

1 RENOPROTEÇÃO ANTIOXIDANTE DA NEFROPATIA INDUZIDA

2 POR CONTRASTE NO FATOR DE RISCO DIABETES MELLITUS

3 RESUMO

4 A nefropatia induzida por contraste (NIC) é considerada a terceira causa de lesão
5 renal aguda hospitalar e tem o Diabetes Mellitus (DM) como um importante fator de risco.
6 Heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima com ação antioxidante e anti-inflamatória. Este
7 estudo investigou o efeito protetor da HO-1 na função renal, estresse oxidativo, morfologia
8 em ratos diabéticos com NIC. Foram utilizados ratos Wistar, adultos e machos, pesando
9 (250-300g). A nefrectomia unilateral esquerda (Nx) foi realizada no 1º dia. O DM foi
10 induzido pela administração intravenosa (i.v.) de 65 mg/kg de estreptozotocina (STZ, diluída
11 com citrato) no 20º dia, o contraste iodado (CI) ioxitalamato de meglumina, 6 ml/kg, foi
12 administrado (intraperitoneal, i.p.) no 85º dia e o Hemin (indutor da HO-1, 10mg/kg i.p.) foi
13 administrado 60 minutos antes do CI. No total, 26 ratos foram randomizados nos seguintes
14 grupos: Nx+Citrato (controle); Nx+DM; Nx+DM+CI; Nx+DM+CI+H. Foram avaliados
15 parâmetros fisiológicos, a função renal, NGAL urinário, o estresse oxidativo, a expressão
16 gênica e proteica de HO-1 e análise histológica renal. Polifagia, polidipsia, poliúria e
17 hiperglicemia foram observados nos ratos diabéticos ($p < 0,05$). O tratamento com CI
18 favoreceu à redução do *clearance* de creatinina, elevação de NGAL urinário, metabólitos
19 oxidativos, diminuição da reserva antioxidante endógena e aumento na lesão
20 tubulointersticial. O indutor da HO-1 melhorou esses parâmetros com elevação da expressão
21 gênica de HO-1 em ratos diabéticos e redução da síntese proteica no grupo Nx+DM+CI+H.
22 Esse estudo destacou a ação renoprotetora da HO-1 na NIC associada com o fator de risco
23 DM. **Contribuições para a Enfermagem e equipe multiprofissional:** Os achados desta
24 investigação contribuem para a identificação dos pacientes de alto risco para NIC e
25 sensibilizam a equipe multiprofissional em saúde na implementação de inovações
26 terapêuticas e protocolos profiláticos padronizados orientados para a segurança do paciente.

27 .
28 **Palavras-Chave:** Heme Oxigenase-1, Nefrotoxicidade, Estresse Oxidativo, NGAL urinário,
29 Diabetes Mellitus.

31 **ABSTRACT**

32 Contrast-induced nephropathy (NIC) is the third leading cause of hospital-acquired acute
33 kidney injury (AKI). Diabetes Mellitus is an important risk factor for NIC. Heme oxygenase-
34 1 (HO-1) is a heat shock protein that exert renoprotective effect against kidney diseases. This
35 study investigated the protective effect of HO-1 on renal function, oxidative profile,
36 morphology and expression protein of HO-1 in diabetic rats submitted to NIC. Rats were
37 submitted to left uninephrectomy (Nx) on the 1° day. The DM was induced by a single dose
38 of intravenous streptozotocin (65mg/kg i.v.) on the 20° day. The iodine contrast (IC)
39 meglumine ioxithalamate (6ml/kg) and hemin (HO 1 inducer;10mg/kg; i.p.;60 minutes before
40 IC) were infused on the 85° day. Twenty-six Wistar rats weighing 250-300g were randomized
41 into four groups: Nx+Citrate (control), Nx+DM, Nx+DM+IC, Nx+DM+IC+H. Diabetic
42 groups showed polyphagia, polydipsia, polyuria, increase in the blood glucose and reduction
43 in body weight. IC reduced the creatinine *clearance* and thiols in renal tissue with a
44 proeminent increase in urinary NGAL, peroxides, oxide nitric and thiobarbituric acid-reactive
45 substances (TBARS). These paramethers were significantly changed by hemin. The genic
46 expression was increased in diabetic rats, while the protein synthesis was reduced in animals
47 that received hemin. Kidney histology showed tubular cells vacuolization and edema with
48 moderate injury in IC animals. The data highlight the HO-1 renoprotective effect in oxidative
49 damage in the NIC associated with chronic disease, DM. **Contributions to Nursing and the**
50 **multiprofessional team:** The findings of this investigation contribute to the identification of
51 high risk patients for CIN and raise awareness among the multiprofessional health team in the
52 implementation of therapeutic innovations and standardized prophylactic protocols oriented to
53 patient safety.

54 **Keywords:** Heme Oxygenase-1, Nephrotoxicity, Oxidative Stress, Urinary NGAL, Diabetes
55 Mellitus.

56 INTRODUÇÃO

57 A nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma patologia de origem iatrogênica que surge
58 após a administração de contraste iodado (CI) para a realização de exames diagnósticos de
59 imagem ^(1,2). Os pacientes com NIC apresentam disfunção renal caracterizada clinicamente
60 como elevação da creatinina sérica maior ou igual a 0,5 mg/dl ou menor do que 25% do valor
61 basal entre 48 a 72 horas após a injeção do CI, associada à anúria ou oligúria e desequilíbrio
62 de eletrólitos⁽³⁾.

63 A hipóxia é o principal mecanismo da NIC causada por uma vasoconstrição prolongada que
64 induz a formação de moléculas de adesão que facilitam a interação leucócito-endotélio,
65 ativação de mediadores inflamatórios, como as citocinas e os eicosanóides^(2,4). A alta
66 osmolalidade e viscosidade pode intensificar o efeito tóxico dos CIs que se depositam nos
67 túbulos renais e aumentam as pressões intratubulares com redução da taxa de filtração
68 glomerular (TFG) e do fluxo sanguíneo renal (FSR)⁽⁴⁾. A toxicidade tubular direta causada
69 pelo CI pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que aumentam a
70 atividade de transporte das células tubulares, afetando o DNA mitocondrial e nuclear, a
71 membrana lipídica e as proteínas celulares, caracterizado por apoptose e necrose celular⁽⁵⁾.

72 Há fatores de risco que aumentam a nefrotoxicidade por contraste, como disfunção renal
73 prévia decorrente de doença renal crônica ou de comorbidades como o diabetes mellitus
74 (DM), sendo que o rim diabético é particularmente suscetível à intensa hipóxia e ao estresse
75 oxidativo.

76 A prevalência global de DM é de 425 milhões de pessoas 2017 com projeção global esperada
77 de 629 milhões de pessoas em 2045, a qual representará aproximadamente 7,7% da população
78 adulta mundial com idades entre 20 a 79 anos⁽⁶⁾. As complicações relacionadas ao diabetes
79 são as principais causas de morbidade e mortalidade. A hiperglicemia crônica está
80 diretamente relacionada à lesão tecidual, relacionadas principalmente nas células da retina,
81 células mesangiais do glomérulo, neurônios e as células de Schwann dos nervos periféricos⁽⁷⁾.

82 O mecanismo pelo qual o DM predispõe à NIC ainda não está totalmente esclarecido, no
83 entanto, pode estar relacionado às alterações hemodinâmicas provocadas pela ação
84 hiperglicêmica e pela diminuição da capacidade antioxidante renal ^(8,9). Na tentativa de
85 reestabelecer o substrato antioxidante endógeno, substâncias como a estatina e
86 prostaglandinas têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em estudos
87 clínicos de fatores de risco para a NIC ^(10,11).

88 Nesse contexto, este estudo visa elucidar o efeito proteção celular da enzima heme-oxigenase-
89 1 (HO-1). A HO-1 é induzida frente a vários estímulos como a hipóxia, o processo
90 inflamatório e a lesão oxidativa. Estudos relatam a capacidade de citoproteção de HO-1 por
91 meio da remoção do pró-oxidante, heme, e geração de bilirrubina e manutenção da
92 homeostase dos níveis de ferro por meio da síntese da ferritina⁽¹²⁾.
93 Considerando a epidemiologia desfavorável da NIC na atualidade com a explosão de
94 intervenções terapêuticas e diagnósticas com uso de CI e ressaltando que essa complicação
95 acomete principalmente pacientes de risco, com destaque para os diabéticos, a hipótese desse
96 estudo é que o estado de hiperglicemia crônica e disfunção renal predis põem a ocorrência da
97 NIC principalmente nesses casos por possível interferência em mediadores de proteção ou
98 adaptação celular como a HO-1.

99

100 MÉTODOS

101 Estudo de natureza quantitativa e experimental com ratos. Os ratos dos diversos grupos foram
102 mantidos com livre acesso à água e alimentos e permaneceram em condições térmicas
103 adequadas com ciclos alternados de dia e noite. Todos os procedimentos realizados neste
104 estudo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo
105 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA – e foram aprovados pela Comissão
106 de Ética em Experimentação Animal – CEEA (060/12).

107 **Animais:** Foram utilizados 26 ratos da raça *Wistar*, machos, adultos, pesando de 250 a 300
108 gramas distribuídos nos seguintes grupos: ***Nx+Citrato (Controle)***: a nefrectomia unilateral
109 esquerda (*Nx*) foi realizada no 1º dia e no 20º dia foi feita a administração do tampão citrato
110 (0,01M pH4,2, na veia caudal, intravenosa-i.v.); ***Nx+DM***: indução do DM por meio da
111 administração da estreptozotocina (STZ) (65 mg/kg, diluída em tampão citrato 0,01M pH4,2,
112 i.v) no 20º dia ⁽⁷⁻⁸⁾; ***Nx+DM+CI***: animais DM que receberam 6 ml/kg de ioxatlamato de
113 meglumina e sódio intraperitoneal- i.p no 85º dia; ***Nx+DM+CI+H***: animais DM que
114 receberam CI e Hemin (indutor da HO-1, 10mg/kg i.p. 60 minutos antes do CI) no 85º dia.

115 Os animais submetidos ao modelo de DM tiveram a glicemia avaliada por hemoglicoteste, 48
116 horas após a indução, por meio de tiras reagentes Advantage (Advantage – Roche®, Brasil).
117 Os animais que apresentaram glicemia acima de 250mg/dl nesse período foram considerados
118 como diabéticos. Todos os animais diabéticos tiveram o peso corporal do animal e a glicemia
119 monitorados por 12 semanas (85 dias), uma vez por semana.

120 **Obtenção do material biológico:** Ao final do protocolo, os animais foram colocados em
121 gaiolas metabólicas individuais para a coleta de urina de 24 horas para avaliação da função
122 renal e de metabólitos oxidativos. Após esse período, os animais foram anestesiados com
123 tiopental sódico (40-50 mg/kg, i.p.) para a coleta de sangue terminal por meio da punção da
124 aorta abdominal e posterior avaliação da função renal. Ao final do experimento, foi realizada
125 a eutanásia do animal, segundo as normas éticas para o manuseio de animais em pesquisa.

126 **Função renal:** A função renal foi avaliada por meio do *clearance* de creatinina. O método
127 colorimétrico de *Jaffé* foi utilizado para determinar os valores da creatinina sérica e urinária.
128 O *clearance* de creatinina foi calculado pela fórmula⁽¹³⁾: *clearance* de creatinina = creatinina
129 urinária x fluxo urinário de 24horas / creatinina sérica.

130 **NGAL urinário:** Os valores de NGAL foram obtidos por meio da técnica de “enzyme linked
131 immunosorbent assay” (ELISA). A dosagem foi realizada utilizando kit específico da
132 Biovendor Rat Lipocalin-2/NGAL-ELISA⁽¹⁴⁾.

133 **Metabólitos oxidativos:** Os metabólitos oxidativos foram avaliados por meio da dosagem de
134 peróxidos urinários e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A avaliação de
135 peróxidos urinários foi realizada pelo método FOX-2, em que a utilização de ferro-xilenol
136 laranja oxida o íon Fe^{2+} e produz um complexo de coloração azul-arroxeadado ($\alpha = 4,3 \times 10^4 M^{-1}$
137 cm^{-1})⁽¹⁵⁾. A avaliação de TBARS urinários permite a identificação de produtos finais da
138 cascata de peroxidação lipídica que reagem na presença do ácido tiobarbitúrico em fluídos
139 orgânicos ($\alpha = 1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$)⁽¹⁶⁾. A quantificação dos tióis foi realizada a partir de
140 amostras do tecido renal trituradas e homogeneizadas com solução 10 nM de acetato de sódio,
141 0,5% tween-20 e DTPA (pH 6,5). Os resultados inferem a quantidade de um dos principais
142 compostos tiólicos é a glutathiona (GSH) que atua como tampão redox⁽¹⁷⁾. A síntese de NO foi
143 avaliada por meio da quantificação de nitrito (NO_2^-), metabólito estável do NO, pelo método
144 de Griess⁽¹⁸⁾.

145 **Western Blotting:** A proteína foi colocada nos poços do gel de alinhamento e a eletroforese
146 foi realizada com voltagem constante de 200 volts. A imunodeteção utilizou o anticorpo
147 policlonal HO-1 produzido em ratos e o anticorpo secundário IgG conjugado anti-coelho⁽¹⁹⁾.

148 **Expressão gênica:** O nível de expressão gênica da HO-1 foi avaliado através da técnica de
149 PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). A análise da expressão gênica dos dados
150 individuais obtidos pelo RT-PCR foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ pré-estabelecido
151⁽¹⁹⁾.

152 **Histologia do tecido renal:** As alterações tubulointersticiais foram definidas como presença
153 de edema das células epiteliais, degeneração vacuolar, necrose e descamação das células

154 tubulares. As quantificações da lesão tubulointersticial foram graduadas pelo seguinte critério:
155 0,5= menos do que 5% das áreas focais; 1= envolvimento de menos de 5-25% do córtex renal;
156 2= envolvimento de menos de 25-50% do córtex renal; 3= envolvimento de 50-75% do córtex
157 renal e 4= envolvimento de mais de 75% do córtex renal (48). A leitura das lâminas foi
158 realizada em microscópio óptico Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha)⁽²⁰⁾.

159 **Análise Estatística:** Os resultados foram apresentados em média±desvio padrão. A análise
160 estatística dos resultados foi realizada pela análise de variância ANOVA, seguida pelo pós-
161 teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls* do programa estatístico *Graph-Pad*
162 *Prism version-3 for Windows*®. O nível de significância considerado foi de $p<0,05$.

163

164 **RESULTADOS**

165 **Parâmetros fisiológicos**

166 Os parâmetros fisiológicos dos grupos foram demonstrados por meio da ingesta de ração e de
167 água, glicemia, peso corporal do animal, peso do rim D, relação peso do rim/ peso do animal
168 e volume urinário expressos na Tabela 1. Nos ratos diabéticos, as características que
169 confirmam o modelo de DM são a polidipsia e a polifagia, indicadas pelo aumento na ingesta
170 de ração e água e a hiperglicemia. Foi possível observar redução no peso corporal dos grupos
171 Nx+DM, Nx+DM+CI e Nx+DM+CI+H quando comparados ao grupo controle. Os grupos
172 DM apresentaram um coeficiente de hipertrofia renal, representado pela elevação da relação
173 peso rim/peso animal, sendo os maiores índices observados para os animais que receberam
174 CI. A poliúria foi observada em todos os animais diabéticos com elevação adicional nos
175 grupos que receberam CI.

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

Parâmetros	Nx+Citrato	Nx+DM	Nx+DM+CI	Nx+DM+CI+H
	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Ingestão de água (ml/24h)	24±6	113±35 ^a	198±39 ^{ab}	169±21 ^{ab}
Ingestão de comida (g/24h)	13±5	25±8 ^a	36±8 ^{ab}	31±3 ^a
Glicemia (mg/dL)	110±12	549±32 ^a	567±48 ^a	588±43 ^a
Peso corporal (g)	510±27	390±26 ^a	333±31 ^a	258±48 ^{abc}
Peso Renal (g)	2,64±0,54	3,06±0,41	3,05±0,30	2,86±0,59
KW/BW (x10 ⁻³)	0,52±0,13	0,78±0,07 ^a	0,91±0,08 ^{ab}	1,12±0,26 ^{ab}
Fluxo Urinário (ml/min)	0,01±0,02	0,06±0,01 ^a	0,09±0,01 ^{ab}	0,10±0,01 ^{ab}

187 KW: peso renal, BW: peso corporal. Os valores representam média ± desvio padrão. ^ap<0,05

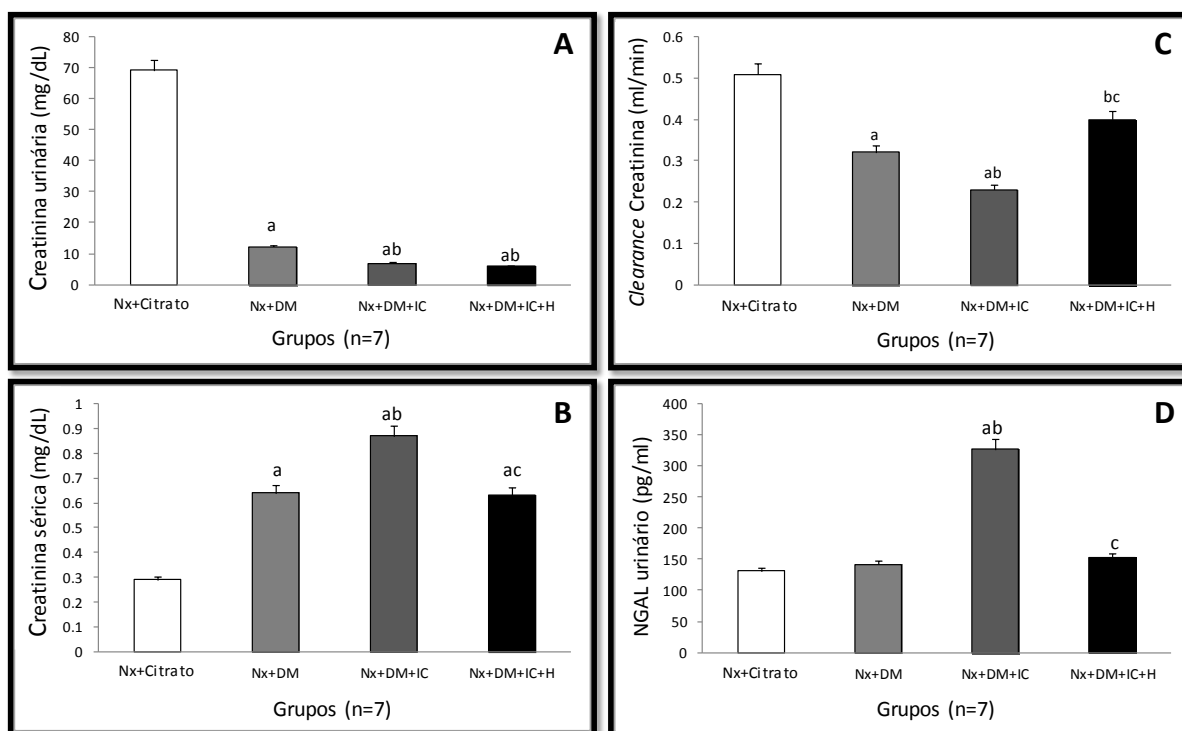
188 vs the Nx+Citrato, ^bp<0,05 vs the Nx+DM, ^cp<0,05 vs the Nx+DM+CI.

189

190 **Função renal e NGAL urinário**

191 A figura 1 demonstra que os animais diabéticos apresentaram redução significativa de
 192 creatinina urinária quando comparados com o controle (Nx+DM: 12,2±2,7; Nx+DM+CI:
 193 6,8±2,0 e Nx+DM+CI+H: 5,8±1,0 vs Nx+Citrato: 69,2±7,6; p<0,001). Observou-se também
 194 aumento significativo na creatinina sérica nas mesmas comparações (Nx+DM: 0,64±0,05;
 195 Nx+DM+CI: 0,87±0,16 e Nx+DM+CI+H: 0,63±0,16 vs Nx+Citrato: 0,29±0,04; p<0,001). O
 196 grupo Nx+DM demonstrou redução significativa nos valores do *clearance* de creatinina em
 197 relação ao grupo controle (Nx+DM: 0,32±0,05 vs Nx+Citrato: 0,51±0,08; p<0,001).
 198 Adicionalmente, observou-se que os animais diabéticos que receberam CI apresentaram
 199 redução da função renal quando comparados com o grupo Nx+DM (Nx+DM+CI: 0,23±0,03
 200 vs Nx+DM: 0,32±0,05; p<0,001). A indução da HO-1 favoreceu o aumento da taxa de
 201 filtração glomerular demonstrando uma ação renoprotetora no grupo Nx+DM+CI+H quando
 202 comparado com o seu controle: Nx+DM+CI (Nx+DM+CI+H: 0,40±0,07 vs Nx+DM+CI:
 203 0,23±0,03). Com relação ao NGAL urinário, observou-se elevação significativa deste
 204 biomarcador no grupo Nx+DM+CI em comparação com os grupos Nx+Citrato e Nx+DM
 205 (Nx+DM+CI: 327,2±61,1 vs Nx+Citrato: 130,9±50,3; Nx+DM: 141,8±42,7, p<0,05). O
 206 indutor da HO-1 favoreceu a redução deste parâmetro (Nx+DM+CI+H: 152,4±57,8 vs
 207 Nx+DM+CI: 327,2±61,1, p<0,05).

208



209
 210 Figura 1: Creatinina sérica, Creatinina Urinária, Clearance de creatinina e NGAL urinário.
 211 ^a p<0,05 vs Nx+Citrato; ^bp<0,05 vs Nx+DM; ^cp<0,05 vs Nx+DM+CI. Os dados são
 212 mostrados como media ±DP. São Paulo, SP, Brasil, 2017.

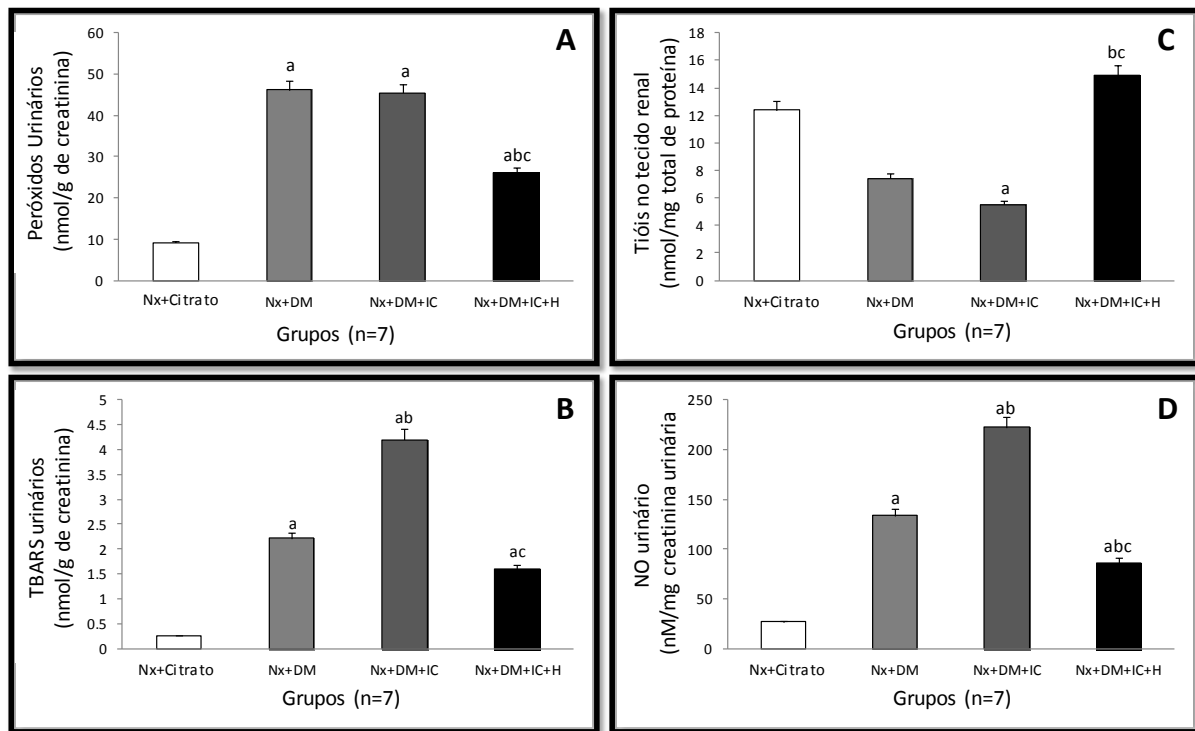
213
 214 **Metabólitos oxidativos**

215 Na figura 2 observa-se elevação dos peróxidos urinários e os TBARs urinários nos grupos
 216 Nx+DM e Nx+DM+CI quando comparados com o grupo Nx+Citrato (P.U: Nx+DM:
 217 46,2±21,8; Nx+DM+CI: 45,4±10,2 vs Nx+Citrato: 9,2±2,7; TBARs: Nx+DM: 2,22±0,61;
 218 Nx+DM+CI: 4,20±1,04 vs NX+Citrato: 0,26±0,07, p<0,05). O tratamento com Hemin
 219 induziu a redução na liberação dos metabólitos oxidativos (P.U: Nx+DM+CI+H: 26,1±13,1 vs
 220 Nx+DM: 46,2±21,8; Nx+DM+CI: 45,4±10,2; TBARs: Nx+DM+CI+H:1,61±0,26 vs Nx+DM:
 221 2,22±0,61; Nx+DM+CI: 4,20±1,04, p<0,05).

222 Por outro lado, os tióis demonstraram redução nos seus níveis nos grupos Nx+DM e
 223 Nx+DM+CI quando comparados com o grupo Nx+Citrato (Nx+DM: 7,4±2,9; Nx+DM+CI:
 224 5,5±1,9 vs Nx+Citrato: 14,9±3,7, p<0,05). Quando administrado o indutor da HO-1 este
 225 parâmetro foi reestabelecido (Nx+DM+CI+H: 14,9±3,7 vs Nx+DM: 7,4±2,9; Nx+DM+CI:
 226 5,5±1,9, p<0,05).

227 O óxido nítrico urinário está relacionado à quantidade de nitratos presentes na urina. A
 228 elevação desta variável pressupõe maior processo oxidativo, o qual foi possível observar nos

229 grupos Nx+DM e Nx+DM+CI quando comparados com o grupo Nx+Citrato (Nx+DM:
 230 133,5±23,7; Nx+DM+CI: 222,2±63,8 vs Nx+Citrato: 26,5±10,9, p<0,05). O tratamento com
 231 Hemin reverteu significativamente esse parâmetro (Nx+DM+CI+H: 86,5±17,4 vs Nx+DM:
 232 133,5±23,7; Nx+DM+CI: 222,2±63,8, p<0,05).
 233



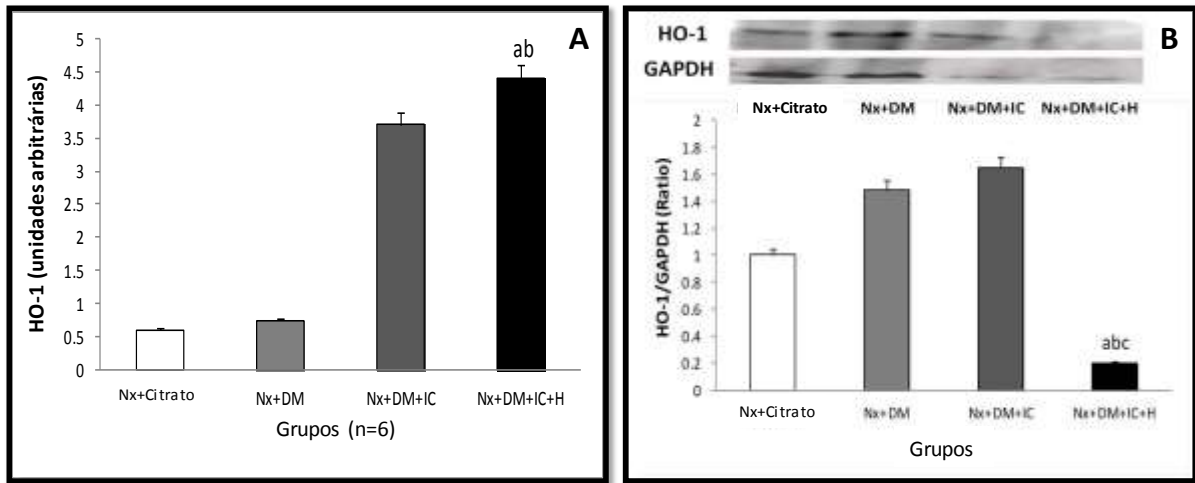
234
 235 Figura 2: Peróxidos urinários, TBARS urinário, tióis no tecido renal e NO urinário. ^a p<0,05
 236 vs Nx+Citrato; ^b p<0,05 vs Nx+DM; ^c p<0,05 vs Nx+DM+CI. Os dados são mostrados como
 237 media ±DP. São Paulo, SP, Brasil, 2017.

238
 239 **Western Blotting e expressão gênica**

240 A figura 3A demonstra a avaliação da expressão gênica da HO-1 por meio da técnica PCR-
 241 real time. Observou-se elevação da expressão gênica de HO-1 nos grupos Nx+DM+CI+H e
 242 Nx+DM+CI em comparação com os grupos Nx+Citrato e Nx+DM (Nx+DM+CI+H:
 243 4,40±3,94; Nx+DM+CI: 3,70±2,48 vs Nx+Citrato: 0,59±0,38; Nx+DM: 0,74±0,51, p<0,05).

244 A figura 3B demonstra a expressão proteica de HO-1 em todos os grupos. Observou-se uma
 245 expressão elevada nos grupos Nx+DM e Nx+DM+CI. Por outro lado, os animais que
 246 receberam o tratamento com o Hemin demonstraram uma redução na expressão de HO-1.

247



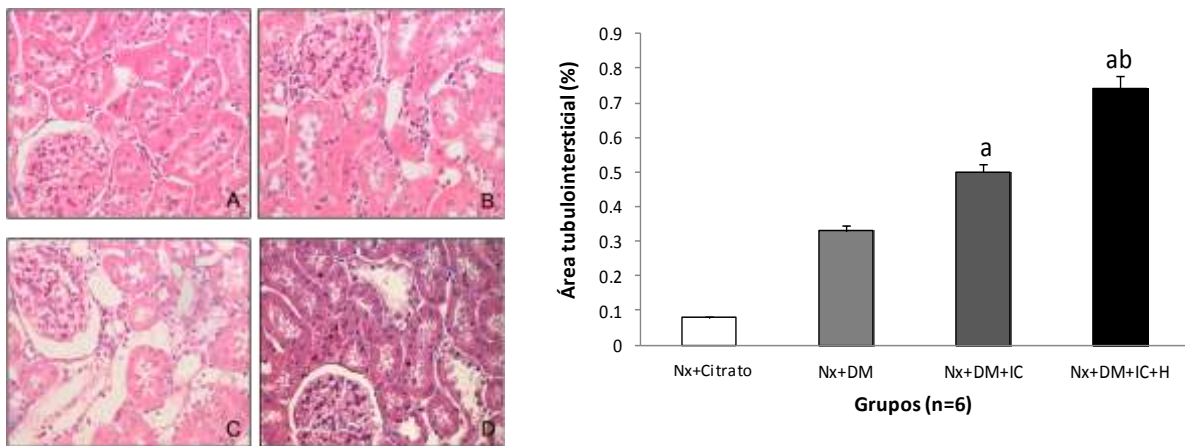
248

249 Figura 3: Expressão gênica (A) e proteica (B) da HO-1. ^a $p < 0,05$ vs Nx+Citrato; ^b $p < 0,05$ vs
 250 Nx+DM; ^c $p < 0,05$ vs Nx+DM+CI . Os dados são mostrados como media \pm DP. São Paulo, SP,
 251 Brasil, 2017.

252 **Histologia do tecido renal**

253 Os grupos Nx+DM apresentou discretas alteração de característica segmentar e focal. Os
 254 grupos Nx+DM+CI e Nx+DM+CI+H apresentaram lesões em 5% da área tubulointersticial.

255



256

257 Figura 4: Fotos dos cortes histológicos e avaliação da área tubulointersticial (aumento 400x)
 258 dos grupos: Nx+Citrato (A), Nx+DM (B), Nx+DM+CI (C), Nx+DM+CI+H (D). ^a $p < 0,05$ vs
 259 Nx+Citrato; ^b $p < 0,05$ vs Nx+DM. Os dados são mostrados como media \pm DP. São Paulo, SP,
 260 Brasil, 2017.

261

262

263 DISCUSSÃO

264 A elucidação da NIC no modelo experimental de DM como fator de risco vislumbra a
265 crescente demanda de estratégias para prevenção de lesões renais pela equipe
266 multiprofissional em saúde. Neste estudo o indutor da HO-1 se caracterizou como fármaco
267 promissor na proteção das lesões oxidativas e morfológicas renais.

268 A mensuração dos parâmetros fisiológicos confirmou nesta investigação que o modelo de
269 diabetes experimental foi padronizado demonstrado pela polifagia, polidipsia, hiperglicemia,
270 redução do peso corporal, hipertrofia renal e poliúria segundo os dados da literatura ^(21,22). A
271 indução do DM deu-se por meio da STZ – um quimioterápico que degenera as células β do
272 pâncreas, comprometendo a produção de insulina. Instalou-se um quadro hiperglicêmico
273 crônico, que na ausência de tratamento pode resultar em uma progressiva expansão da matriz
274 mesangial glomerular, principalmente pelo acúmulo extracelular do colágeno IV, laminina,
275 fibronectina e proteoglicanos ^(22,23).

276 Os animais diabéticos demonstraram aumento do peso relativo renal (peso do rim/peso
277 corporal) que se caracteriza por hiperplasia e hipertrofia, as quais resultam no aumento da
278 massa do túbulo proximal, favorecendo intensa reabsorção proximal. O aumento da área
279 tubular favorece a reabsorção do ultrafiltrado glomerular e menores volumes e concentrações
280 de eletrólitos, como Na^+ , Cl^- e K^+ , que alcançam a área da mácula densa e a porção final da
281 alça de Henle e elevam a TFG por meio da ação fisiológica normal do sistema feedback
282 tubuloglomerular^(21,23). No presente estudo, foi evidente o aumento no fluxo urinário
283 (poliúria) nos animais DM, sendo resultante, portanto, da hipertrofia tubular via hiperfiltração
284 glomerular de hiper-reabsorção ⁽²⁴⁾. Estudos in vivo demonstram que a hipertrofia renal se
285 define como o estágio inicial da doença renal diabética ^(23,25). Por outro lado, a perda
286 progressiva de peso corporal observada se justifica pela incapacidade de as células endoteliais
287 modularem as taxas de transporte de glicose, levando ao seu acúmulo no espaço intracelular.
288 A gluconeogênese é estimulada para compensar os níveis reduzidos de glicose em função da
289 indisponibilidade da insulina, levando ao comprometimento da composição corporal total ⁽²¹⁾.

290 A condição da hiperglicemia crônica favoreceu neste estudo o desenvolvimento da NIC em
291 um modelo experimental de fator de risco. Os resultados da função renal ilustram este tipo de
292 LRA. A redução adicional do *clearance* de creatinina nos animais diabéticos que receberam
293 CI demonstrou a ação deletéria da associação dos fatores metabólicos e hemodinâmicos
294 envolvidos na NIC. A alta carga de glicose filtrada nas células tubulares é potencializada,
295 após um insulto tóxico resultante da hiper osmolaridade (1000 mOsm/kg) do CI, que é maior

296 que a do sangue (275 a 299 mOsm/kg). Portanto, ocorre a liberação de substâncias vasoativas,
297 como endotelina, adenosina e tromboxanes, iniciando-se a fase vasoconstritora da NIC, com
298 redução FSR e da TFG, confirmada por dados histológicos com intensa vacuolização do
299 túbulo proximal ^(2,3). No modelo animal pré-condicionado com isquemia, a indução da NIC
300 foi resultado da administração de alta dose (10 g/l/kg) do CI iopromide, que revelou um
301 aumento da creatinina sérica e da fração de excreção de sódio após 48 horas da infusão do
302 contraste ⁽²⁶⁾. Adicionalmente, a elevação do NGAL urinário nos animais que receberam CI
303 destaca a especificidade deste novo biomarcador na identificação precoce das lesões renais.
304 Estudo clínico revelou que elevação de NGAL urinário em pacientes com LRA antecedeu as
305 alterações da creatinina sérica ⁽²⁷⁾.

306 Por outro lado, a indução da HO-1 aumentou a taxa de filtração glomerular por meio do
307 *clearance* de creatinina e reduziu os níveis de NGAL urinário após o insulto nefrotóxico do
308 CI, demonstrando uma ação renoprotetora que pode ser resultante de um mecanismo
309 vasodilatador e anti-inflamatório induzido pela formação de produtos como o monóxido de
310 carbono e bilirrubina. Fonseca et al revelaram semelhante proteção da função renal pela
311 indução da HO-1 no modelo de nefrotoxicidade da Polimixina B em ratos ⁽²⁸⁾.

312 Além da ação hemodinâmica via endotélio renal, a HO-1 tem demonstrado mecanismos
313 protetores em lesões oxidativas no rim, coração e fígado, confirmando a ação dessa enzima
314 nas diferentes injúrias resultantes da hipóxia celular prolongada ⁽²⁸⁻³⁰⁾.

315 No presente estudo, os animais diabéticos que receberam CI apresentaram elevação dos
316 peróxidos, TBARS e NO urinário e diminuição dos tióis no tecido renal. Os peróxidos
317 apresentam alta penetração nas membranas biológicas, sendo um sinalizador intracelular de
318 moléculas. Uma vez produzidos em excesso, eles desencadeiam a produção do OH⁻, o qual é
319 responsável pelo edema mitocondrial, com liberação de toxinas que contribuem para a
320 persistente hipóxia da região medular, evoluindo para a necrose tubular aguda ⁽³¹⁾. Os TBARS
321 mensuram indiretamente o MDA. No processo de peroxidação lipídica, o ferro catalisado
322 resulta na formação do radical peroxil (ROO⁻). Uma vez formado, o ROO⁻ participa da
323 liberação de endoperóxidos, resultando no produto final, conhecido como MDA ^(16,31). O
324 MDA pode reagir com as bases guanina, adenina e citosina do DNA para formar os produtos
325 M₁G, M₁A, M₁C, que são nocivos para o parênquima renal ⁽³¹⁾. A variável NO urinária
326 sinaliza produção exacerbada de NO associado a um estado de lesão. Esse estado favorece a
327 interação do ânion superóxido com o NO formando as proteínas de nitrato livres e ânions
328 peroxidonitritos (ONOO⁻), que são potentes oxidantes com ação deletéria para o parênquima
329 renal⁽¹⁹⁾. Na tentativa de reestabelecer o equilíbrio redox, animais diabéticos com contraste

330 revelaram consumo exacerbado de tióis no tecido renal. Essa equação resulta indiretamente na
331 atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase.

332 O tratamento com o indutor da HO-1 reverteu significativamente esses parâmetros,
333 demonstrando a ação antioxidante desse agente. Um recente estudo revelou que a indução da
334 HO-1 promoveu redução do estresse oxidativo por meio do aumento da enzima antioxidante
335 superóxido dismutase (SOD) e diminuição da liberação do MDA intracelular e Goodman et al
336 demonstraram renoproteção da HO-1 por meio da regulação das proteínas anti-apoptóticas na
337 lesão renal aguda induzida por contraste em ratos ^(32,33).

338 Neste contexto, os estímulos resultantes da peroxidação lipídica induzem a HO-1 como
339 resposta citoprotetora contra os mecanismos de lesão do DM e sua associação com o contraste
340 iodado. Nesse estudo, a NIC estimulou a expressão gênica da HO-1. No entanto, não é
341 possível confirmar a participação desta enzima como citoprotetora. Neste sentido, a expressão
342 proteica de HO-1 aumentada nos animais que receberam contraste iodado demonstra a intensa
343 atividade enzimática resultante da lesão oxidativa celular. Por outro lado, o tratamento com o
344 indutor da HO-1 revelou redução da expressão proteica, reestabelecendo o equilíbrio redox.

345 Adicionalmente, foi avaliado neste estudo as principais alterações histopatológicas da NIC.
346 Os achados histológicos dos animais que receberam CI se caracterizam por vacuolização
347 epitelial tubular, congestão luminal, edema e achatamento das células epiteliais, com
348 formação de castas intratubulares e presença de infiltrado intersticial na arquitetura celular
349 renal. As mudanças histológicas são focais, acometendo 5% das células tubulares renais. A
350 HO-1 não revelou melhora nessa variável.

351 Sumariamente, este estudo destacou a ação renoprotetora da HO-1 frente à fragilidade do
352 sistema renal para os insultos tóxicos do CI e metabólicos da hiperglicemia crônica, que pode
353 se caracterizar como fator de risco modificável, dependendo da abordagem clínica. Além
354 disso, esses achados alertam a comunidade científica para o reconhecimento precoce dos
355 pacientes vulneráveis a NIC, sendo necessária a elaboração de novos protocolos diferenciados
356 de identificação do paciente para a equipe multidisciplinar e estratégias preventivas
357 inovadoras visando reverter os efeitos adversos da NIC.

358

359

360

361 **REFERÊNCIAS**

- 362 1. Wood SP. Contrast-induced nephropathy in critical care. *Crit Care Nurs.* 2012; 32(6):15-
363 22.
- 364 2. Heyman SN, Rosen S, Rosenberg Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation and
365 the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin Am Soc Nephrol.* 2008; 3(1): 288-
366 96.
- 367 3. Wong PCY, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy.
368 *Int J Cardiol.* 2012; 158(2): 186-92.
- 369 4. McCullough PA, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, Stacul F, Tumlin J.
370 Risk Prediction of Contrast-Induced Nephropathy. *Am J Cardiol.* 2006; 98(suppl):27k-
371 36k.
- 372 5. Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée JM, Rosenberger C. Reactive oxygen species
373 and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. *Invest Radiol.* 2010;
374 45(4):188-95.
- 375 6. Chen L, Maglianno DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes
376 mellitus – present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 8(4):228-36.
- 377 7. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.
378 *Diabetes.* 2005; 54(6):1615-25.
- 379 8. Sleetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for
380 diabetic complications. *JAMA.* 2002; 288(20): 2579-88.
- 381 9. Wang F, Li M, Cheng L, Zhang T, Hu J, Cao M, Zhao J, Guo R, Gao L, Zhang X.
382 Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced
383 diabetic rats. *Life Sci.* 2008; 83(25-26):828-35.
- 384 10. Spargias K, Adreanides E, Demerouti E, Gkouziouta A, Manginas A, Pavlides G,
385 Voudris V, Cokkinos DV. Iloprost prevents contrast-induced nephropathy in patients
386 with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention. *Circulation.*
387 2009; 120(18):1793-9.
- 388 11. Koch JA, Plum J, Grabensee B, Modder U. Prostaglandin E₁: a new agent for the
389 prevention of renal dysfunction in high risk patients caused by radiocontrast media?
390 PGE₁ study group. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15(1):43-9.
- 391 12. Abraham NG, Cao J, Sacerdoti D, Li X, Drummond G. Heme oxygenase: the key to
392 renal function regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: (5) F1137-52.

- 393 13. Watanabe M, de Moura Neiva LB, da Costa Santos CX, Martins Laurindo FR, de
394 Fatima Fernandes Vattimo M. Isoflavone and the heme oxygenase system in ischemic
395 acute kidney injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(12): 2366-71.
- 396 14. Fernandes SM, Fonseca CD, Watanabe M, Martins DM, Vattimo MFF. Impact of
397 Iodinated Contrast on Renal Function and Hemodynamics in Rats with Chronic
398 Hyperglycemia and Chronic Kidney Disease. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3019410. doi:
399 10.1155/2016/3019410.
- 400 15. Wolff SP. Ferrous ion oxidantion in presence of ferric ion indicator xylenol orange for
401 mensurament of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 182-89.
- 402 16. Walker PD, Shah SV. Reactive oxygen metabolites in endotoxin-induced acute renal
403 failure in rats. *Kidney Int.* 1990; 38(6): 1125-32.
- 404 17. Akerboom TPM, Sies H. Assay glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed
405 disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981; 77: 373-82.
- 406 18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.
407 Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;
408 126(1):131-8.
- 409 19. Pessoa EA, Convento MB, Silva RG, Oliveira AS, Borges FT, Schor N. Gentamicin-
410 induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide
411 production but not the synthesis of heat shock protein. *Braz J Med Biol Res.* 2009;
412 42(7): 614-20.
- 413 20. Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A. Role of increase in p21 in cisplatin-
414 induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(5): 900-8.
- 415 21. Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in
416 the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol.* 2012; 74: 351-75.
- 417 22. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;
418 93(1): 137-88.
- 419 23. Sun H, Ge N, Shao M, Cheng X, Li Y, Li S, et al. Lumbrokinase attenuates diabetic
420 nephropathy through regulating extracellular matrix degradation in streptozotocin-
421 induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013; 100(1): 85-95.
- 422 24. Adler S. Structure-Function relationships associated with extracellular matrix alterations
423 in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 1994; 5(5): 1165-72.
- 424 25. Chen LH, Stead B, Advani SL, Yaqoob N, Thai K, Kabir MG, et al. Hyperglycemia and
425 renal mass ablation synergistically augment albuminuria in the diabetic subtotally

- 426 nephrectomized rat: implications for modeling diabetic nephropathy. *Nephron Extra.*
427 2012; 2(1): 115-24.
- 428 26. Diamantopoulos A, Kyriazis I, Geronatsiou K, Papadaki H, Loudos G, Kagadis GC, et
429 al. Prastatin prevents renal injury following ischemia/reperfusion and radiocontrast
430 administration. *Am J Nephrol.* 2012; 36(3): 278-86.
- 431 27. Watanabe M, Silva GF, Fonseca CD, Vattimo Mde F. Urinary NGAL in patients with
432 and without acute kidney injury in a cardiology intensive care unit. *Rev Bras Ter*
433 *Intensiva.* 2014;26(4):347-54. doi: 10.5935/0103-507X.20140053.
- 434 28. Dezoti C, Watanabe M, Vattimo MFF. Heme oxygenase-1 role in the Polymyxin B-
435 induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2012; 56(10): 5082-
436 7.
- 437 29. Issan Y, Kornowski R, Aravot D, Shainberg A, Laniado-Schwartzman M, Sodhi K,
438 Abraham NG, Hochhauser E. Heme oxygenase-1 induction improves cardiac function
439 following myocardial ischemia by reducing oxidative stress. *PLoS One.*
440 2014;9(3):e92246.
- 441 30. Liu A, Fang H, Wei W, Dirsch O, Dahmen U. Ischemic preconditioning protects against
442 liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy. *Crit Care*
443 *Med.* 2014;42(12):e762-71.
- 444 31. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med.* 2000;
445 109(8): 665-78.
- 446 32. Gao Z, Han Y, Hu Y, Wu X, Wang Y, Zhang X, Fu J, Zou X, Zhang J, Chen X, Jose
447 PA, Lu X, Zeng C. Targeting HO-1 by Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Contrast-
448 Induced Renal Injury via Anti-Oxidative Stress and Anti-Inflammation Pathways. *PLoS*
449 *One.* 2016;11(2):e0149032. doi: 10.1371/journal.pone.0149032.
- 450 33. Goodman Al, Olszanecki R, Yang LM, Quan S, Li M, Omura S, Stec DE, Abraham NG.
451 Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by
452 regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Inter.* 2007; 72: 945-53.

453

454