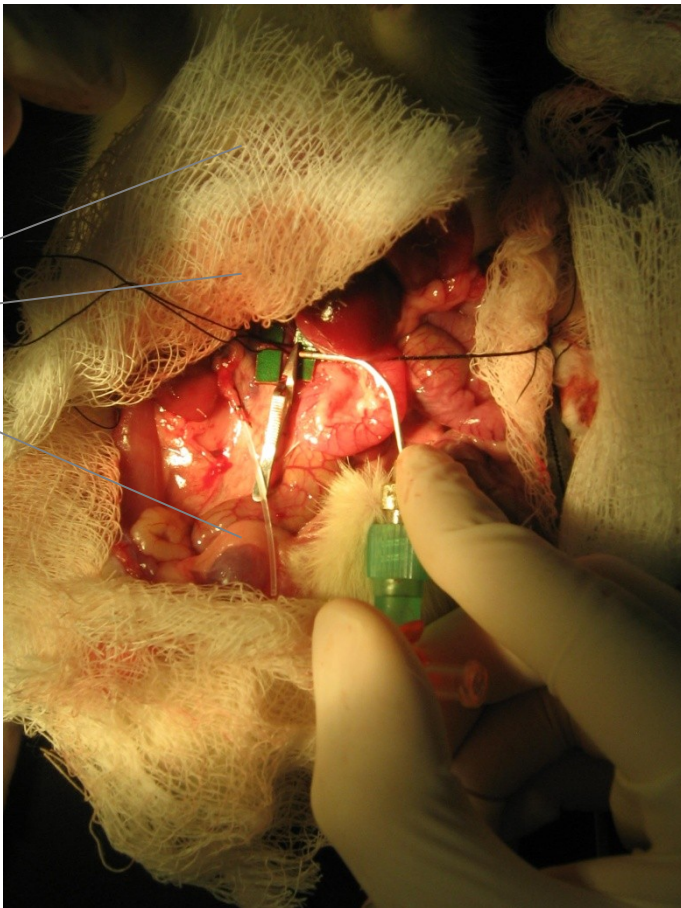




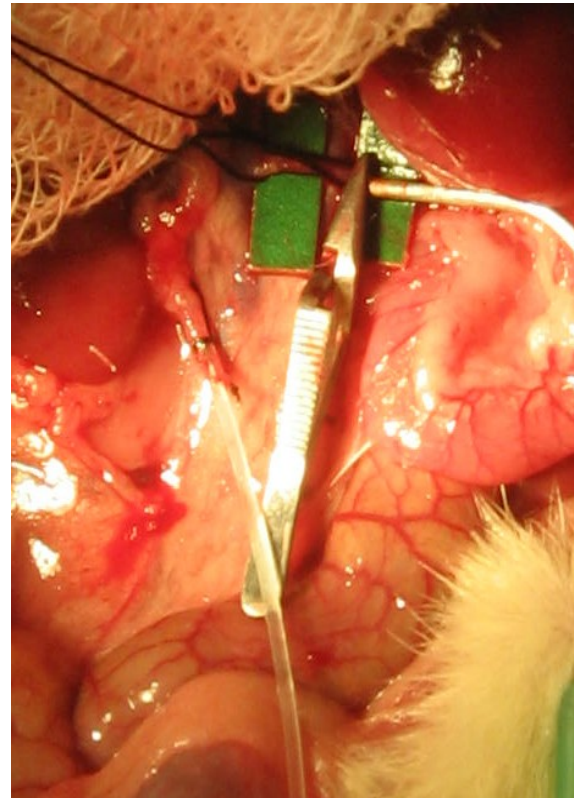
**Figura 13 - Identificação (A) e canulação (B) do ureter do rim direito de rato Wistar.**



**Figura 14** - Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C)



**Figura 15** - Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.





**Figura 16** - Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.

#### 4.6.5 Grupos Experimentais

O estudo dos meios de contraste sobre a função renal, foi avaliado após um período de adaptação ao sistema de aproximadamente 20 minutos. O tempo total de perfusão foi de 120 minutos.

- Grupo controle: Animais pré-tratados com solução salina 0,9% (n = 3);
- Grupo contraste alta osmolalidade: Animais pré-tratados com contraste de alta osmolalidade - ioxitalamato de meglumina (n=5)
- Grupo contraste baixa osmolalidade: Animais pré-tratados com contraste de baixa osmolalidade - iobitridol (n=5)

#### 4.6.6 Protocolo Experimental

Após colocado no sistema de perfusão passavam por um período de adaptação de aproximadamente 20 minutos. Depois de decorrido este tempo, os experimentos foram iniciados. O tempo total de perfusão do órgão foi de 120 minutos. Durante esse período, foram coletadas a cada 5 minutos as medidas do fluxo e da pressão de perfusão. Em intervalos

de 10 minutos, foram coletados urina e perfusato, alternadamente. Estes frascos com urina foram mensurados seus volumes e, juntamente com os frascos de perfusato, congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e determinação da osmolaridade, importantes na determinação dos seguintes parâmetros de função renal: pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio ( $\%T\text{Na}^+$ ), potássio ( $\%T\text{K}^+$ ) e cloreto ( $\%T\text{Cl}$ ).

#### 4.6.7 Análises Bioquímicas dos Perfusatos e Urinas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando aparelho de íons eletrodos seletivos (RapidChem 744 – Bayer® diagnóstica).

A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles *et al.* (1983) com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – modelo 5520 ESCOR).

#### 4.6.8 Cálculo dos Parâmetros Funcionais Renais

A figura 18 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais. Os cálculos demonstrados foram realizados em planilhas do *software* Microsoft Office Excel 2007® (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1983).

<b>FU</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FU (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo urinário</b></li> <li>• <math>FU = (\text{Peso do volume urinário} / \text{Peso do rim esquerdo}) / 10</math></li> </ul>
<b>PP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PP (mmHg) = Pressão de perfusão</b></li> <li>• Leitura em manômetro</li> </ul>
<b>RFG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RFG (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Ritmo de filtração glomerular</b></li> <li>• <math>RFG = (\text{DOU in} / \text{DOP in} \times FU)</math> sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato</li> </ul>
<b>FPR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FPR (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo de perfusão renal</b></li> <li>• Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)</li> </ul>
<b>RVR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RVR (mmHg.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Resistência vascular renal</b></li> <li>• <math>RVR = PP \text{ (mmHg)} / FPR</math></li> </ul>
<b>FNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio filtrado</b></li> <li>• <math>FNa^+ = RFG \times PNa^+</math> (<math>PNa^+</math> = Concentração de sódio no perfusato)</li> </ul>
<b>ENa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ENa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio excretado</b></li> <li>• <math>ENa^+ = FU \times UNa^+</math> (<math>UNa^+</math> = Concentração de sódio na urina)</li> </ul>
<b>TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio transportado</b></li> <li>• <math>TNa^+ = FNa^+ - ENa^+</math></li> </ul>
<b>%TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TNa<sup>+</sup> = Percentual de transporte de sódio transportado</b></li> <li>• <math>\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+</math></li> </ul>
<b>%TpNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TpNa<sup>+</sup> = Percentual de transporte proximal de sódio</b></li> <li>• <math>\%TpNa^+ = TpNa^+ \times 100 / FNa^+</math></li> </ul>
<b>FK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio filtrado</b></li> <li>• <math>FK^+ = RFG \times PK^+</math> (<math>PK^+</math> = concentração de potássio no perfusato)</li> </ul>
<b>EK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio excretado</b></li> <li>• <math>EK^+ = FU \times UK^+</math> (<math>UK^+</math> = Concentração de potássio na urina)</li> </ul>
<b>TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio transportado</b></li> <li>• <math>TK^+ = FK^+ - EK^+</math></li> </ul>
<b>%TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TK<sup>+</sup> = Percentual de transporte de potássio</b></li> <li>• <math>\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+</math></li> </ul>
<b>%TpK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TpK<sup>+</sup> = Percentual de transporte proximal de potássio</b></li> <li>• <math>\%TpK^+ = TpK^+ \times 100 / FK^+</math></li> </ul>
<b>FCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto filtrado</b></li> <li>• <math>FCl^- = RFG \times PCl^-</math> (<math>PCl^-</math> = Concentração de cloreto no perfusato)</li> </ul>
<b>ECl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ECl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto excretado</b></li> <li>• <math>ECl^- = FU \times UCl^-</math> (<math>UCl^-</math> = Concentração de cloreto na urina)</li> </ul>
<b>TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto transportado</b></li> <li>• <math>TCl^- = FCl^- - ECl^-</math></li> </ul>
<b>%TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TCl<sup>-</sup> = Percentual de transporte de cloreto</b></li> <li>• <math>\%TCl^- = TCl^- \times 100 / FCl^-</math></li> </ul>
<b>%TpCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TpCl<sup>-</sup> = Percentual de transporte proximal de cloreto</b></li> <li>• <math>\%TpCl^- = TpCl^- \times 100 / FCl^-</math></li> </ul>
<b>C<sub>osm</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cosm (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Clearance osmótico</b></li> <li>• <math>[U_{osm} / P_{osm}] \times FU</math> (onde <math>U_{osm}</math> = Osmolaridade urinária e <math>P_{osm}</math> = Osmolaridade do perfusato)</li> </ul>

**Figura 17** - Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados.

Fonte: SOUSA (2010)

#### 4.6.9 Análise Histopatológica

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (controle), os quais foram armazenados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (Nikon) em colaboração com o Professor Dr. Dalgimar Beserra de Menezes do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará.

### 4.7 Ensaio com Cultura de Células

#### 4.7.1 Cultivo das Células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)

As células *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) são o melhor modelo estabelecido de células renais tubulares distais e, portanto, são amplamente utilizadas em diversos protocolos experimentais (WIEGELE; BRANDIS; ZIMMERHACKL, 1998; FÜLLEKRUG *et al.*, 2006).

As células MDCK foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL para células em suspensão) (figura 19); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992).

#### 4.7.2 Avaliação de morte celular por apoptose/necrose

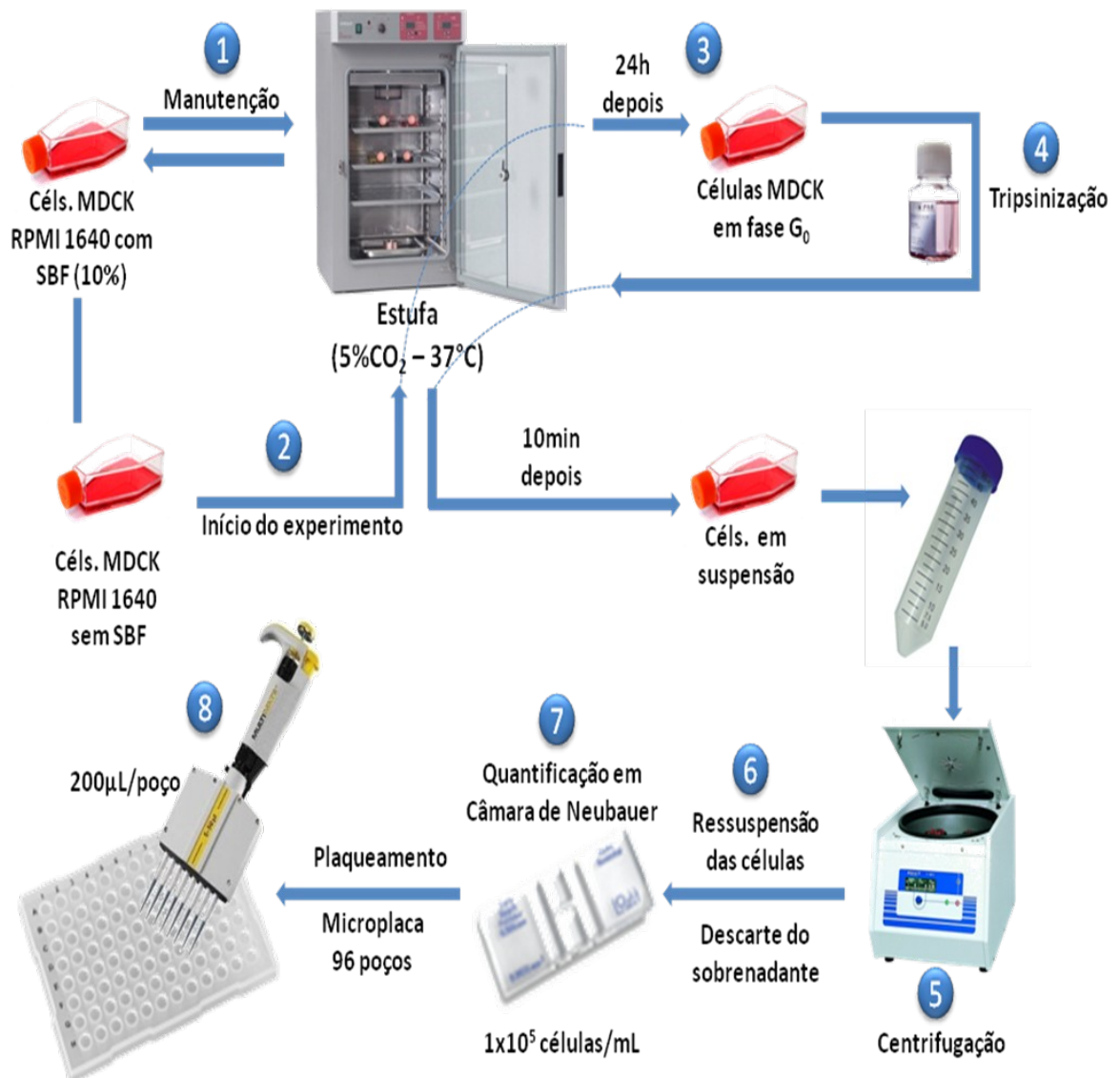
##### 4.7.2.1 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo

Nesse estudo foi analisada a capacidade dos contrastes iodados de alta e de baixa osmolalidade induzir apoptose e/ou necrose utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V

com o kit BD Pharmingen™ Annexin V-FITC. A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolipídios de membrana plasmática, através 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 (ENGELAND *et al.*, 1998). Dessa forma, a externalização da fosfatidilserina e a ligação de anexina V é uma evidência da apoptose (MOCHIZUKI *et al.*, 2004). A anexina V pode ser conjugada com fluórocromos como o FITC 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 iodeto de propídeo (IP). O corante iodeto de propídeo se liga ao DNA e emite alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante iodeto de propídeo, no entanto, as células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência. As células viáveis apresentarão baixa fluorescência podendo distinguir as células em apoptose precoce (FITC positivas) das células em necrose (IP positivas). As células viáveis também são diferenciadas por serem FITC e IP negativas. No entanto, células em apoptose tardia se coram com ambos FITC e IP 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).

As células MDCK foram tratadas com contraste iodado de alta e de baixa osmolalidade 10 µg/mL. Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi coletado, colocado em um tubo (50 mL) e centrifugado a 500 x g por 10 min para coletar células em suspensão. As células aderidas a placa foram lavadas com PBS três vezes e tripsinizadas. O “pellet” obtido após a tripsinização foi ressuspenso no meio que foi retirado do frasco e separado previamente. As células foram centrifugadas novamente e o “pellet” então, ressuspenso em 500µL de tampão do Kit para detecção de apoptose e necrose. Foram retirados 100µL desta suspensão e colocados em frasco para citômetro. Em seguida foi adicionado 5µL de anexina V, iodeto de propídeo, ou ambos, em cada frasco do citômetro, os quais ficaram em incubação por 15 minutos protegidos com papel alumínio. Por fim, foi adicionado 400µL do tampão e os frascos foram levados para o citômetro de fluxo.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACS, BD, New Jersey, USA). Os dados foram obtidos através do software Cell Quest e os resultados foram analisados através do software WinMDI.



**Figura 18** - Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).



#### **4.8 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde  $n$  representa o número de experimentos. Para as comparações estatísticas entre três grupos utilizou-se análise de variância ANOVA seguida do teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas estatísticos *Graph Pad Prism 5.0* (USA).

#### **4.9 Aspectos Éticos**

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e aprovado sob o protocolo número 108/11.

# **RESULTAD OS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do metabolismo diário de animais tratados com contrastes Ioxitalamato de Meglumina (alta osmolalidade) e Iobitridol (baixa osmolalidade) e mantidos em gaiola metabólica

Foram avaliados parâmetros metabólicos diários como diurese, ingesta hídrica e consumo de alimento, em animais que receberam solução salina (n=09), contraste de alta osmolalidade (n=15) e contraste de baixa osmolalidade (n=15). Esta avaliação era realizada diariamente e no mesmo horário.

Observamos um aumento significativo no consumo de água do grupo que recebeu contraste de alta osmolalidade, no tempo de 24 horas, quando comparado ao grupo controle (Figura 20).

Ao avaliar a diurese, verificou-se aumento significativo na diurese do grupo de alta osmolalidade, quando comparado ao grupo controle, no tempo de 24 horas. Observa-se também um aumento significativo deste volume no grupo de alta osmolalidade, no tempo de 24 horas, quando comparamos com os tempos de 48 e 72 horas (Figura 21).

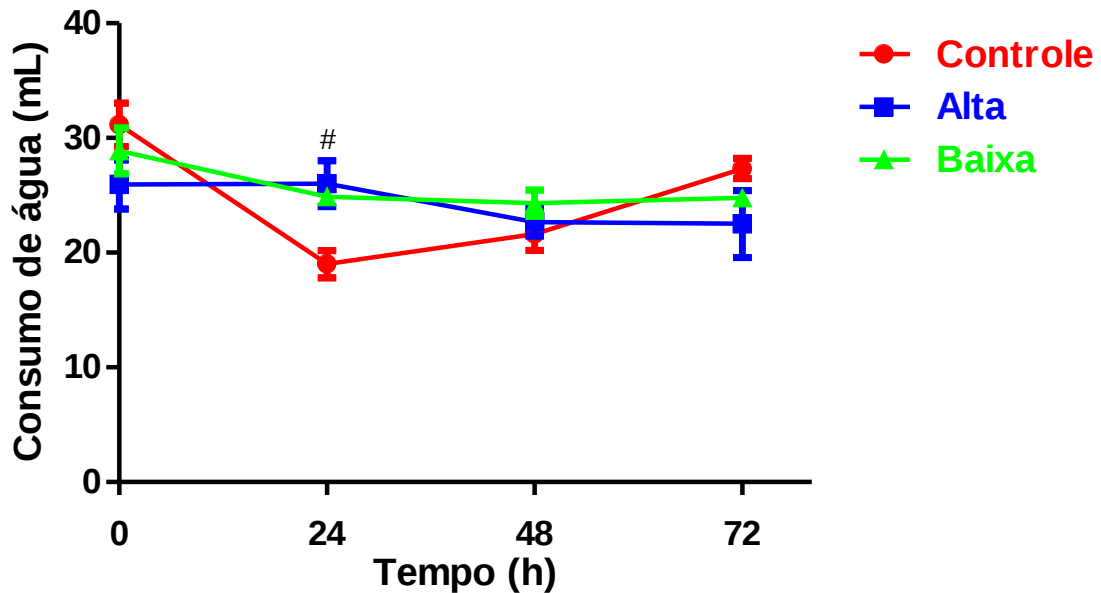
Avaliando o consumo de alimento, não foi observado alterações significativas entre os três grupos (Figura 22).

**Tabela 1** – Consumo de água (mL) nos grupos controle (n=10), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).

<b>Tempo (Horas)</b>	<b>Controle</b>	<b>Alta</b>	<b>Baixa</b>
<b>zero</b>	<b>31,14±1,908</b>	<b>25,95±2,134</b>	<b>28,89±2,010</b>
<b>24</b>	<b>19,00±1,175</b>	<b>26,00±2,000#</b>	<b>24,89±0,679</b>
<b>48</b>	<b>21,60±1,400</b>	<b>22,67±1,239</b>	<b>24,31±1,129</b>
<b>72</b>	<b>27,33±0,882</b>	<b>22,50±2,922</b>	<b>24,80±0,374</b>

Resultados expressos em média ± EPM

#p< 0,05 para comparação entre os grupos controle e alta osmolalidade



**Figura 19** - Consumo de água nos grupos controle (n=10), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).

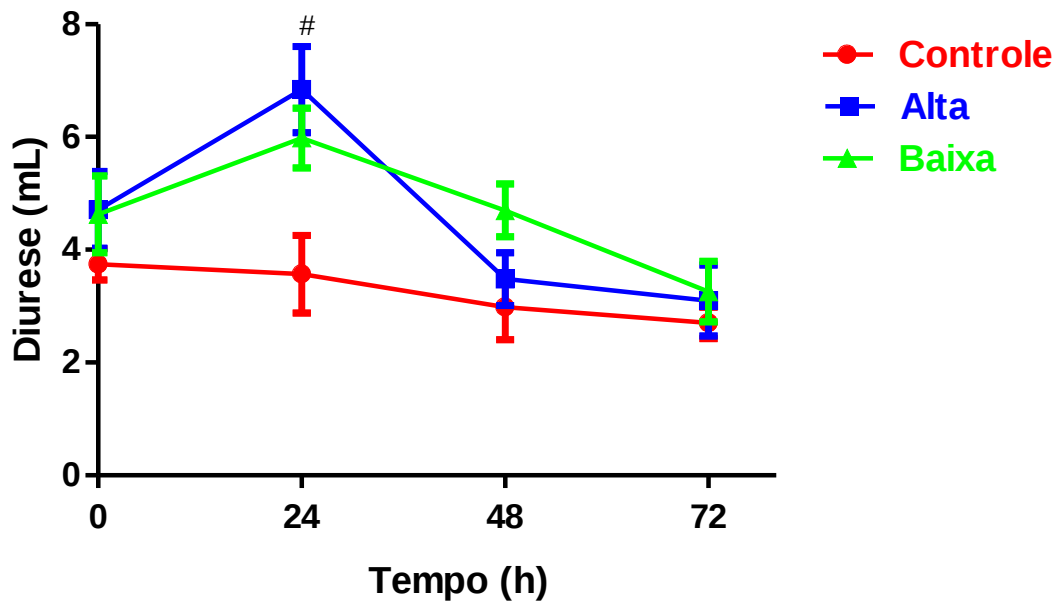
#p < 0,05 para comparação entre os grupos controle e alta osmolalidade

**Tabela 2** – Diurese (mL) nos grupos controle (n=10), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).

Tempo (Horas)	Controle	Alta	Baixa
zero	3,74±0,279	4,72±0,679	4,64±0,684
24	3,57±0,696	6,84±0,767#	5,98±0,535
48	2,98±0,581	3,48±0,475	4,70±0,468
72	2,70±0,283	3,10±0,635	3,26±0,545

Resultados expressos em média ± EPM

#p < 0,05 para comparação entre os grupos controle e alta osmolalidade



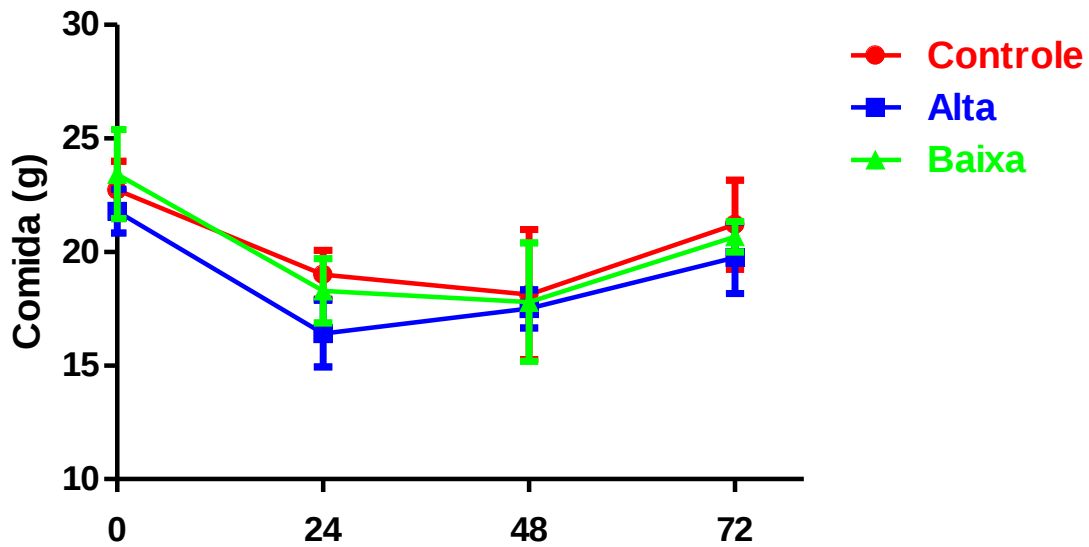
**Figura 20** - Diurese nos grupos controle (n=10), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).

#p < 0,05 para comparação entre os grupos controle e alta osmolalidade

**Tabela 3** – Consumo de alimento (g) nos grupos controle (n=10), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).

Tempo (Horas)	Controle	Alta	Baixa
zero	23,43±1,962	21,80±0,964	23,05±1,168
24	18,29±1,426	16,41±1,458	19,21±1,146
48	17,80±2,615	17,50±0,839	16,62±2,030
72	20,67±0,667	19,75±1,578	19,20±1,158

Resultados expressos em média ± EPM



**Figura 21** - Consumo de alimento nos grupos controle (n=10), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n=19) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=19).

## 5.2 Efeitos dos Contrastes Ioxitalamato de Meglumina (alta osmolalidade) e Iobitridol (baixa osmolalidade) em Rim Isolado

O grupo controle com solução salina (n=3) não apresentou alterações significativas na função renal durante os 120 minutos de experimento. Neste grupo os animais eram pré-tratados com solução salina 0,9% com um volume de 5 mL/Kg e mantidos 72 horas em gaiola metabólica. Durante o período que os animais permaneciam na gaiola, diariamente, era verificado o consumo de alimento e água, diurese e peso. No tempo de 72 horas, os animais eram anestesiados, colhido sangue e realizado nefrectomia direita para perfusão de rim isolado. A perfusão de rim isolado era realizada apenas com a solução perfusora Krebs-Henseleit.

Observou-se aumento significativo na pressão de perfusão (PP), quando se compara o grupo controle (n=3) com os grupos dos contrastes de alta osmolalidade (n=5) e baixa osmolalidade (n=5), e observa-se também aumento significativo na pressão de perfusão do grupo que utilizou contraste de baixa osmolalidade quando comparado com o grupo que utilizou contraste de alta osmolalidade (Figura 23).

Não se observa alterações significativas no fluxo urinário entre os três grupos estudados, nos diferentes tempos (Figura 24).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) apresentou redução significativa aos 30 minutos no grupo alta osmolalidade quando comparado ao grupo baixa osmolalidade. Quando comparado ao grupo controle, o RFG reduziu significativamente aos 60 minutos de perfusão no grupo alta osmolalidade. Nos tempos de 90 e 120 minutos houve redução no ritmo de filtração glomerular significativa nos grupos de alta e baixa osmolalidade quando comparados com o grupo controle (Figura 25).

O percentual de transporte tubular de cloreto sofreu uma redução significativa com 120 minutos no grupo de baixa osmolalidade quando comparado com o grupo controle e o grupo de alta osmolalidade. (Figura 26).

O transporte tubular de potássio apresentou redução significativa no grupo de alta osmolalidade quando comparado com o grupo de baixa osmolalidade. No tempo de 90 minutos o grupo de alta osmolalidade também apresentou redução significativa quando comparada com o grupo controle e no tempo de 120 minutos o grupo de alta osmolalidade apresentou redução quando comparado com os grupos controle e baixa osmolalidade (Figura 27).

O transporte tubular de sódio apresentou redução significativa no grupo de alta osmolalidade quando comparado ao grupo de baixa osmolalidade no tempo de 30 minutos, nos demais tempos não houve redução significativa (Figura 28).

**Tabela 4** – Pressão de Perfusão (mmHg) nos grupos controle (n=3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

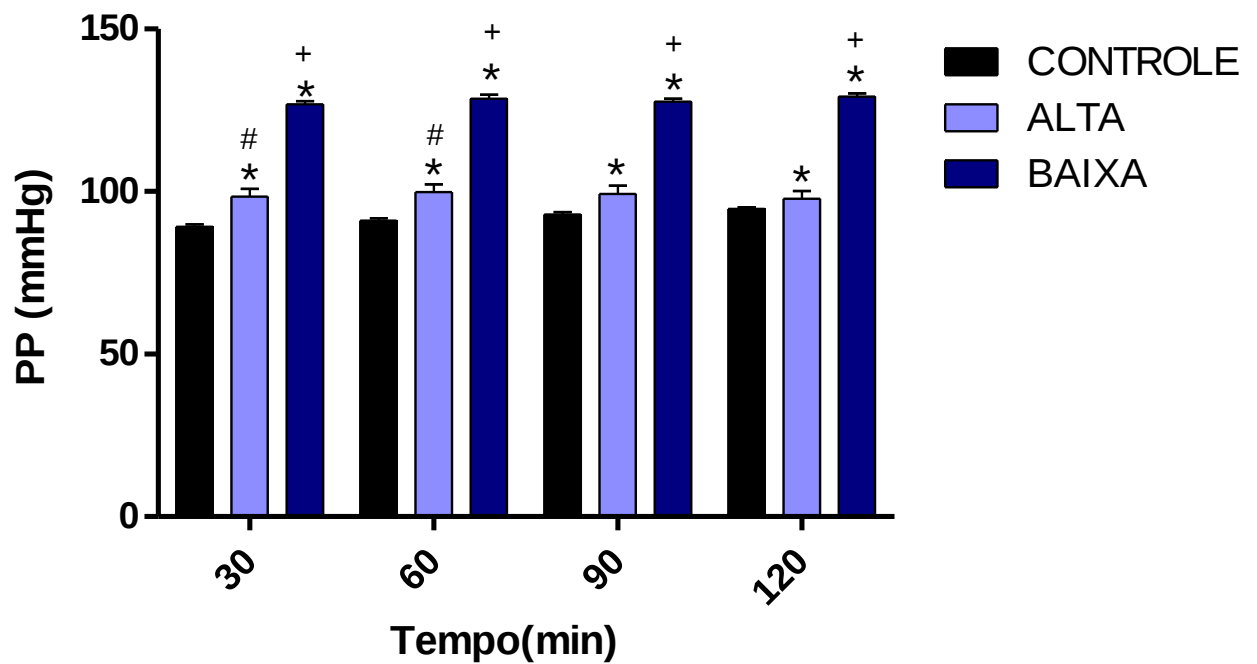
<b>Tempo (min)</b>	<b>Controle</b>	<b>Alta</b>	<b>Baixa</b>
<b>30</b>	<b>89,13±0,818</b>	<b>98,40±2,467*#</b>	<b>126,8±0,936*+</b>
<b>60</b>	<b>91,07±0,744</b>	<b>99,80±2,406*#</b>	<b>128,5±1,222*+</b>
<b>90</b>	<b>94,21±1,000</b>	<b>99,03±3,137*</b>	<b>126,7±0,932*+</b>
<b>120</b>	<b>94,74±0,426</b>	<b>97,87±2,375*</b>	<b>129,1±1,086*+</b>

Resultados expressos em média ± EPM

\*p< 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

#p< 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo alta osmolalidade

+p< 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo de baixa osmolalidade



**Figura 22 - Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).**

\*p< 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

#p< 0,05 para comparação entre grupo controle e o grupo alta osmolalidade

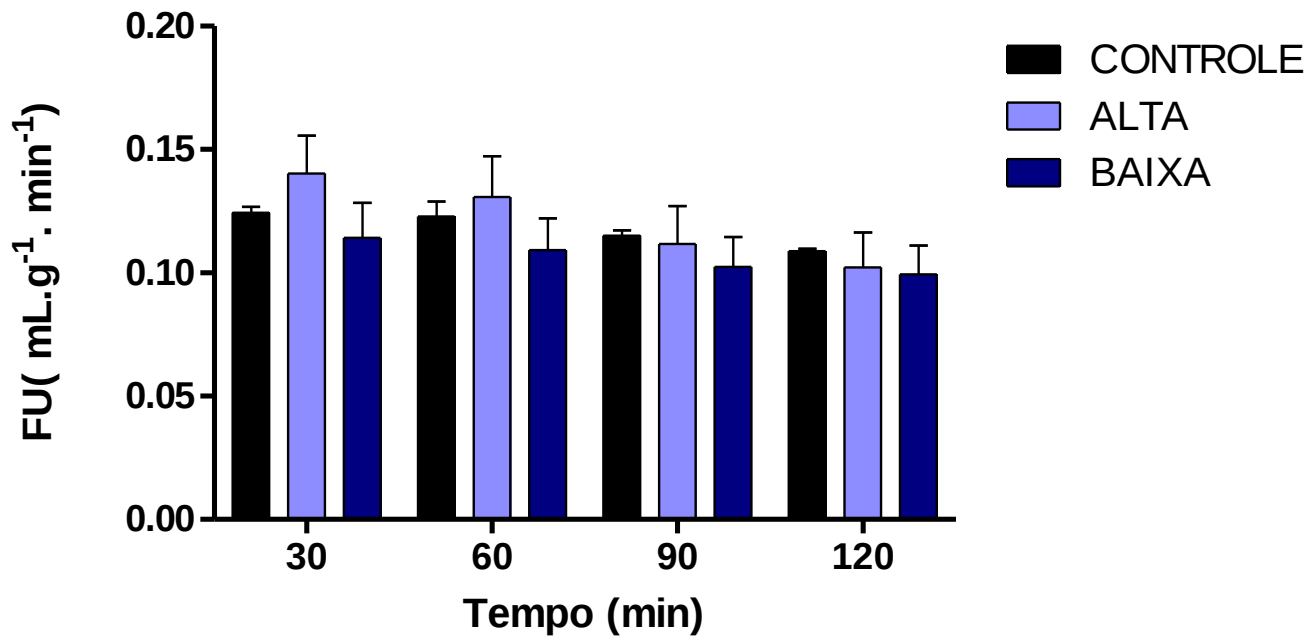
+p< 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo baixa osmolalidade

**Tabela 5 – Fluxo Urinário (mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>) nos grupos controle (n=3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).**

Tempo (min)	Controle	Alta	Baixa
30	0,124±0,002	0,140±0,015	0,114±0,014
60	0,123±0,006	0,131±0,016	0,109±0,013
90	0,115±0,002	0,112±0,015	0,102±0,012
120	0,109±0,001	0,102±0,014	0,099±0,012

Resultados expressos em média ± EPM





**Figura 23** - Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

**Tabela 6** – Ritmo Filtração Glomerular (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) nos grupos controle (n=3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

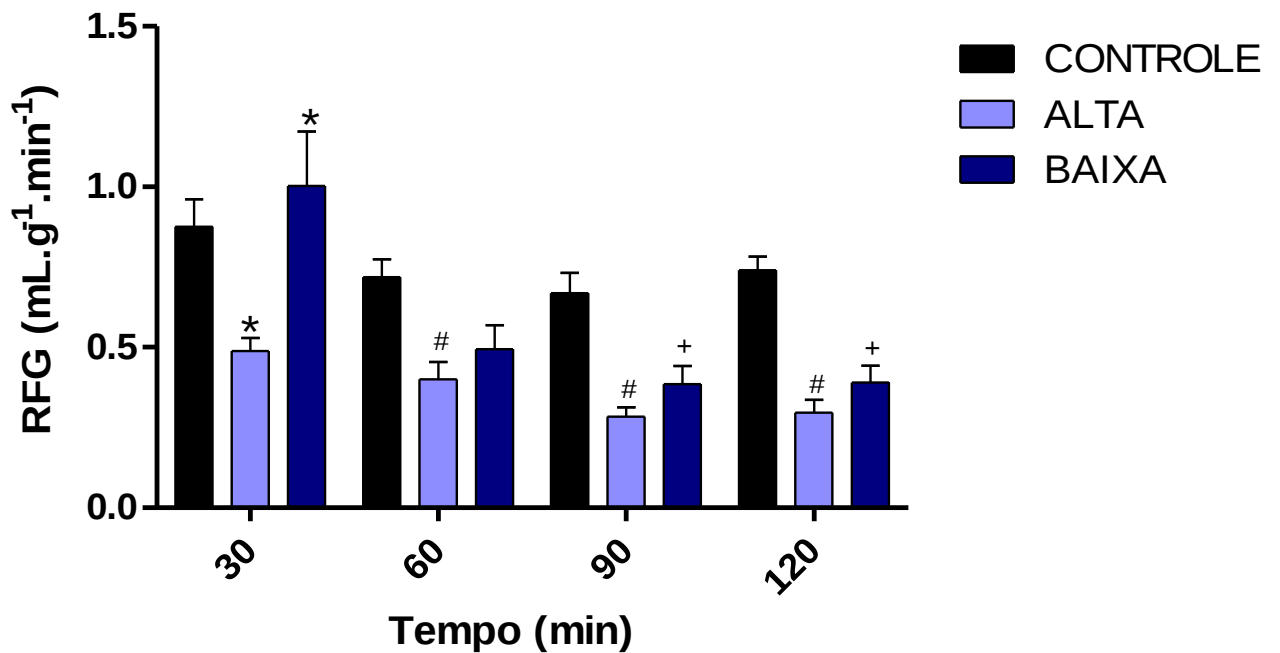
Tempo (min)	Controle	Alta	Baixa
30	0,875±0,087	0,488±0,042*	0,844±0,129*
60	0,720±0,055	0,400±0,054#	0,494±0,075
90	0,669±0,062	0,284±0,028#	0,385±0,057+
120	0,741±0,042	0,297±0,039#	0,390±0,053+

Resultados expressos em média ± EPM

\*p < 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

#p < 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo alta osmolalidade

+p < 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo baixa osmolalidade



**Figura 24** - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

\*p < 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

#p < 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo alta osmolalidade

+p < 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo baixa osmolalidade

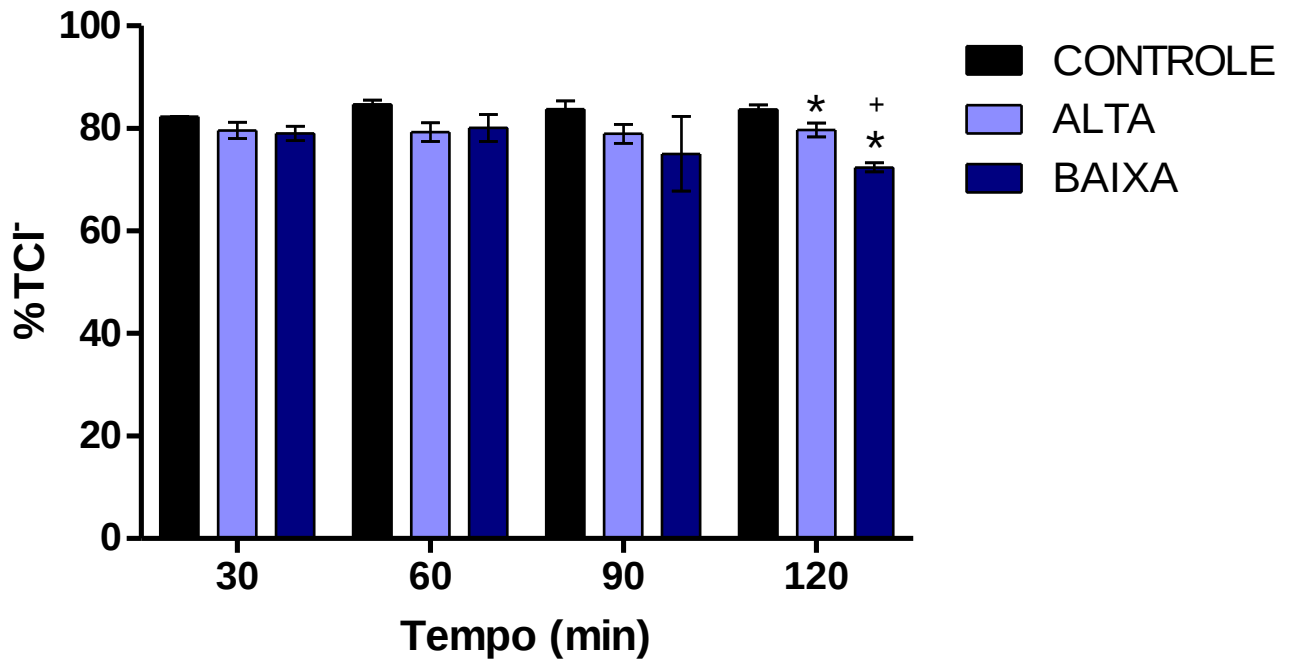
**Tabela 7** – Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl) nos grupos controle (n = 3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

Tempo (min)	Controle	Alta	Baixa
30	82,25±0,115	79,62±1,572	79,03±1,410
60	84,72±0,809	79,31±1,836	80,09±2,640
90	83,81±1,587	78,94±1,842	75,08±7,311
120	83,68±0,951	79,72±1,335*	72,41±0,892+*

Resultados expressos em média ± EPM

\*p < 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

+p < 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo baixa osmolalidade



**Figura 25** - Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

\*p< 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

+p< 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo baixa osmolalidade

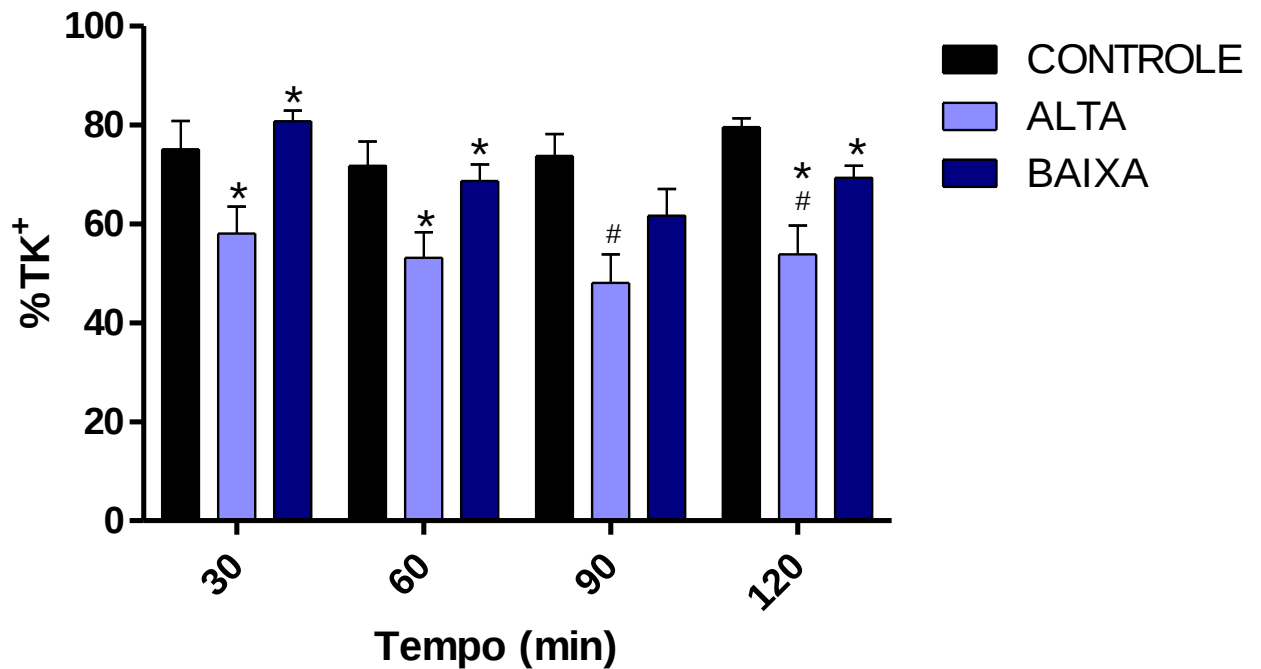
**Tabela 8** – Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK<sup>+</sup>) nos grupos controle (n = 3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

Tempo (min)	Controle	Alta	Baixa
30	75,09±5,816	58,11±5,452*	80,78±2,147*
60	71,78±4,908	53,20±5,221*	68,67±3,365*
90	73,82±4,387	48,10±5,746#	61,67±5,425
120	79,64±1,710	53,86±5,847*#	69,34±2,479*

Resultados expressos em média ± EPM

\*p< 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

#p< 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo alta osmolalidade



**Figura 26** - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK<sup>+</sup>) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

\*p < 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

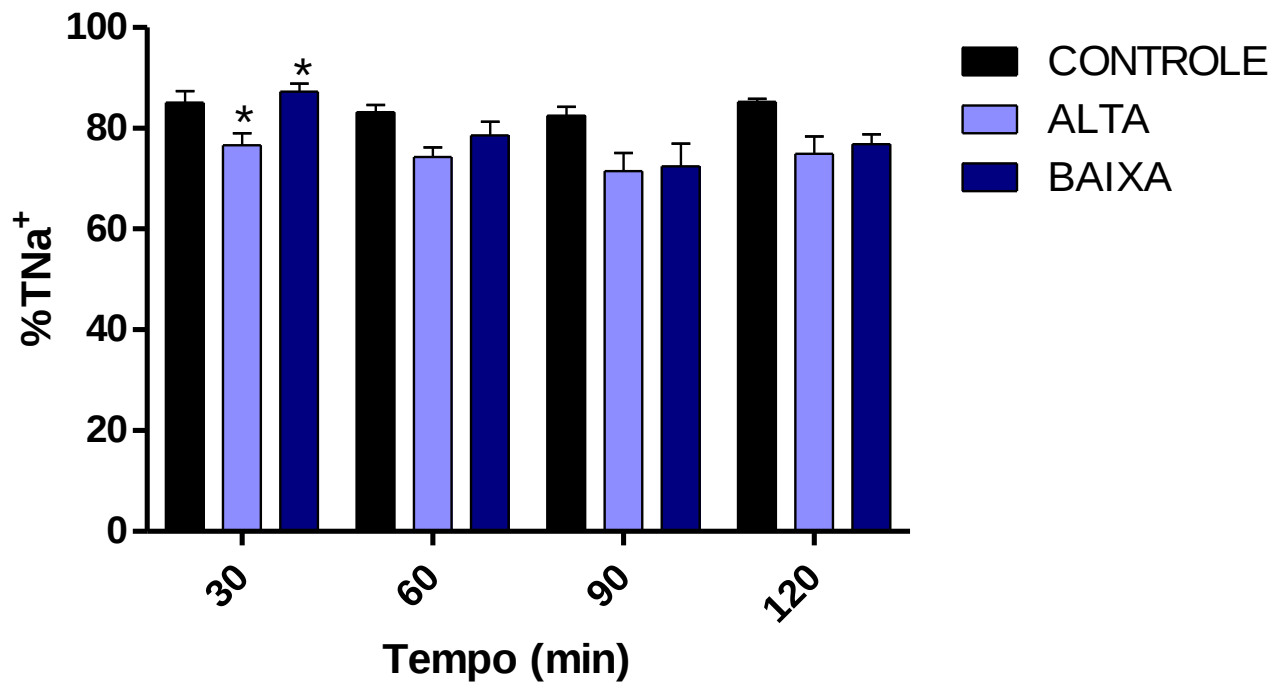
#p < 0,05 para comparação entre o grupo controle e o grupo alta osmolalidade

**Tabela 9** – Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos grupos controle (n = 3), tratado com o contraste ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e com o contraste iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

Tempo (min)	Controle	Alta	Baixa
30	85,11±2,223	76,60±2,404*	87,29±1,564*
60	83,20±1,381	74,31±1,860	78,62±2,628
90	82,58±1,727	71,54±3,582	72,47±4,452
120	85,31±0,557	74,96±3,406	76,90±1,914

Resultados expressos em média ± EPM

\*p < 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade



**Figura 27** - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos grupos controle (n = 3), tratado com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade) (n = 5) e iobitridol (baixa osmolalidade) (n=5).

\*p < 0,05 para comparação entre os grupos alta e baixa osmolalidade

### 5.3 Análise histológica dos rins que receberam contrastes Ioxitalamato de Meglumina (alta osmolalidade) e Iobitridol (baixa osmolalidade)

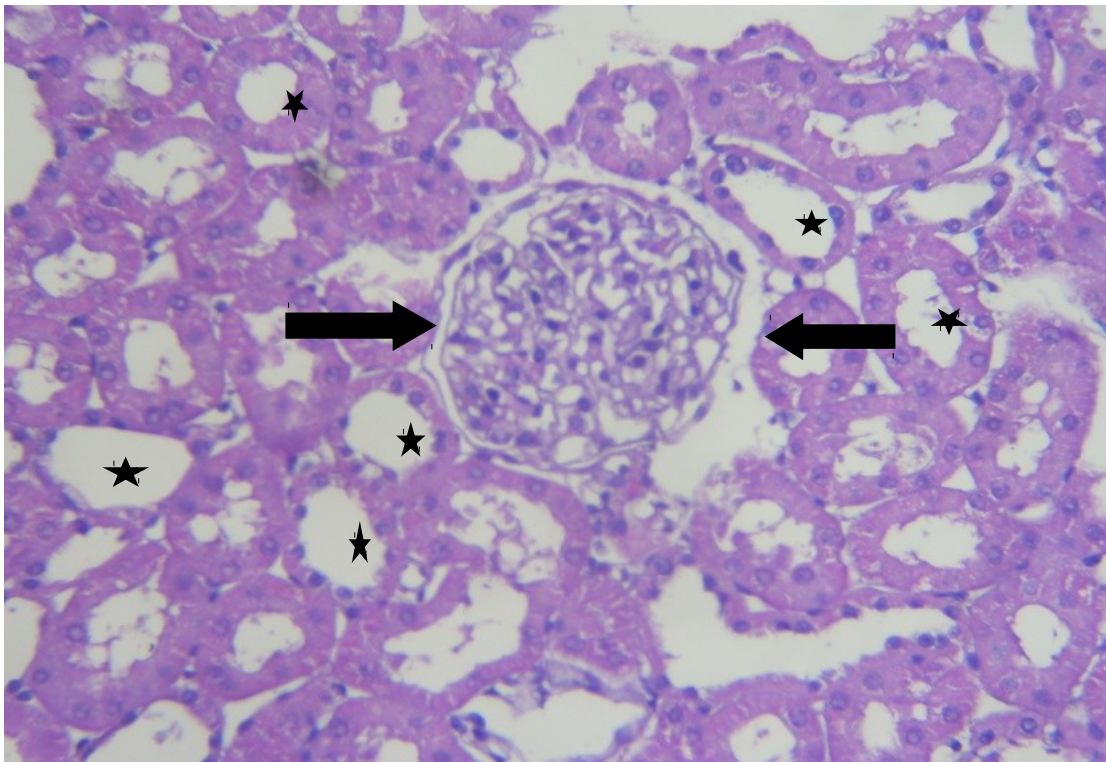
Na figura 29 observou-se o corte histológico de rim esquerdo tratado com solução salina e verifica-se que não há alterações. As lâminas analisadas demonstraram glomérulos, túbulos, vasos e interstícios normais.

O rim direito, figura 30, serviu como controle, tratado com solução salina no tempo de 72 horas e perfundido com solução de Krebs-Hanseleit e verifica-se que não há alterações. As lâminas analisadas demonstraram glomérulos, túbulos, vasos e interstícios normais.

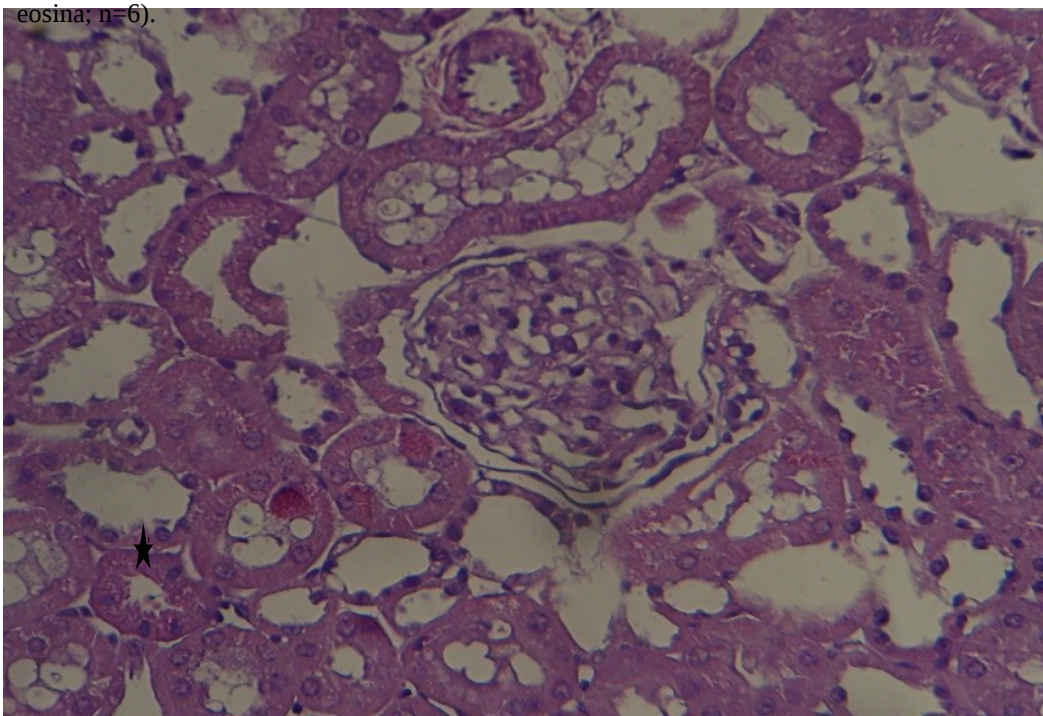
Os rins foram analisados após infusão dos contrastes de alta e baixa osmolalidade, no tempo de 72 horas.

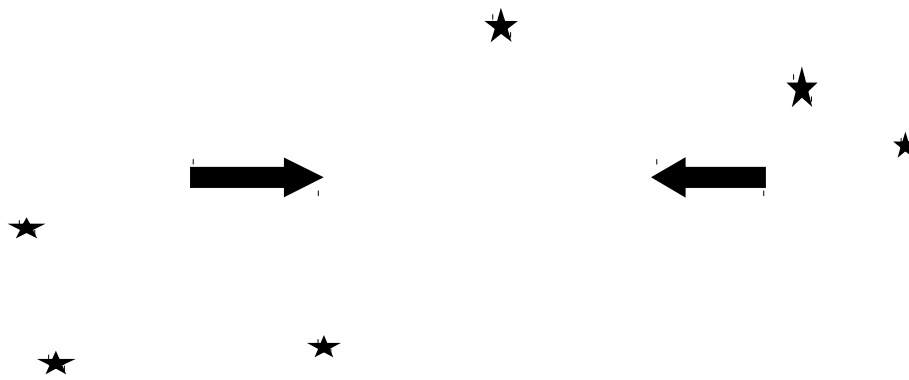
Na histologia dos rins que receberam contraste de alta (Figura 31) e baixa osmolalidade (Figura 32), no tempo de 72 horas, mostraram intensa deposição cilíndrica em

todos os túbulos, tanto no córtex quanto na medula. Os glomérulos não apresentaram deposição.

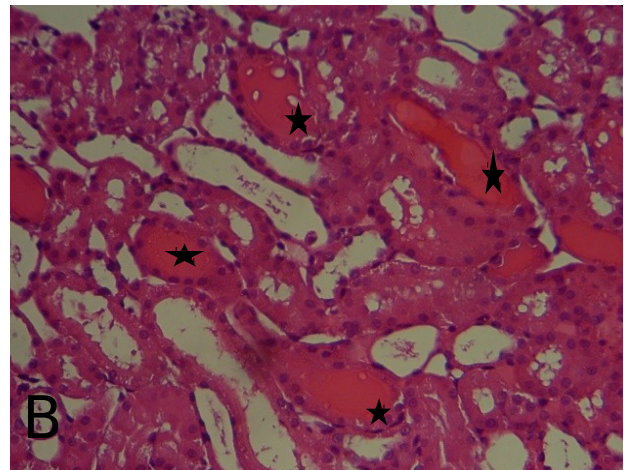
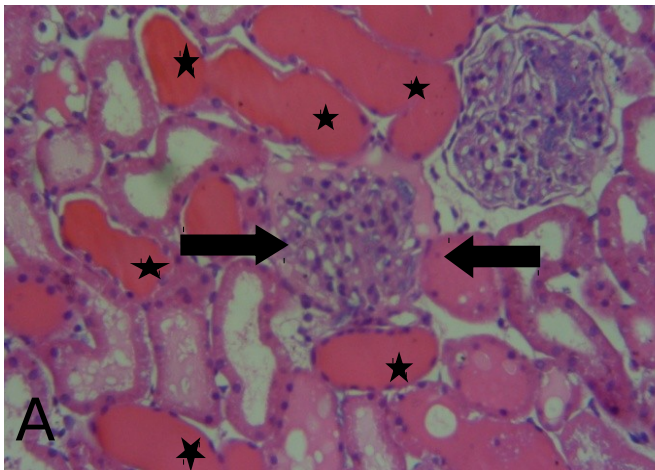


**Figura 28** - Fotomicrografia do rim esquerdo de animal tratado com salina. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina, n=6).

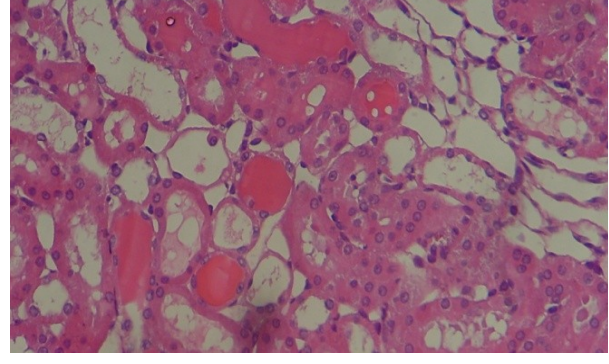
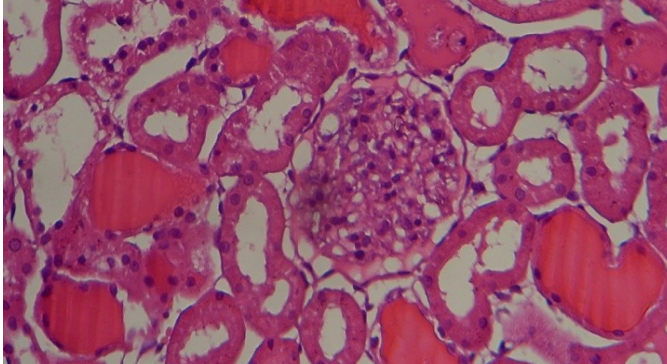


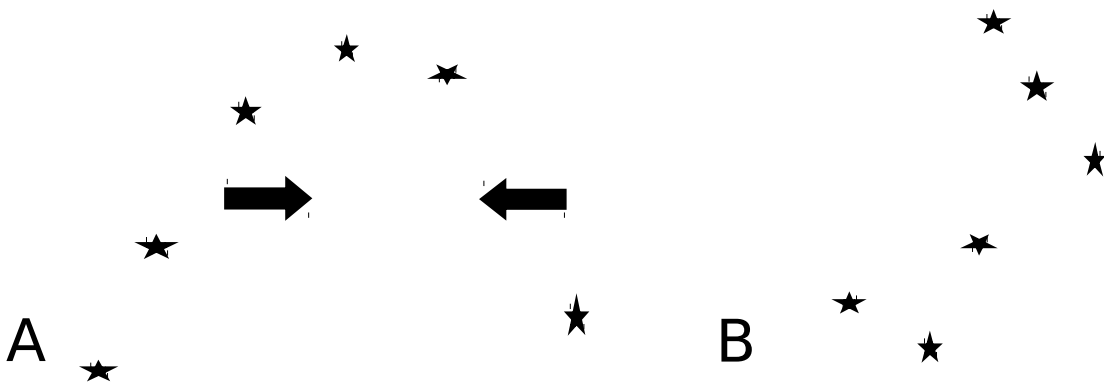


**Figura 29** - Fotomicrografia do rim direito de animal tratado com salina antes da perfusão. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Rim direito perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit modificada, mostrando que a perfusão não altera a fisiologia renal. Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=3).



**Figura 30** - Fotomicrografia do rim direito de animais tratados com ioxitalamato de meglumina (alta osmolalidade), no tempo de 72 horas. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Visualiza-se intensa deposição cilíndrica nos túbulos da região cortical (A) e medular (B). Alguns glomérulos mostraram de leve a moderada deposição de material protéico. Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; (n=5).

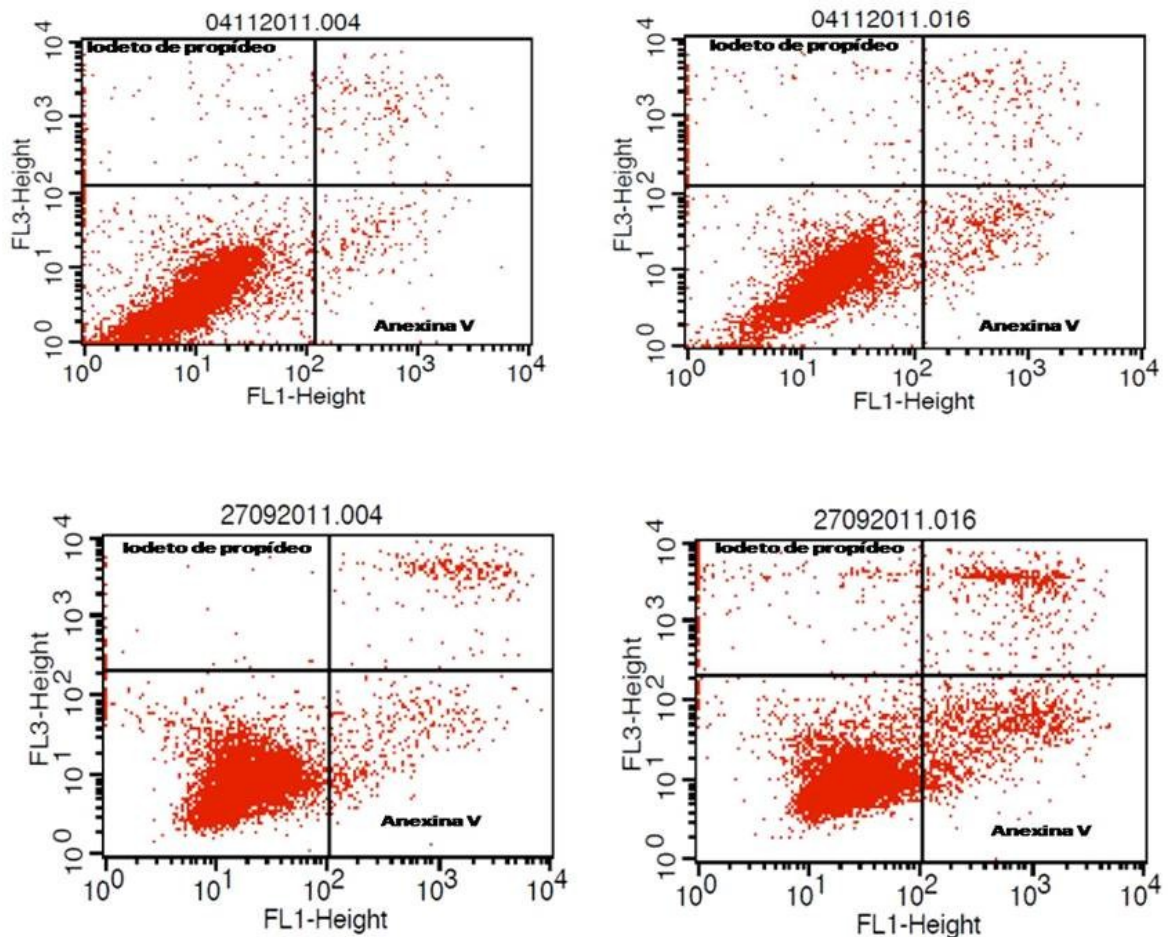




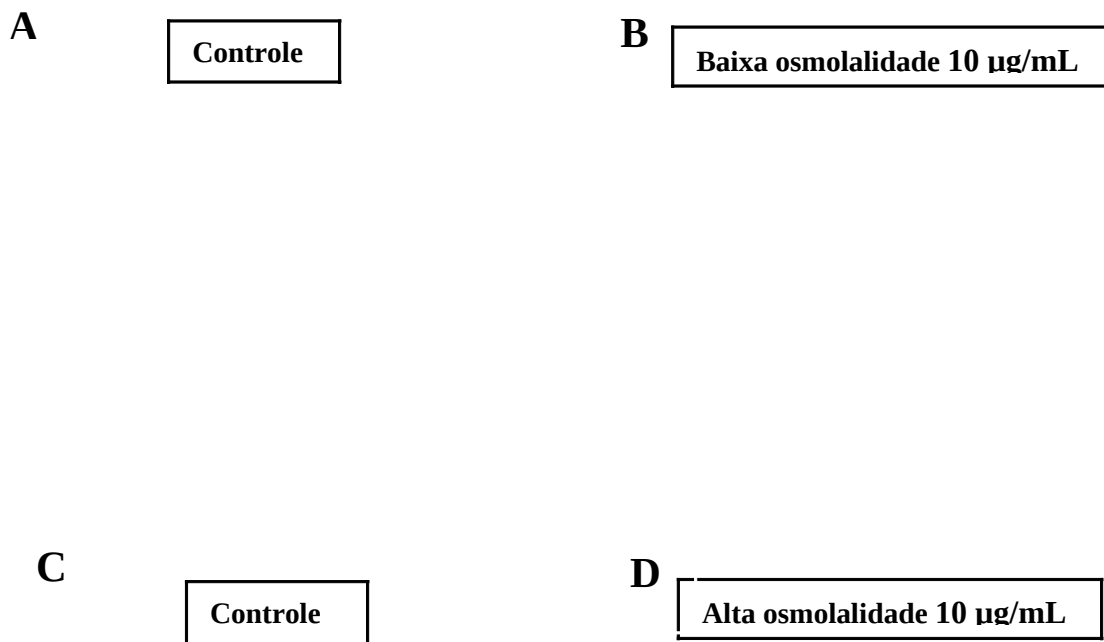
**Figura 31** - Fotomicrografia do rim direito de animais tratados com iobitridol (baixa osmolalidade), tempo de 72 horas. Glomérulo (setas) e Túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). Visualiza-se intensa deposição cilíndrica nos túbulos da região cortical (A) e medular (B). Alguns glomérulos mostraram de leve a moderada deposição de material protéico. Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; (n=5).

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

Após observar a citotoxicidade dos meios de contrastes iohalato de meglumina (alta







**Figura 32** - Gráficos representativos do perfil de marcação simultânea de células MDCK com anexina V – FITC (quadrante inferior direito das plotagens – indício de apoptose), PI (quadrante superior esquerdo das plotagens – indício de necrose). No quadrante inferior esquerdo das plotagens, estão representadas as células sem marcação (células viáveis). No quadrante superior direito das plotagens estão representadas as células com dupla marcação (indício de necrose secundária). A – Controle; B – Baixa osmolalidade 10 µg/mL; C – Controle; D – Alta osmolalidade 10 µg/mL.

# **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Após a avaliação dos parâmetros metabólicos em gaiolas individuais foi observado alterações na ingesta hídrica e diurese, não sendo observado na ingesta de alimento.

Neste trabalho se observou aumento do consumo de água e diurese no grupo de alta osmolalidade quando comparado ao controle.

Os contrastes iodados e sua alta osmolalidade induzem diurese, causando alta concentração de contraste na urina e longa exposição das células epiteliais a estas moléculas (PEREIRA; DE LIMA; YU, 2001).

As variações da osmolalidade plasmática e do volume ou da pressão sanguínea levam a alterações na percepção de sede. Quando a osmolalidade do fluido corporal está aumentada, ocorre o aumento da sede. A hipertonicidade é o estímulo mais potente, um aumento da osmolalidade plasmática por apenas 2% a 3% produz forte desejo de beber água, para atingir esta mesma resposta é necessário diminuição do volume e da pressão sanguínea, na faixa de 10% a 15% (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Previamente, foi observado que após uma injeção de meio de contraste, há uma resposta bifásica, constituída por um breve período de vasodilatação inicial, com duração de segundos, levando a um aumento no fluxo renal; seguido por períodos variáveis de vasoconstrição e conseqüente redução no fluxo e na taxa de filtração glomerular por hipoperfusão renal. Geralmente, mesmo sem haver insuficiência renal, após a infusão de contraste ocorre diurese osmótica, liberação de hormônio antidiurético e fator atrial natriurético, além de vacuolização tubular (ANDRADE; SEGURO, 1997). Soluções de alta osmolalidade exibem um grande aumento no fluxo urinário (SEELIGER *et al.*, 2007).

A NIMC começa dentro das primeiras 12 a 24 horas após a utilização do contraste. A insuficiência renal é não oligúrica na maioria dos pacientes. Na maioria dos casos, o declínio da função renal é leve e transitória (RUDNICK; TUMLIN, 2011).

Os rins são órgãos altamente vascularizados, pelo qual grande quantidade de líquido são filtrados do sangue, sendo assim alvo primário de toxinas e xenobióticos e representando uma importante via de eliminação de substâncias estranhas, como drogas e outras substâncias químicas do organismo (GUYTON, 2006; KOEPPEN; STANTON, 2009).

No intuito de estudar o efeito direto dos contrastes no rim, foi realizada perfusão de rim isolado, em animais pré-tratados com salina 0,9%, contraste ioxitalamato de meglumina e contraste iobitridol, no volume de 5 mL/Kg, pela via endovenosa. Estes animais foram mantidos por 72 horas em gaiola metabólica e após este período realizado perfusão de rim isolado.

Neste trabalho, o ritmo de filtração glomerular foi determinado pelo clearance de inulina, um marcador glomerular que é livremente filtrado através dos capilares glomerulares, não é reabsorvido nem secretado pelo túbulo renal e que não altera o ritmo de filtração glomerular (WINSTEN; DALAL, 1972). No presente estudo, a utilização de contraste iodado reduziu o ritmo de filtração glomerular, quando comparado com o grupo controle, e aumentou a pressão de perfusão renal.

A vasoconstrição renal é comumente encontrada na nefropatia induzida por contraste, é mediada em parte pelo contraste que induz a liberação de endotelina e adenosina e pela alta osmolalidade do meio de contraste (RUDNICK; TUMLIN, 2011). A endotelina é um potente vasoconstrictor secretado pelas células endoteliais dos vasos renais, células mesangiais e células do túbulo distal, causando uma intensa vasoconstrição das arteríolas aferente e eferente reduzindo o ritmo de filtração glomerular (RFG) e o fluxo sanguíneo renal (FSR); a adenosina é produzida no interior dos rins e causa vasoconstrição da arteríola aferente e eferente, levando a redução do RFG e FSR (KOEPPEN; STANTON, 2009).

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 nesta região é facilitado pela manutenção da baixa viscosidade, que pode ser alterado pelo meio de contraste. O aumento da viscosidade pode também aumentar a pressão tubular intersticial, levando a redução do fluxo sanguíneo medular (RUDNICK; TUMLIN, 2011).

Alguns autores ressaltaram que a viscosidade do meio de contraste tem uma grande importância na NIC. O aumento da viscosidade compromete o fluxo sanguíneo renal, o suprimento de oxigênio para regiões críticas do rim e retarda a TFG, provavelmente, como resultado do aumento da viscosidade do fluido tubular, prejudicando a filtração glomerular. O efeito direto na vasculatura renal, durante a filtração de contraste de alta viscosidade, causa aumento da pressão tubular, contribuindo para o comprometimento do fluxo sanguíneo medular renal (SEELIGER *et al.*, 2007).

A viscosidade é a medida da resistência do escoamento de um líquido, a uma determinada temperatura. É a propriedade associada à resistência que o fluido oferece a deformação por cisalhamento, e pode ser medida como viscosidade dinâmica em centipoise (cP) e viscosidade cinemática em centistokes (cSt) (VISCOSIDADE, 2011).

O ioxitalamato de meglumina, meio de contraste de alta osmolalidade utilizado em nosso estudo, possui uma osmolalidade de 2160 mOsm/Kg água e uma viscosidade de 7,5 cP a 37°C e o iobitridol, baixa osmolalidade, possui uma osmolalidade de 915 mOsm/Kg água e uma viscosidade de 10,0 cP a 37°C (HENETIX, 2009).

O aumento da pressão de perfusão encontrado nos grupos que utilizaram contraste de alta e baixa osmolalidade pode ter relação com a viscosidade, principalmente quando se evidencia uma maior significância no grupo que utilizou contraste de baixa osmolalidade, por este contraste possuir uma maior viscosidade.

A injúria tubular é outro possível efeito dos meios de contraste, por citotoxicidade direta ou associado à geração de radicais livres de oxigênio (RUDNICK; TUMLIN, 2011).

Fatores como vasoconstrição renal, alta osmolalidade dos meios de contraste e alta viscosidade, podem estar envolvidos na diminuição do ritmo de filtração glomerular e aumento da pressão de perfusão encontrados em nossos resultados.

O transporte de cloreto, em perfusão de rim isolado, apresentou redução significativa, nos animais que utilizaram contraste de baixa osmolalidade, quando comparados ao grupo controle. Em relação ao transporte tubular de potássio, foi observada uma significativa redução durante todos os tempos do experimento, no grupo que utilizou contraste de alta osmolalidade, quando comparado ao grupo controle.

Os rins são os principais responsáveis pela manutenção do balanço de potássio, chegando a excretar de 90 a 95% do potássio ingerido na dieta. O potássio não se liga às proteínas e, portanto, é livremente filtrado pelo glomérulo. O potássio é transportado ao longo do néfron e no seu percurso ele pode ser reabsorvido ou excretado. O túbulo proximal reabsorve aproximadamente 67% do potássio filtrado e 20% é reabsorvido pela alça de Henle, a quantidade que é reabsorvida é uma fração constante da quantidade filtrada. O túbulo distal e o ducto coletor são capazes de reabsorver ou secretar potássio, e a intensidade de reabsorção ou secreção depende da quantidade de potássio ingerida e de fatores hormonais (KOEPPEN; STANTON, 2009).

O transporte tubular de potássio é encontrado pela subtração do potássio filtrado pelo potássio excretado. A redução da porcentagem de transporte de potássio observada no estudo ocorreu possivelmente devido a uma redução na reabsorção de potássio, provavelmente no túbulo proximal, região responsável pela maior reabsorção deste íon. Os dados observados nesse estudo são relevantes e devem ser buscados na clínica através da monitorização do potássio sérico em pacientes que utilizam contraste iodado, especialmente o de alta osmolalidade, por ter sido evidenciado que ocorre uma redução na reabsorção, o que pode levar a hipocalcemia (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Contudo, não foram observadas alterações no percentual de transporte de sódio, dos animais que utilizaram contraste de alta e de baixa osmolalidade, quando comparado com o grupo controle. Houve uma alteração significativa, no tempo de 30 minutos, quando comparado o contraste de alta com o de baixa osmolalidade.

O meio de contraste induz apoptose de células renais em dose e tempo dependente. O efeito tóxico do contraste pode está relacionado a hipertonicidade, uma vez que uma substância igualmente hiperosmolar e menos hipertônica não induz morte celular. Diretrizes recomendam a limitação do volume de contraste para prevenir a nefrotoxicidade (ROMANO, *et al.*, 2008).

No presente estudo, os contrastes de alta e de baixa osmolalidade causaram citotoxicidade em células tubulares renais MDCK. Nos ensaios em citometria de fluxo observou-se uma maior concentração de células marcadas com anexina V, demonstrando que um grande número de células encontram-se na fase inicial da apoptose.

**CONCLUSĂ**  
**O**

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ O presente estudo mostra que o contraste de alta osmolalidade induz alterações no metabolismo diário dos ratos, com aumento do consumo de água e diurese.
- ✓ Os contrastes de alta e baixa osmolalidade promovem importantes alterações nos parâmetros fisiológicos em modelos de rim isolado.
- ✓ Na análise histopatológica dos rins foi evidenciada intensa deposição cilíndrica em todos os túbulos, tanto no córtex quanto na medula.
- ✓ Em células tubulares renais MDCK foi evidenciado citotoxicidade dos contrastes de alta e de baixa osmolalidade com predomínio de apoptose.





# REFERÊNCIAS

# AS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. **Manual on contrast media version 7**. 2010.

Disponível em:<

[http://www.acr.org/SecondaryMainMenuCategories/quality\\_safety/contrast\\_manual/FullManual.aspx#page=6](http://www.acr.org/SecondaryMainMenuCategories/quality_safety/contrast_manual/FullManual.aspx#page=6). Acesso em: 24 set. 2011.

ANDRADE, L.; SEGURO, A. C. Revisão/Atualização em insuficiência renal aguda: nefrotoxicidade induzida pelo radiocontraste. **J. Bras. Nefrol.**, v. 19, n. 2, p. 208-211, 1997.

ANDRADE, L.; CAMPOS, S. B.; SEGURO, A. C. Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: Protective role of L-arginine. **Kidney International**, v. 53, p. 1736-1742, jan. 1998.

ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 17, n. 1, p. 89-96, jan/mar. 2004.

BALBI, A. L.; GABRIEL, D. P.; BARBANTE, R. C.; CARAMORI, J. T.; MARTIN, L. C.; BARRETI, P. Mortalidade e prognóstico específico em pacientes com insuficiência renal aguda. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 51, n. 6, p. 318-322, 2005.

BALHLMANN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.

BARRETT, B. J. Contrast Nephrotoxicity. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, p. 125-137, mar. 1994.

BARTHOLOMEW, B. A.; HARJAI, K. J.; DUKKIPATI, S.; BOURA, J. A.; YERKEY, M.W.; GLAZIER, S.; GRINES, C. L.; O'NEILL, W. W. Impact of nephropathy after percutaneous coronary intervention and a method for risk stratification. **Am. J. Cardiol.**, v. 93, p. 1515-1519, jun. 2004.

BASILE, D. P.; LIAPIS, H.; HAMMERMAN, M. R. Expression of bcl-2 and bax in regeneration rat renal tubules following ischemic injury. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 5, p. 640-647, mai. 1997.

BARRETT, B. J. Contrast nephrotoxicity. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 5, p. 125-137, mar. 1994.

BEERI, R.; SYMON, Z.; BREZIS, M.; BEN-SASSON, S. A.; BAEHR, P. H.; ROSEN, S.; ZAGER, R. A. Rapid DNA fragmentation from hypoxia along the thick ascending limb of rat kidneys. **Kidney Int.**, v. 47, n. 6, p. 1806-1810, jun. 1995.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 2, p.70-77, jan. 2000.

BREZIS, M.; HEYMAN, S. N.; DINOUR, D.; EPSTEIN, F. H.; ROSEN, S. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation studies in isolated and intact rat kidneys. **The American Society for Clinical Investigation**. v. 88, p. 390-395, aug. 1991.

BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford: Blackwell, 1992.

CALDICOTT, W. J.; HOLLENBERG, N. K.; ABRAMS, H. L. Characteristics of response of renal vascular bed to contrast media. Evidence for vasoconstriction induced by renin-angiotensin system. **Invest. Radiol.**, v. 5, n. 6, p. 539-574, nov-dec. 1970.

CAMARGO, S. M. R.; SCHOR, N. Mecanismos celulares e moleculares da nefrotoxicidade pela cisplatina. **J. Bras. Nefrol.**, v. 21, n. 2, p. 71-81, 1992.

CAMPOS, V. C. R.; VIMENEY, J. L. M.; CAMPOS, F. L.; FERREIRA, A. M. R.; CALDAS, M. L. R.; MACEDO, H. W. Nefrotoxicidade induzida por radiocontraste em ratos wistar fêmeas uninefrectomizados e em restrição hídrica. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p. 16-21, abr. 2010.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 266, n. 1, p. 103–121, 1977.

COLLARES-BUZATO, C. B.; JEPSON, M. A.; MCEWAN, G. T.; SIMMONS, N. L.; HIRST, B. H. Junctional uvomorulin/E-cadherin and phosphotyrosine-modified protein content are correlated with paracellular permeability in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelia. **Histochemistry**, v. 101, n. 3, p. 185-194, 1994.

COSTA, J. A. C.; VIEIRA NETO, O. M.; MOYSÉS NETO, M. Insuficiência renal aguda. **Medicina, Ribeirão Preto**. v. 36, p. 307-324, abr/set. 2003.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, n. 265, n. 1-2, p. 49-72, jul. 2002.

DANTAS, R. T. **Avaliação dos efeitos renais da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis***. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2010.

DAVIDSON, C. J.; HLATKY, M.; MORRIS, K. G.; PIEPER, K.; SKELTON, T. N.; SCHWAB, S. J.; BASHORE, T. M. Cardiovascular and renal toxicity of a nonionic radiographic contrast agent after cardiac catheterization: a prospective trial. **Ann. Intern. Med.**, v. 110, n. 2, p. 119-124, jan. 1989.

DE LIMA, D. C.; ABREU, P. A.; DE FREITAS, C. C.; SANTOS, D. O.; BORGES, R. O.; DOS SANTOS, T. C.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Snake venom: Any clue for antibiotics and CAM. **Evid. Based Complement Alternat. Med.** v. 2, n. 1, p. 39-47, mar. 2005.

DERAY, G.; DUBOIS, M.; MARTINEZ, F.; BAUMELOU, B.; BEAUFILS, H.; BOURBOUZE, R.; BAUMELOU, A.; JACOBS, C. Renal effects of radiocontrast agents in rats: a new model of acute renal failure. **Am. J. Nephrol.**, v. 10, n. 6, p. 507-513, 1990.

EDUARDO, J. C. C.; MACEDO, H. W.; CALDAS, M. L. R.; SILVA, L. E. Nefropatia induzida por contraste: avaliação da proteção pela n-acetilcisteína e alopurinol em rato uninefrectomizados. **Radiol. Bras.** v. 41, n. 3, p. 177-181, Mai/Jun. 2008.

FISHBANE, S.; DURHAM, J. H.; MARZO, K.; RUDNICK, M. N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.** v.15, p. 251–260, 2004.

FONTELES, M. C.; GANAPATHY, V.; PASHLEY, D. H.; LEIBACH, F. H. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. **Life Sci.**, v. 33, n. 5, p. 431-436, aug.1983.

FRESHENEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4ed. New York: Wiley, 2000.

FÜLLEKRUG, J.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; SIMONS, K. Identification of glycosylated marker proteins of epithelial polarity in MDCK cells by homology driven proteomics. **BMC Biochem.**, v. 7, n. 8, p. 1-9, 2006.

GARÓFALO, A. S.; SANTOS, O. F. P. Fisiopatologia da nefrotoxicidade dos meios de contraste. Revista Virtual de Medicina. n. 10, abr/dez. 2000. Disponível em: [http://www.medonline.com.br/med\\_ed/med10/contras.htm](http://www.medonline.com.br/med_ed/med10/contras.htm). Acesso em: 07 set. 2011.

GOMES, S.; LOIS, J. F.; BAKER, J. D.; MCGLADE, C. T.; BUNNELL, D. H.; HARTZMAN, S. Acute renal dysfunction in High-risk patients after angiography: Comparison of ionic and nonionic contrast media. **Radiology**, v. 170, n. 1 pt 1, p. 65-68, jan.1989.

GÓMEZ, E. G. **Distribución tisular de transportadores de fármacos em tejidos normales y transformados. Papel en el sistema nervioso central.** 2006. 192 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Universitat de Barcelona, 2006.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, jan. 2007.

GUYTON, A. C. Formação de urina pelos rins. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de fisiologia médica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 307-326.

HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C.; STONEMAN, V. E.; LONGTHORNE, V.; CULHANE, A. C.; WILLIAMS, G. T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Eur. J. Biochem.**, v. 236, n. 1 p. 1-26, feb. 1996.

HENETIX iobitridol. Rio de Janeiro: Guerbet, 2009. Folder.

HEYMAN, S. N.; CLARK, B. A.; KAISER, N.; SPOKES, K.; ROSEN, S.; BREZIS, M.; EPSTEIN, F. H. Radiocontrast agents induce endothelin release *in vivo* and *in vitro*. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, n. 1, p. 58-65, jul.1992.

HUBER, P C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

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.

HUMES, H. D.; HUNT, D. A.; WHITE, M. D. Direct toxic effect of the radiocontrast agent diatrizoate on renal proximal tubule cells. **Am. J. Physiol.**, v. 252, n. 2 pt 2, p. 246-255, feb. 1987.

INDA FILHO, A. J.A. Nefropatia induzida por contraste: Podemos prevenir? **J. Bras. Nefrol.** v. 26, n. 2, p. 84-95, fev. 2004.

ISHII, K.; WARNER, T. D.; SHENG, H.; MURAD, F. Endothelin increases cyclic GMP levels in LLC-PK porcine kidney epithelial cells via formation of an endothelium-derived relaxing factor-like substance. **J. Pharmac. Exp. Therap.**, v. 259, n. 3, p. 1102-1108, aug. 1991.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, n. 17, p. 306-313, 1999.

JORGE, A. R. C. **Estudo dos efeitos da alta ingestão de cloreto de sódio por via oral sobre o metabolismo diário e função renal de ratos**. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2009.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Elementos da função renal. In: \_\_\_\_\_. **Berne & Levy: Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 561-580.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Transporte de solutes e água ao longo do néfron: Função tubular. In: \_\_\_\_\_. **Berne & Levy: Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 581-595.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Controle da osmolalidade e do volume dos fluidos corporais. In: \_\_\_\_\_. **Berne & Levy: Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 597-620.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Homeostase de potássio, cálcio e fosfato. In: \_\_\_\_\_. **Berne & Levy: Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 621-637.

KRAMER, C. K.; LEITÃO, C. B.; CANANI, L. H.; GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P. Nefropatia induzida por contraste: Medidas de prevenção. **Rev. HCPA**, v. 28, n. 1, p. 33-36, 2008.

LARANJA, S. M. **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.

LATCHAW, R. E. The use of nonionic contrast agents in neuroangiography: a review of the literature and recommendations for clinical use. **Invest. Radiol.**, v. 28, suppl. 5, p. S55-S59, nov. 1993.

LIEBERTHAL, W.; TRIACA, V.; LEVINE, J. S. Potential consequences of ATP depletion in proximal tubular cells in culture: sublethal injury, necrosis and apoptosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, p. 1828, 1996.

LIN, H-H.; YANG, T-P.; JIANG, S-T.; YANG, H-Y.; TANG, M-J. Bcl-2 overexpression prevents apoptosis-induced madin-darby canini kidney simple epithelial cyst formation. **Kidney Int.**, v. 55, n. 1, p. 168-178, jan.1999.

LODHIA, N.; KADER, M.; MAYES, T.; MANTRY, P.; MALIAKKAL, B. Risk of contrast-induced nephropathy in hospitalized patients with cirrhosis. **World. J. Gastroenterol.** v. 15, n. 12, p. 1459-1464, mar. 2009.

MACHADO, M. C.; CASTAGNA, M. T. V.; REIS, G.; MOTTA, M. S.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, A. L.; CAMPOS NETO, M. S. Nefropatia por radiocontraste: Tendências atuais. **Rev. Bras. Cardiol. Invas.** v. 11, n. 4, p. 27-30, 2003.

MADARA, J. L. Contributions of the paracellular pathway to secretion, absorption, and barrier function in the epithelium of the small intestine. In: LEBENTHAL, E.; DUFFEY, M. (Ed.). **Textbook of secretory diarrhea.** New York: Raven Press, p. 125-138,1990.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.  
MCCULLOUGH, P. A.; WOLYN, R.; ROCHER, L. L.; LEVIN, R. N.; O'NEILL, W. W. Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality. **Am. J. Med.**, v. 103, p. 368-375, nov. 1997.

MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 85, p. 198-200, 1999.

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato. Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina.** 1990. 107 f. Tese (Doutorado em ciências médicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

MOREIRA, P. R.; BARROS, E. Atualização em fisiologia e fisiopatologia renal: Bases fisiopatológicas da miopatia na insuficiência renal crônica. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 1, p. 201-208, jan. 2001.

MORCOS, S. K. Contrast media-induced nephrotoxicity - questions and answers. **The British J. Radiol.**; v. 71, p. 357-365, apr. 1998.

MORCOS, S. K.; THOMSEN, H. S. Adverse reactions iodinated contrast media. **Eur. Radiol.** v. 11, n. 7, p. 1267-1275, 2001.



MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1/2, p. 55-63, 1983.

NISHITSUTSUJI-UWO, J. W.; ROSS, B. D.; KREBS, H. A. Metabolic activities of the isolation perfused rat kidney. **Biochem. J.**, v. 103, n. 3, p. 852-862, 1967.

NORBY, L. H.; DIBONA, G. F. The renal vascular effects of meglumine diatrizoate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 193, n. 3, p. 932-940, jun.1975.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; EMMANUEL, A. B. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz. J. Cardiovasc. Surg.**, v. 21, n. 4, p. 444-452, set. 2006.

OLIVEIRA, V. C. R.; TEJOS, C. R.; HOSAKA, E. M.; ANDRADE, S. C.; ARAUJO, M.; VATTIMO, M. F. F. Interferência do intervalo de administração do droga sobre a nefrotoxicidade da gentamicina em ratos. **Rev. Esc. Enf. USP.**, v. 35, n. 2, p. 200-204, jun. 2001.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepato biliares. **Arq. Gastroenterol.**, v. 38, n. 2, p. 138-144, fev. 2001.

PECOITS FILHO, R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. **J. Bras. Nefrol.**, v. 26, n. 3, p. 4-5, ago. 2004.

PEIXOTO, E. B. M. I. **Modulação *in vitro* da função de barreira epitelial e integridade da junção de oclusão, em linhagem celular MDCK.** 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

PEREIRA, B. J.; LIMA, E. Q.; YU, L. Nefrotoxicidade por contraste radiológico iodado endovenoso: o que há de novo. **Revista Diagnóstico & Tratamento**, v. 6, n. 2, p. 29-33, 2001.

QUINTAVALLE, C.; BRENCA, M.; DE MICCO, F.; FIORE, D.; ROMANO, S.; ROMANO, M. S.; APONE, S.; BIANCO, A.; ZABATTA, M. A.; TRONCONE, G.; BRIGUORI, C.; CONDORELLI, G. In vivo and in vitro assessment of pathways involved in contrast media-induced renal cells apoptosis. **Cell Death Dis.**, v. 2, p. e155, 2011.

RACHER, A. J.; LOOBY D.; GRIFFITHS, J. B. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. **Cytotechnology**, v. 3, n. 3, p. 301-307, mai. 1990.

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.

RIBEIRO, R. C. H. M.; OLIVEIRA, G. A. S. A.; RIBEIRO, D. F.; BERTOLIN, D. C.; CESARIO, C. B.; LIMA, L. C. E. Q.; OLIVEIRA, S. M. Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. **Acta Paul. Enferm.**, v. 21, n. especial, p. 207-211, fev. 2008.

RIHAL, C. S.; TEXTOR, S. C.; GRILL, D. E.; BERGER, P. B.; TING, H. H.; BESTE, P. J.; SINGH, M.; BELL, M. R.; BARSNESS, G. W.; MATHEW, V.; GARRATT, K. N.; HOLMES JR, D. R. Incidence and prognostic importance of acute renal failure after percutaneous coronary intervention. **Circulation**, v. 105, p. 2259-2264, apr. 2002.

ROMANO, G.; BRIGUORI, C.; QUINTAVALLE, C.; ZANCA, C.; RIVERA, N. V.; COLOMBO, A.; CONDORELLI, G. Contrast agents and renal cell apoptosis. **European Heart Journal**, v. 29, p. 2569-2576, may. 2008.

ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.**, v. 55, n. 6, p. 513-521, 1978.

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. R; TUMLIN, J. A. Pathogenesis, clinical features, and diagnosis of contrast-induced nephropathy. **UpToDate**, p. 01-12, jun. 2011.

RUDNICK, M. R.; GOLDFARB, S.; WEXLER, L.; LUDBROOK, P. A.; MURPHY, M. J.; HALPERN, E. F.; HILL, J. A.; WINNIFORD, M.; COHEN, M. B.; VANFOSSSEN, D. B. Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial: the Iohexol Cooperative Study. **Kidney Int**, v. 47, n. 1, p. 254-261, jan.1995.

SAFIRSTEIN, R.; ANDRADE, L.; VIEIRA, J. M. Acetylcysteine and nephrotoxic effects of radiographic contrast agents: a new use for an old drug. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 3, p. 210-212, jul. 2000.

SANTOS, A. P.; GAIVÃO, A. M.; TAVARES, A.; FERREIRA, S. Produtos de contraste iodados. **Acta. Med. Port.**, v. 22, p. 261-274, jan. 2009.

SANTOS, O. F. P.; BOIM, M. A.; LARANJA, S. M. R. SCHOR, N. Contrast medium-induced nephropathy 2000; **In press**.

SEELIGER, E., FLEMMING, B.; WRONSKI, T.; LADWIG, M.; ARAKELYAN, K.; GODES, M.; MOCKEL, M.; PERSSON, P. B. Viscosity of contrast media perturbs renal hemodynamics. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 18, p. 2912–2920, jun. 2007.

SHANKLAND, S. J, WOLF, G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 278, n. 4, p. 515-529, apr, 2000.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology (Carlton)**, v. 11, n. 5, p. 442-448, oct. 2006.

SOCHMAN, J.; PEREGRIN, J.; BURGLOVÁ, M.; KOPKAN, L.; KRAMER, H. J.; CERVENKA, L. N-Acetylcysteine attenuates iodine contrast agent-induced nephropathy in 5/6nephrectomized rats. **Kidney blood press**, v. 33, n. 2, p. 149-156, may. 2010.

SOLOMON, R.; WERNER, C.; MANN D.; D'ELIA, J.; SILVA, P. Effects of Saline, Mannitol, and Furosemide on Acute Decreases in Renal Function Induced by Radiocontrast Agents. **New England J. Med.**, v. 331, n. 21, p. 1416-1420, nov. 1994.

SOUSA, D. F. **Estudos das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi***. 2010. 154 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2010.

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

TELEBRIX ácido ioxitalâmico. Rio de Janeiro: Guerbet, 2009. Folder.

TEPEL, M.; ASPELIN, P.; LAMEIRE, N. Contrast-Induced Nephropathy : A Clinical and Evidence-Based Approach. **Circulation**, v. 113, p. 1799-1806, sep. 2006.

THOMSEN, H. S.; MORCOS, S. K. Contrast media and the kidney: European Society of Urogenital Radiology (ESUR) Guidelines. **The British Journal of Radiology**, v. 76, p. 513-518, mai. 2003.

THOMSEN, H. S.; MORCOS, S. K. Radiographic contrast media. **BJU Intl.**, v. 86, suppl. 1, p. 1010, jul. 2000.

ULTRAMARI, F. T.; BUENO, R. R. L.; CUNHA, C. L. P.; ANDRADE, P. M. P.; NERCOLINI, D. C.; TARAŠTCHUK, J. C. E.; FAIDIGA, A. M.; GUÉRIOS, E. E. Nefropatia induzida pelos meios de contraste radiológico após cateterismo cardíaco diagnóstico e terapêutico. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 87, n. 3, p. 378-390, sep. 2006.

VALLS, C.; ANDIA, E.; SANCHES, A.; MORENO, V. Selective use of low-osmolality contrast media in computed tomography. **Eur. Radiol.**, v. 13, n. 8, p. 2000-2005, aug. 2003.

**Viscosidade.** Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Viscosidade> >. Acesso em: 16 out. 2011.

WALSER, M.; DAVIDSON, D.G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkalistable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1955.

WAYBILL, M. M.; WAYBILL, P. N. Contrast media-induced nephrotoxicity: identification of patients at risk and algorithms for prevention. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, v. 12, p. 3-9, 2001.

WIEGELE, G.; BRANDIS, M.; ZIMMERHACKL. Apoptosis and necrosis during ischemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK). **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 13, p. 1158-1167, 1998.

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

YAO, K.; HEYNE, N.; ERLEY, C. M.; RISLER, T.; OSSWALD, H. The selective adenosine A receptor antagonist KW-3902 prevents radiocontrast media-induced nephropathy in rats with chronic nitric oxide deficiency. **European Journal of Pharmacology**, v. 414, p. 99-104, jan. 2001.

YU, L.; ABENSUR, H.; BARROS, E. J. G.; HOMSI, E.; BURDMANN, E. A.; CENDORO GLO NETO, M.; YOUNES-IBRAHIM, M.; SANTOS, O. P. Insuficiência renal aguda: diretriz da Sociedade Brasileira de Nefrologia. **J. Bras. Nefrol.**, v. 24, n. 1, p. 37-39, abr. 2002.