

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROMULO CÉZAR PIZZOLATTI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEFEROXAMINA E DA N-
ACETILCISTEÍNA NA NEFROPATIA INDUZIDA PELO MEIO DE
CONTRASTE IODADO EM RATOS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROMULO CÉZAR PIZZOLATTI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEFEROXAMINA E DA N-
ACETILCISTEÍNA NA NEFROPATIA INDUZIDA PELO MEIO DE
CONTRASTE IODADO EM RATOS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Professora Orientadora: Dra.Cristiane Ritter

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2010

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrado o meu agradecimento a todos que participaram, de alguma forma, no desenvolvimento e na conclusão deste trabalho.

À Unesc pela oportunidade a mim oferecida trinta e três anos após a minha graduação.

À minha orientadora, Dra. Cristiane Ritter, pelo tempo dedicado e pelas orientações recebidas.

Aos componentes do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, em especial ao Dr. Felipe Dal-Pizzol, Fabricia, Larissa, Franciele, Fabíola e Francine, pela cooperação e ajuda.

À secretária do PPGCS, Francilani Demarch, pelo seu prestativo atendimento aos alunos do mestrado.

Aos colegas do mestrado, pela companhia e amizade.

Enfim, à minha esposa Angela pela ajuda nas traduções e aos meus filhos Marcos, Lucile e Amanda pelos trabalhos prestados na parte da informática.

Todos vocês foram indispensáveis para que eu pudesse vencer mais esse desafio.

Muito obrigado!

RESUMO

Pacientes diabéticos estão em maior risco para o desenvolvimento de nefropatia induzida pelo contraste (NIC) e, neste sentido, constituem uma população alvo para estudos de prevenção desta importante complicação com substancial morbimortalidade. Até o momento, várias medidas, incluindo o uso de N-acetilcisteína (NAC), foram testadas sem, entretanto, apresentar resultados definitivos. Neste trabalho determinamos a eficácia da combinação de NAC e deferoxamina (DFX) em um modelo animal de diabetes e NIC. Diabetes foi induzido em ratos Wistar machos pela administração de única dose intraperitoneal de aloxano (150mg/kg). Grupos com e sem diabetes foram expostos a meio de contraste (MC) (6mL/kg) e divididos nos seguintes grupos: salina, salina + contraste, salina + MC + NAC, salina + MC + DFX, salina + MC + NAC + DFX, aloxano, aloxano + MC, aloxano + MC + NAC, aloxano + MC + DFX e aloxano + MC + NAC + DFX. As doses nos grupos que receberam antioxidante foram: NAC (20 mg/kg, subcutânea, a cada 6 h por 6 dias) e/ou DFX (20 mg/kg, subcutânea, a cada 24h por 6 dias). Amostras de sangue foram retiradas da veia caudal 6 dias após a administração do MC para determinar a função renal. Além disso, tecido renal foi isolado para determinação de marcadores de estresse oxidativo, conteúdo de nitrito/nitrato e atividade de mieloperoxidase (MPO). Em animais não diabéticos a NIC foi atenuada com o uso de DFX e NAC + DFX, mas não com o uso isolado de NAC. Diferentemente, o aumento de creatinina em ratos diabéticos foi revertido por todos os esquemas antioxidantes utilizados. Tanto em ratos diabéticos quanto em não diabéticos, a NIC levou a aumento de estresse oxidativo que foi avaliado pela taxa de Substâncias Reativas ao Ácido Tio-Barbitúrico (TBARS) e de Conteúdo de Proteína Carbonil (CPP) e parâmetros inflamatórios renais através da Concentração de nitrito/nitrato e da atividade da

MPO. Todas estas alterações foram atenuadas pelo uso de antioxidantes. Em conclusão, a presença de estresse oxidativo e inflamação tem papel relevante na patogênese da NIC tanto em animais diabéticos quanto em não diabéticos, mas a adição de DFX parece ser relevante apenas para população de ratos não diabéticos submetidos a NIC.

PALAVRAS CHAVE

Nefropatia induzida pelo contraste; diabete; antioxidante; inflamação.

ABSTRACT

Individuals with diabetes mellitus are at increased risk for contrast-induced nephropathy (CIN) and thereby constitute an appropriate target population for efforts at prevention of this important complication with substantial associated mortality risk. To date, treatment measures, that include N-acetylcysteine, provide incomplete protection from this alteration. We here, determined the usefulness of the combination of N-acetylcysteine (NAC) and deferoxamine (DFX) in animal model of diabetes and contrast-induced nephropathy. Diabetes was induced male Wistar rats by using a single intraperitoneal injection of alloxan (150 mg/kg). Both the diabetic and nondiabetic rats were exposed to contrast medium (6mL/kg) being divided in the following groups: saline, saline + contrast, saline + contrast + NAC, saline + contrast + DFX, saline + contrast + NAC + DFX, alloxan, alloxan + contrast, alloxan + contrast + NAC, alloxan + contrast + DFX and alloxan + contrast + NAC + DFX. Antioxidant groups received NAC (20 mg/kg, sc, each 6 h for 6 days) and/or DFX (20 mg/kg, sc, each 24h for 6 days). Blood samples were obtained from caudal vein 6 days after contrast administration to the determination of renal function. In addition, it was determined in the kidney markers of oxidative damage, nitrite/nitrate content and myeloperoxidase activity. In non-diabetic rats, CIN was attenuated using DFX and NAC+DFX, but not when NAC was used alone. In contrast, the increased in creatinine levels in CIN plus diabetes animals was reversed in similar extent with all antioxidants used. Both in diabetic and non-diabetic CIN induced an increase on oxidative and inflammatory parameters, and these alterations were attenuated by all antioxidant treatments used. In conclusion, induction of oxidative stress and inflammation plays a relevant role in the pathogenesis of CIN in diabetic and non-

diabetic animals, but the addition of DFX seemed to be relevant only in the non-diabetic population subjected to CIN.

KEY - WORDS

Contrast-induced nephropathy; diabetes; antioxidant; inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BÁSICAS DA NEFROPATIA INDUZIDA PELO CONTRASTE	09
1.2 FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA INDUZIDA PELO CONTRASTE	11
1.3 PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA INDUZIDA PELO CONTRASTE	13
2 OBJETIVO	17
Artigo Científico - <i>Differential effects of N-acetylcysteine and deferoxamine in diabetic and non-diabetic rats submitted to contrast-induced nephropathy</i>	18
3 DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, na medicina, deparamo-nos com situações que necessitamos de métodos propedêuticos para diagnosticarmos e, muitas vezes, detalharmos a lesão que não é tão evidente ao exame previamente efetuado. Dentre estes métodos um dos mais usados é o exame radiológico, principalmente com MC. Procedimentos radiológicos que requerem administração endovenosa de contraste iodado tornaram-se grande fonte de uma doença iatrogênica conhecida como NIC (Burdmann et al., 2003).

O uso de agentes de contraste pode gerar efeitos colaterais como reações alérgicas sistêmicas, reações adversas cardíacas (hipertensão, taquicardia, arritmia), efeitos vasculares (agregação plaquetária, vasoconstrição, trombose) e efeitos adversos renais. A severidade dos efeitos colaterais depende basicamente de três fatores: a quantidade de agente utilizada, a natureza do composto e a pré-existência de fatores de riscos. Os efeitos colaterais do meio de contraste dependem das suas propriedades físico-químicas. Compostos monoméricos com carga iônica são automaticamente agentes de contraste de alta osmolaridade e são diluídos mais rapidamente do que os compostos de baixa osmolaridade ou isotônicos. A carga iônica é responsável por um aumento da interação do MC com biomacromoléculas, e é medido pela avidéz do meio de contraste em se ligar às proteínas, tornando-o mais lesivo (Katayama et al., 1990). A osmolaridade está relacionada com o número de partículas osmoticamente ativas de soluto contidas em um litro de solução (volume). A osmolalidade é o número de partículas osmoticamente ativas de soluto contidas em um kg do solvente (massa). A alta osmolaridade determina alguns efeitos imediatos como dor, vasodilatação e bradicardia. Em humanos, meios de

contraste de alta osmolaridade provocam redução significativa do fluxo sanguíneo renal em comparação aos de baixa osmolaridade (Russo et al., 1990)

1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BÁSICAS DA NEFROPATIA INDUZIDA PELO CONTRASTE

O quadro clínico da NIC varia desde alterações leves na função renal até injúria renal aguda (IRA) dependente de diálise (geralmente com duração de 2 a 4 semanas). A lesão pode ser irreversível em cerca de 4% dos pacientes que já tem déficit da função renal moderada a grave, determinando a inclusão do paciente em terapia renal substitutiva definitiva. A evidência laboratorial caracteriza-se pela elevação da creatinina sérica 48 a 72 horas após a injeção do contraste, com retorno aos valores basais entre o 7º e 10º dia pós-exposição.

NIC é a terceira causa mais frequente de IRA em paciente internado e está associada com prolongada hospitalização, potencial necessidade de terapia renal substitutiva e aumento da mortalidade (McCullough et al., 2006; Tepel et al., 2006). A incidência de pacientes de alto risco para NIC está aumentando mundialmente (Toprak & Cirit, 2006; Toprak et al., 2008). Cerca de 90% dos pacientes com doença renal crônica, diabetes mellitus, síndrome metabólica, hipertensão e com idade acima de 70 anos, desenvolvem NIC segundo Toprak & Cirit (2006) quando expostos ao meio de contraste. Pertencem também ao grupo de risco os pacientes que apresentam insuficiência cardíaca, desidratação, proteinúria, hepatopatia, hiperuricemia, mieloma múltiplo e aqueles que já receberam repetidamente o MC ou que estejam recebendo fármacos nefrotóxicos como anti-inflamatórios não-esteroidais, metformina, aminoglicosídeos, diuréticos, etc.

Estudo de Moussa (2008) mostra que pacientes diabéticos apresentam, devido à hiperglicemia, aumento da taxa de Malondialdeído (MDA) e da atividade da superóxido dismutase (SOD) e uma redução da glutathiona (GSH) quando comparados a pacientes controles não diabéticos.

Em pacientes diabéticos, a hiperglicemia causa aumento na produção de radicais livres especialmente espécies reativas de oxigênio (ROS). Os radicais livres são gerados como produtos do metabolismo celular normal; entretanto várias condições são conhecidas para desregular o balanço entre a produção de ROS e os mecanismos celulares de defesa.

O aumento das taxas de ROS em diabéticos pode ser devido a sua produção aumentada e/ou eliminação reduzida por antioxidantes como catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD). O nível dessas enzimas antioxidantes influencia a suscetibilidade de vários tecidos ao estresse oxidativo, particularmente às células beta pancreáticas que têm poucas defesas antioxidantes intrínsecas, e está associado com o desenvolvimento das complicações do diabetes.

Diabéticos tem uma aumentada suscetibilidade à peroxidação lipídica e elevada incidência de aterosclerose.

Radicais livres podem ter um importante papel na causa e complicações do diabetes mellitus. Alterações nos mecanismos de defesa de varredores dos radicais podem levar a uma inefetiva proteção às ROS, resultando em dano oxidativo e injúria tecidual. Implicações do estresse oxidativo na patogênese do diabetes é sugerido, não somente pela geração de radicais livres, mas também devido à glicosilação protéica não enzimática, auto-oxidação de glicose, queda no metabolismo da GSH, alterações das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica. Além do GSH, há outros mecanismos de defesa contra radicais livres, como SOD,

GSH-Px e catalase que contribuem para eliminar superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil.

1.2 FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA INDUZIDA PELO CONTRASTE

Os mecanismos fisiopatológicos propostos da NIC são a hipoxia da medula externa por diminuição do fluxo sanguíneo renal secundário à vasoconstrição da artéria renal, obstrução tubular e toxicidade tubular direta (Detrenis et al., 2005). Também a diminuição da produção do óxido nítrico (NO) e aumento do estresse oxidativo desempenham importantes papéis na patogênese da NIC (Agmon et al., 1994; Myers et al., 2006).

A administração do MC induz resposta bifásica na vasculatura renal. Ocorre vasodilatação precoce e fugaz, seguida por vasoconstrição sustentada, queda do fluxo plasmático renal e da filtração glomerular. O MC pode induzir alterações reológicas em hemáceas, promovendo a sua agregação e potencializando a diminuição do fluxo sanguíneo ao nível de microcirculação. A lesão tubular direta se dá através da evidência de enzimúria e às perturbações na respiração celular, como também à precipitação de proteínas de Tamm-Horsfall (Burdmann, 2003).

A hipótese mais aceita é a de que existe uma redução da resistência vascular periférica no córtex renal que não é acompanhada de uma paralela redução da resistência vascular na medula renal, causando evasão de sangue da medula. Essa hipótese é embasada por experimentos com vasodilatadores (dopamina, manitol, peptídeo natriurético atrial) administrados imediatamente antes da injeção do radiocontraste. O aumento do fluxo sanguíneo renal após a injeção dos vasodilatadores foi incrementado após a injeção do contraste (Kurnik et al., 1990; Weisberg et al., 1993). O resultado, porém, foi de aumento da incidência de NIC

naqueles pacientes que tiveram uma resposta hiperêmica, e um aumento da fração de filtração naqueles que apresentavam fluxo renal sanguíneo menor, afirmando a hipótese de uma distribuição anômala do fluxo sanguíneo causada por constrição da artéria eferente (Weisberg et al., 1994).

Neste contexto, células mesangiais de ratos Wistar cultivadas na presença de radiocontraste liberam mais epinefrina e angiotensina II e menos vasopressina, num mecanismo que parece ser mediado por canais de cálcio. Em humanos, bloqueadores de canais de cálcio já mostraram ter efeito protetor renal dos danos causados pelo agente de contraste (Russo et al., 1990). O desequilíbrio de substâncias vasodilatadoras também tem sido apontado como uma das causas para a disfunção renal induzida pelo meio de contraste. A inibição da produção de prostaglandinas vasodilatadoras e a inibição da síntese de óxido nítrico pelo inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) aumentam a nefrotoxicidade do contraste, segundo estudos de Agmon et al.(1994). A liberação de substâncias vasodilatadoras diminui com o dano endotelial, assim como em pacientes portadores de disfunção endotelial decorrente de diabetes, hipertensão ou doença arterioesclerótica vascular, que apresentam maior risco de desenvolver a nefropatia induzida por contraste.

Segundo estudos feitos por Humes et al. (1987) existem fortes evidências de que o radiocontraste apresenta uma citotoxicidade celular direta nos túbulos renais. Foi demonstrado *in vitro* que células de túbulo proximal cultivadas na presença de contraste apresentavam distúrbios de metabolismo, com a liberação de enzimas intracelulares e mudanças histológicas compatíveis com toxicidade. A enzima lisossomal N-acetil-b-D-glucosaminidase (NAG) e a aminopeptidase alanina (AAP), que são enzimas intracelulares do túbulo proximal (Severini & Aliberti ,1987; Deray et al., 1990) e proteínas de baixo peso molecular como α -1-microglobulina e β -2-

microglobulina (Carraro et al., 1996) que são normalmente filtradas e reabsorvidas no túbulo proximal, foram detectadas na urina de pacientes após a exposição ao radiocontraste. Os agentes de contraste também promovem um aumento da excreção de urato conforme estudos de Mudge (1971) e Postlewhaite & Kelley, (1971), que em pacientes desidratados pode aumentar a precipitação dessa substância e causar obstrução tubular. Esse seria também um mecanismo fisiopatológico da NIC.

1.3 PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA INDUZIDA PELO CONTRASTE

Experimentos de Katholi et al. (1998) indicam que as espécies reativas de oxigênio estão intimamente relacionadas com nefropatia induzida por agentes de contraste e são conhecidas por causarem dano glomerular em vários modelos de isquemia renal e inflamação (Diamond et al., 1986; Shah, 1989). Agentes nefrotóxicos aumentam a geração de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxil nas mitocôndrias do córtex renal (Shah, 1989; Yang et al., 1995). Pela sua propriedade oxidante o ânion superóxido é capaz de liberar íons trivalentes de ferro do estoque da proteína ferritina, que normalmente equilibra a quantidade de ferro celular, convertendo-o em sua forma inerte (íons divalentes). Se o agente nefrotóxico aumenta a produção de ânion superóxido, conseqüentemente há o aumento do ferro liberado do estoque celular, que irá aumentar as reações de oxidação catalisada por metais (responsáveis pela geração de mais espécies reativas de oxigênio) e iniciar a peroxidação lipídica.

Segundo Meister (1983) e Meister et al. (1986) a glutathione é um tripeptídeo presente em altas concentrações em todas as células mamíferas e, dentre as suas

diversas funções, protege as células do estresse oxidativo. Agentes nefrotóxicos podem causar depleção da GSH, situação que dura até 16 horas após administração do agente (Abul-Ezz et al., 1991). A depleção experimental de glutathiona por L-butationa-(S,R)-sulfoximina (BSO) aumenta o dano tecidual causado por estresse oxidativo (Andreoli et al., 1986; Olson, 1988) assim como a administração de GSH juntamente com o agente nefrotóxico, atenua os efeitos renais deletérios do último.

Não há ainda um método aceito universalmente para prevenção de NIC, exceto expansão do volume extracelular. Existem outros estudos que usam modelos com bicarbonato de sódio (Merten et al., 2004; Ozcan et al., 2007)); bloqueadores do canal de cálcio (Russo et al., 1990); ácido ascórbico (Spargias et al., 2004); teofilina (Dussol et al., 2006); dopamina (Abizaid et al., 1999; Diez et al., 1999); furosemida (Stevens et al., 1999; Dussol et al., 2006; Solomon et al., 2006); N-acetilcisteína (Tepel et al., 2000; Sinha et al., 2004; Webb et al., 2004; Marenzi et al., 2006; Sandhu et al., 2006; Komisarof et al., 2007; Ozcan et al., 2007; Kelly et al., 2008; Kimmel et al., 2008); manitol (Salomon et al., 2006); sinvastatina (Jo et al., 2005); antagonistas do receptor da endotelina; inibidor da enzima de conversão da angiotensina; nebivolol (Toprak, 2008); fenodolpan (Birguori et al., 2005); peptídeo natriurético atrial e prostaglandina E1, mas que não trazem benefícios evidentes e significantes de maneira unânime. Recomenda-se também que o meio de contraste usado não seja hiperosmolar e que a dose seja a menor possível (menor que 125ml) (Fishman & Reddan, 2008).

A NAC exerce ação antioxidante direta, sendo dotada de um grupo tiol livre (-SH) nucleofílico em condições de interagir diretamente com os grupos eletrofílicos dos radicais oxidantes. De particular interesse é a recente demonstração de que a

NAC protege a alfa-1-antitripsina, enzima inibidora da elastase, de ser inativada pelo ácido hipocloroso (HClO), potente agente oxidante que é produzido pela enzima mieloperoxidase dos fagócitos ativados. Além disso, a estrutura da sua molécula faz com que atravesse facilmente as membranas celulares. No interior da célula, a NAC é desacetilada, ficando assim disponível a L-cisteína, aminoácido indispensável para a síntese da GSH. A GSH é um tripeptídeo extremamente reativo que se encontra difundido igualmente nos diversos tecidos dos organismos animais e é essencial para a manutenção da capacidade funcional e da integridade da morfologia celular, pois é o mecanismo mais importante de defesa intracelular contra os radicais oxidantes (tanto exógenos como endógenos) e contra numerosas substâncias citotóxicas (Meister, 1983; Meister et al., 1986; Gonzales et al., 2007). Agentes nefrotóxicos podem causar depleção da GSH, situação que dura até 16 horas após administração do agente (Andreoli et al., 1986; Abul-Ezz et al., 1991).

Portanto, a NAC tem a característica de: “scavenger” de ROS como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e radical hidroxil; reduzir o ferro à sua forma catalítica ativa favorecendo a reação de Fenton e possuir a capacidade de inibir mediadores inflamatórios.

A deferoxamina (DFX) por sua vez se caracteriza por ser um quelante de ferro e inibir a produção do radical hidroxil. DFX forma complexos predominantemente com os íons trivalentes de ferro e alumínio. Devido às suas propriedades quelantes, a DFX é capaz de deslocar o ferro na forma livre, encontrado tanto no plasma como nas células, dando origem ao complexo ferrioxamina (FO). A quelação ocorre em base molar de 1:1, de modo que 1 g de DFX pode, teoricamente, ligar-se a 85 mg de Fe^{3+} ou 41 mg de Al^{3+} . Em decorrência de suas propriedades quelantes, a DFX é capaz de deslocar ferro, tanto em forma livre quanto ligado à ferritina e à

hemossiderina, formando portanto, o complexo FO. A DFX, entretanto, não remove o ferro da transferrina, da hemoglobina ou de outras substâncias hemínicas. Estudos de Ritter et al. (2004, 2006) comprovam que a associação do uso de NAC e DFX diminuem o estresse oxidativo em quadros de sepse, em lesão hepática aguda induzida por tetracloreto de carbono e em injúria pulmonar aguda por lipopolissacáride.

O aloxano (AL, 2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) é uma das drogas mais usadas para induzir modelo experimental de diabetes tipo 1. Ela destrói seletivamente as células beta no pâncreas e provoca diabetes por geração intracelular de ROS formado em uma reação cíclica envolvendo aloxano, que é reduzido a um produto chamado ácido dialúrico com subsequente inibição da síntese e da secreção de insulina.

Baseados nas características da DFX e da NAC, nós hipotetizamos que o uso associado das mesmas pode proteger os rins contra a NIC através de seus efeitos antioxidantes e ação vasodilatadora mediada pelo NO. Nós desenhamos este estudo experimental para investigar se a DFX e a NAC têm um efeito protetor contra o desenvolvimento da NIC em ratos diabéticos e não diabéticos.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do tratamento com N-acetilcisteína e deferoxamina em modelo animal de nefropatia induzida pelo contraste em animais diabéticos e não diabéticos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a proteção exercida pelos antioxidantes na função renal de animais diabéticos e não-diabéticos expostos a meio de contraste.
2. Avaliar a proteção exercida pelos antioxidantes em parâmetros de estresse oxidativo renal em animais diabéticos e não-diabéticos expostos a meio de contraste.
3. Avaliar a proteção exercida pelos antioxidantes em parâmetros inflamatórios renais em animais diabéticos e não-diabéticos expostos a meio de contraste.

Differential effects of N-acetylcysteine and deferoxamine in diabetic and non-diabetic rats submitted to contrast-induced nephropathy

Artigo submetido ao periódico American Journal of Kidney Diseases

Differential effects of N-acetylcysteine and deferoxamine in diabetic and non-diabetic rats submitted to contrast-induced nephropathy

Romulo C. Pizzolatti¹, Fabricia Petronilho^{2,3}, Larissa Constantino², Francieli Vuolo², Fabíola Cardoso², Francine Felisberto², Felipe Dal-Pizzo^{2,3}, Cristiane Ritter^{1}*

From the ¹Laboratório de Intensivismo Experimental, Hospital São José, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil; ²Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil; ³Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Address correspondence to Cristiane Ritter, MD, PhD, ¹Laboratório de Intensivismo Experimental, Hospital São José, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. Email:piz@unesc.net

Background: Individuals with diabetes mellitus are at increased risk for contrast-induced nephropathy (CIN) and thereby constitute an appropriate target population for efforts at prevention of this important complication with substantial associated mortality risk. To date, treatment measures, that include N-acetylcysteine, provide incomplete protection from this alteration. We here, determined the usefulness of the combination of N-acetylcysteine (NAC) and deferoxamine (DFX) in animal model of diabetes and contrast-induced nephropathy.

Study Design: Diabetes was induced male Wistar rats by using a single intraperitoneal injection of alloxan (150 mg/kg). Both the diabetic and nondiabetic rats were exposed to contrast medium (6ml/kg) being divided in the following groups: saline, saline + contrast, saline + contrast + NAC, saline + contrast + DFX, saline + contrast + NAC + DFX, alloxan, alloxan + contrast, alloxan + contrast + NAC, alloxan + contrast + DFX and alloxan + contrast + NAC + DFX. Antioxidant groups received NAC (20 mg/kg, sc, each 6 h for 6 days) and/or DFX (20 mg/kg, sc, each 24h for 6 days). Blood samples were obtained from caudal vein 6 days after contrast administration to the determination of renal function. In addition, it was determined in the kidney markers of oxidative damage, nitrite/nitrate content and myeloperoxidase activity.

Results: In non-diabetic rats, CIN was attenuated using DFX and NAC+DFX, but not when NAC was used alone. In contrast, the increased in creatinine levels in CIN plus diabetes animals was reversed in similar extent with all antioxidants used. Both in diabetic and non-diabetic CIN induced an increase on oxidative and inflammatory parameters, and these alterations were attenuated by all antioxidant treatments used.

Conclusions: Induction of oxidative stress and inflammation plays a relevant role in the pathogenesis of CIN in diabetic and non-diabetic animals, but the addition of DFX seemed to be relevant only in the non-diabetic population subjected to CIN.

INDEX WORDS: Contrast-induced nephropathy; alloxan, diabetes; oxidative stress; renal function.

Contrast-induced nephropathy (CIN) is the most common cause of hospital acquired acute kidney injury being defined as an acute impairment of renal function occurring 24 to 48h and up to five days after the administration of iodinated contrast media.¹ Generally, CIN follows a benign course, and persistent renal impairment and dialysis dependency are rare. However, several studies have demonstrated that CIN has been associated with increase in-hospital morbidity and mortality.¹ Contrast medium exerts multiple effects on renal physiology that can contribute to impaired renal function, including decreases in renal perfusion and oxidative renal damage.^{2,3} Although the precise mechanisms are unknown, several lines of evidence suggest that oxidative stress contributes to the progression of renal injury.^{4,5}

Patients at the greatest risk for CIN can be defined as those that have preexisting impaired renal function and diabetes mellitus.^{6,7,8} Such as in CIN many studies suggested the relationship between oxidative stress and diabetes^{9,10}. Uncontrolled reactive oxygen species (ROS) production often leads to damage in DNA, lipids and proteins and other small antioxidants molecules contributing to the progress of diabetic complications.⁹ Behr and collaborators showed that diabetes can be induced by chemicals as alloxan (5,6-dioxyuracil) that, in susceptible rats, selectively destroy the insulin-producing β -cells in the pancreas inducing diabetes by the intracellular generation of ROS inhibiting insulin synthesis and secretion.¹⁰

The use of therapies to prevent CIN, mainly in increased risk situations such as DM is important, but to date, strategies provide incomplete protection.⁸ N-acetylcysteine (NAC), which exerts both antioxidant and vasodilatory effects, was shown in various animal studies of ischemic renal failure to maintain glomerular filtration rate, and speed-up the recovery from renal failure.¹¹⁻¹⁴ Acetylcysteine forms a sulfhydryl compound to enhance and complete oxidation through normal pathways. The oxidation in turn replenishes glutathione and

sulfhydryl stores and results in a reduction in the formation of oxygen-free radicals, leading to repair of cellular functions.¹⁵ In this context, NAC is widely used as a prophylactic agent in CIN, mainly in high risk population¹⁶, but we had previously demonstrated that the use of NAC in combination to an iron chelator such as deferoxamine (DFX) is superior to its isolate use in several different animal models of disease.¹⁷⁻¹⁹

Thus, since the generation of oxidative damage in diabetics rats and renal injury by contrast administration, the purpose of this study is to extend our understanding of the potential of NAC and DFX in treatment to Wistar rats submitted to alloxan-induced diabetes and CIN.

METHODS

Animals

In vivo studies were performed in accordance with National Institute of Health guidelines and with approval of Universidade do Extremo Sul Catarinense Ethics Committee. Male Wistar rats (age, 2–3 months; weight, 250–320 g) were used in this study.

Drugs

N-Acetylcysteine (Zambon, Brazil), deferoxamine (DFX) (Novartis, Brazil), diatrizoate meglumine/diatrizoate sodium (DZT, Hypaque-75; Squibb, New Brunswick, NJ) and alloxan (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) were dissolved in saline (NaCl 0.9%). The solutions were prepared immediately before use. Thiobarbituric acid (TBA), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and all others chemicals for biochemical assays were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Study groups

Diabetes was induced in fifty male Wistar rats by using a single intraperitoneal injection of alloxan dissolved in saline solution (150 mg/kg), whereas the control group received only saline injection.¹⁰ Both groups were injected after an 24-h fasting period. Rats were maintained on a regular diet and water as *libitum* for fifteen days after injection of alloxan. A total of 50 male diabetic (alloxan induced) and 50 male normal Wistar rats were included in the study. Both the diabetic and nondiabetic rats not received water for 24-h and after this period were divided into ten groups ($n=10$ animals per group) as follows: (1) saline, (2) saline + contrast, (3) saline + contrast + NAC, (4) saline + contrast + DFX, (5) saline + contrast + NAC + DFX, (6) alloxan, (7) alloxan + contrast, (8) alloxan + contrast + NAC, (9) alloxan + contrast + DFX, (10) alloxan + contrast + NAC + DFX.

Contrast media (6ml/Kg) was injected via the tail vein²⁰ of the rats in groups 2-5 and 7-10 and the antioxidant groups 3-5 and 8-10 received treatment with NAC (20 mg/kg, sc, each 6 h for 6 days, starting 6h before contrast administration) and/or DFX (20 mg/kg, sc, each 24h for 6 days, starting 6h before contrast administration). Blood samples were obtained from caudal vein at the 6 day to the determination of renal function. After this period, animals were killed and the kidneys were isolated and rapidly frozen and stored at -80°C until oxidative stress, nitrite-nitrate formation and myeloperoxidase (MPO) activity assessment.

Markers of kidney injury

Creatinine in serum was measured using commercially available kits (Labtest, Brazil).

Myeloperoxidase (MPO) activity

Tissues were homogenized (50 mg/mL) in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and centrifuged at $15,000 \times g$ for 40 mins. The suspension was then sonicated three

times for 30 secs. An aliquot of supernatant was mixed with a solution of 1.6 mM tetramethylbenzidine and 1 mM H₂O₂. Activity was measured spectrophotometrically as the change in absorbance at 650 nm at 37°C and were expressed as MPO activity (mU/mg protein).²¹

Nitrite/nitrate concentration

The total nitrite concentration in the samples was then measured using the Griess reaction, by adding 100 L of Griess reagent [0.1% (w/v) naphthylethylenediamide dihydrochloride in H₂O and 1% (w/v) sulphanilamide in 5% (v/v) concentrated H₃PO₄, vol. [1:1] to the 100 L sample. The optical density at 550 nm (OD₅₅₀) was measured using ELISA microplate reader. Results were expressed as nitrite/nitrate concentration (nmol/mg protein).²²

Lipid peroxidation

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) widely adopted as an index of lipid peroxidation²³ were measured. The formation of TBARS occurs during an acid-heating reaction as previously described²⁴. Briefly, the samples were mixed with 1 mL of 10% trichloroacetic acid and 1 mL of 0.67% TBA, and subsequently heated in a boiling water bath for 15 min. The TBARS were determined by absorbance at 535 nm and were expressed as malondialdehyde equivalents (nmol/mg protein).

Protein carbonyls

Protein oxidation is a marker of oxidative stress, and carbonyl content is a relevant marker of protein oxidation.²⁵ The oxidative damage to proteins was assessed by determining carbonyl groups based on the reaction of carbonyls with DNPH as previously described.²⁶

Briefly, protein liver samples were precipitated by adding 20% trichloroacetic acid and were reacted with DNPH, then the samples were redissolved in 6 M guanidine hydrochloride. Carbonyl contents were determined by absorbance at 370 nm using a molar absorption coefficient. Results were expressed as protein carbonyls/mg protein.

Protein quantification

Protein content was measured as previously described.²⁷ Lipid peroxidation, protein carbonyls, MPO activity and nitrite/nitrate concentration results were standardized by protein content.

Data analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical differences were evaluated using a one-way ANOVA test followed by Tukey's post hoc test. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Renal function

In nondiabetic rats, contrast medium induces alterations in renal function compared with saline group (visualized in Figure 1A as an increase in creatinine levels). These alterations were attenuated using DFX and NAC+DFX, but not when NAC was used alone (Figure 1A). Despite not significant, there was a trend to NAC+DFX be more effective than DFX in the decrease of creatinine levels after CIN (Figure 1). In contrast, the increased in

creatinine levels in CIN plus diabetes animals was reversed in similar extent with all antioxidants used (Figure 1B).

Inflammatory parameters

An increase in MPO activity in the kidney of animals exposed to contrast was observed (Figure 2A), and only NAC or DFX in isolated administration were able to decrease neutrophil infiltration in kidney tissue. In diabetic groups submitted to CIN this inflammatory parameter was decreased by all antioxidant regimens used (Figure 2B). Nitrite/nitrate accumulation in contrast alone (Figure 3A) and diabetic rats plus CIN (Figure 3B) was decreased with all antioxidant treatments.

Oxidative damage parameters

The pattern observed to inflammatory parameters was similar to that observed in the oxidative damage parameters. Increased TBARS levels were observed in contrast comparing with saline group (Figure 4A) and alloxan with contrast *versus* saline and alloxan alone (Figure 4B) and antioxidants treatments reverted the lipid oxidation. Additionally, in protein carbonyl content, we examine whether NAC, DFX and NAC + DFX can inhibit protein oxidation by contrast medium alone (Figure 5A) and contrast-induced damage in diabetic Wistar rats (Figure 5B).

DISCUSSION

Numerous risk factors for CIN have been described, the most prominent among them is pre-existing kidney disease such as diabetic. The pathogenesis of CIN appears to be caused,

at least in part, by renal vasoconstriction and renal ischemia leading to the generation of reactive oxygen species (ROS)². Diabetes is associated with increased sensitivity to renal vasoconstrictors including contrast media agents and is also associated with dysfunctional renal handling of ROS, making diabetics particularly susceptible to CIN.² At present, there are limited strategies for the prevention of CIN among them the administration of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and intravenous hydration¹⁶ and studies showed that transition metal chelator could have a therapeutic role in the chronic neuropathic and micro/macrovacular changes in diabetic patients.²⁸ In the present study, we demonstrated, in general, that CIN, both in the diabetic and non-diabetic rat is associated with increased oxidative stress and inflammation, and that antioxidant treatment was effective in abolish these alterations improving creatinine levels. For the first time, we demonstrated that iron chelators are important in CIN prevention in non-diabetic animals, suggesting an important role of iron on the development of CIN.

Some few differences exists comparing diabetic and non-diabetic animals, mainly the lack of efficacy of NAC alone in the prevention of CIN in non-diabetic animals, suggesting a major role for iron in this condition²⁹. It was hypothesize that the accumulation of hydrogen peroxide in the presence of iron during the inflammatory process may lead to the formation of the hydroxyl radical. Furthermore, the use of NAC alone may have limitations and present prooxidant effects, due to the facility with which it interacts with iron.³⁰ The exact mechanism associated with this effect is not covered by our study, since all oxidative and inflammatory parameters determined were similarly improved by all antioxidants. We had previously demonstrated some similar effects using a model of gentamicin-induced kidney injury, the addition of DFX is important in the prevention of this kind of injury, whereas its use is not necessary when antioxidants were administered after gentamicin-induced kidney injury.³¹

In contrast, in alloxan-induced diabetes submitted to CIN, all treatments were effective in improve renal function. The alloxan mechanism of action is in part characterized by the involvement of ROS and consequently oxidative stress.³² One of the ROS targets is the DNA of the pancreatic islets, and its fragmentation takes place in β -cells exposed to alloxan.³³ The toxic effects of alloxan in this system are confined to β -cells; other endocrine cells and the exocrine parenchymal cells are not damaged, even in the presence of high concentrations of the test substance.³⁴ In association to this effect, the vasoconstrictive effects of contrast medium result in renal ischemia which augments the generation of ROS. Moreover, increased generation of ROS already occurs in diabetes⁴¹ and chronic kidney disease,^{35,36} hence ROS generation in CIN and diabetes is exacerbated. Superoxide anion generation has been shown to inactivate NO-dependent vasodilation likely by scavenging NO and generating the very potent ROS peroxynitrite³⁷ and cause renal hypoxia and increasing adenosine generation by ATP hydrolysis.³⁸ Consequently, a diminished renal vasodilatory capacity, such as persists in the diabetic renal vasculature, increase the risk of CIN. NAC exerts vasodilatory effects beyond antioxidant and, was shown in various animal studies of ischemic renal failure to maintain glomerular filtration rate, and speed-up the recovery from renal failure³⁹⁻⁴¹ thus, we suggested that in the diabetic rat the use of an iron chelator is irrelevant to the effect of NAC on preventing CIN.

In summary, induction of oxidative stress and inflammation plays a relevant role in the pathogenesis of CIN in diabetic and non-diabetic animals, and the improvement of these parameters is related to improve renal function. The development of more effective CIN prevention therapy is warranted, thus we here demonstrated that the addition of DFX could be of value in low risk individuals in whom NAC is still not widely accepted as protective agent in clinical practice.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

1. Weisberg LS, Kurnik BR: Risk of radiocontrast nephropathy in patients with and without diabetes mellitus. *Kidney Int* 45: 259–265, 1994.
2. Pflueger A, Abramowitz D, Calvin AD. Role of oxidative stress in contrast-induced acute kidney injury in diabetes mellitus. *Med Sci Monit* 15: 125-136, 2009.
3. Persson PB, Liss P: Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kid Int* 68: 14–22, 2005.
4. Baliga R, Ueda N, Walker PD, et al: Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 29:465-477, 1997
5. Bakris GL, Lass N, Gaber AO, et al: Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol* 258:115-120, 1990
6. Chen SL, Zhang J, Yei F, et al: Clinical outcomes of contrast-induced nephropathy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: A prospective, multicenter, randomized study to analyze the effect of hydration and acetylcysteine. *Int J Card* 126: 407–413, 2008
7. Coyle LC, Rodriguez A, Jeschke RE, et al: Acetylcysteine In Diabetes (AID): A randomized study of acetylcysteine for the prevention of contrast nephropathy in diabetics. *Am Heart J* 151:1032, 2006

8. Thompson EJ, King SL: Acetylcysteine and fenoldopam: promising new approaches for preventing effects of contrast nephrotoxicity. *Crit Care Nurse* 23: 39-46, 2003
9. Halliwell B: Antioxidant defense mechanisms. *Free Radic Res* 31: 261–272, 1999
10. Behr GA, da Silva EG, Ferreira AR, et al: Pancreas β -cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species. *Fund Clin Pharm* 22: 657–666, 2008
11. Conesa E, Valero F, Nadal J, et al: N-acetyl-l-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol* 281:730–737, 2001
12. DiMari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, et al: N-acetylcysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol* 272:292–298, 1997
13. Mazzon E, Britti D, DeSarro A, et al: Effect of Nacetylcysteine on gentamicin-induced nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 424:75– 83, 2001
14. Salom M, Ramirez P, Carbonell L, et al. Protective effect of N-acetyl-cysteine on the renal failure induced by inferior vena cava occlusion. *Transplantation* 65:1315–1321, 1998
15. Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, et al: Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 343:180-184, 2000
16. Kelly AM, Dwamena B, Cronin P, Bernstein SJ, Carlos RC: Meta-analysis: effectiveness of drugs for preventing contrast-induced nephropathy. *Ann Intern Med.* 148: 284-294, 2008.
17. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, et al: Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit. Care Med* 32: 342–349, 2004

18. Zapelini PH, Rezin GT, Cardoso MR, Ritter C, Klamt F, Moreira JC, Streck EL, Dal-Pizzol F: Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion*. 8: 211-218, 2008.
19. Ritter C, da Cunha AA, Echer IC, Andrades M, Reinke A, Lucchiari N, Rocha J, Streck EL, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F: Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med*. 34: 471-477, 2006.
20. Anarat A, Duman N, Noyan A, Kibar M, Anarat R. The role of endothelin in radiocontrast nephropathy. *Int Urol Nephrol*. 29: 609-613, 1997.
21. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, et al: Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Ag Actions* 26:335-341, 1989
22. Green IC, Wagner DA, Glowski J, et al: Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-38, 1982
23. Janero DR: Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9:515–540, 1990
24. Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431, 1990
25. Stadtman ER, Levine RL: Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:191–208, 2000
26. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464–478, 1990
27. Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275, 1951

28. Cameron NE, Cotter MA: Neurovascular dysfunction in diabetic rats potential contribution of autoxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. *J Clin Invest* 96: 1159-1163, 1995
29. Ho J, Lucy M, Krokhin O, Hayglass K, Pascoe E, Darroch G, Rush D, Nickerson P, Rigatto C, Reslerova M: Mass spectrometry-based proteomic analysis of urine in acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a nested case-control study. *Am J Kidney Dis.* 53:584-595, 2009.
30. Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS: Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1283-1293, 1988.
31. Petronilho F, Constantino L, de Souza B, Reinke A, Martins MR, Fraga CM, Ritter C, Dal-Pizzol F: Efficacy of the combination of N-acetylcysteine and deferoxamine in the prevention and treatment of gentamicin-induced acute renal failure in male Wistar rats. *Nephrol Dial Transplant.* 24:2077-2082, 2009.
32. Heikkila RE, Winston B, Cohen G, et al: Alloxan induced diabetes, evidence for hydroxyl radicals as a cytotoxic intermediate. *Biochem Pharmacol* 25:1085–1092, 1976
33. Sakurai K, Ogiso T: Effect of ferritin on IDNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPH-cytochrome P450 reductase: ferritin's role in diabetogenic action of alloxan. *Biol Pharm Bull* 18:262–266, 1995
34. Jorns A, Tiedge M, et al: Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro *Free Radic Biol Med* 26:1300–1304, 1999
35. Scott J, King G: Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1031: 204–213, 2004

36. Locatelli F, et al: Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18:1272–1280, 2003
37. Hogg N, Griffith O, Goligorsky MS, et al: The biological chemistry of NO. *Nitric Oxide and The Kidney* 3–21, 1997.
38. Heyman SN, Kaiser N, Spokes K, et al: Radiocontrast agents induce endothelin release in vivo and in vitro. *J Am Soc Nephrol* 3:58–65, 1992
39. Conesa E, Valero F, Nadal J, et AL: N-acetyl-l-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol* 281:730– 737, 2001
40. DiMari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, et al: Nacetylcysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol* 272: 292–298, 1997
41. Mazzon E, Britti D, DeSarro A, Effect of Nacetylcysteine on gentamicin-induced nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 424:75– 83, 2001

Figures legends

Figure 1 Creatinine levels in contrast-induced nephropathy with or without antioxidant treatment in (A) non-diabetic and (B) diabetic animals. Data are expressed as means $\pm$ SD. * different from saline ** different from saline + contrast, ***different from alloxan + saline and #different from alloxan + contrast, $p < 0.05$. NAC = *N*-acetylcysteine; DFX = deferoxamine.

Figure 2 Myeloperoxidase activity in contrast-induced nephropathy with or without antioxidant treatment in (A) non-diabetic and (B) diabetic animals. Data are expressed as means $\pm$ SD. * different from saline ** different from saline + contrast, ***different from alloxan + saline and # different from alloxan + contrast, $p < 0.05$. NAC = *N*-acetylcysteine; DFX = deferoxamine.

Figure 3 Nitrite/Nitrate levels in contrast-induced nephropathy with or without antioxidant treatment in (A) non-diabetic and (B) diabetic animals. Data are expressed as means $\pm$ SD. * different from saline ** different from saline + contrast, ***different from alloxan + saline and #different from alloxan + contrast, $p < 0.05$. NAC = *N*-acetylcysteine; DFX = deferoxamine.

Figure 4 TBARS levels in contrast-induced nephropathy with or without antioxidant treatment in (A) non-diabetic and (B) diabetic animals. Data are expressed as means $\pm$ SD. * different from saline ** different from saline + contrast, ***different from alloxan + saline and #different from alloxan + contrast, $p < 0.05$. NAC = *N*-acetylcysteine; DFX = deferoxamine.

Figure 5 Protein carbonyl levels in contrast-induced nephropathy with or without antioxidant treatment in (A) non-diabetic and (B) diabetic animals. Data are expressed as means $\pm$ SD. * different from saline ** different from saline + contrast, ***different from alloxan + saline and #different from alloxan + contrast, $p < 0.05$. NAC = *N*-acetylcysteine; DFX = deferoxamine.

Figures

Figure 1

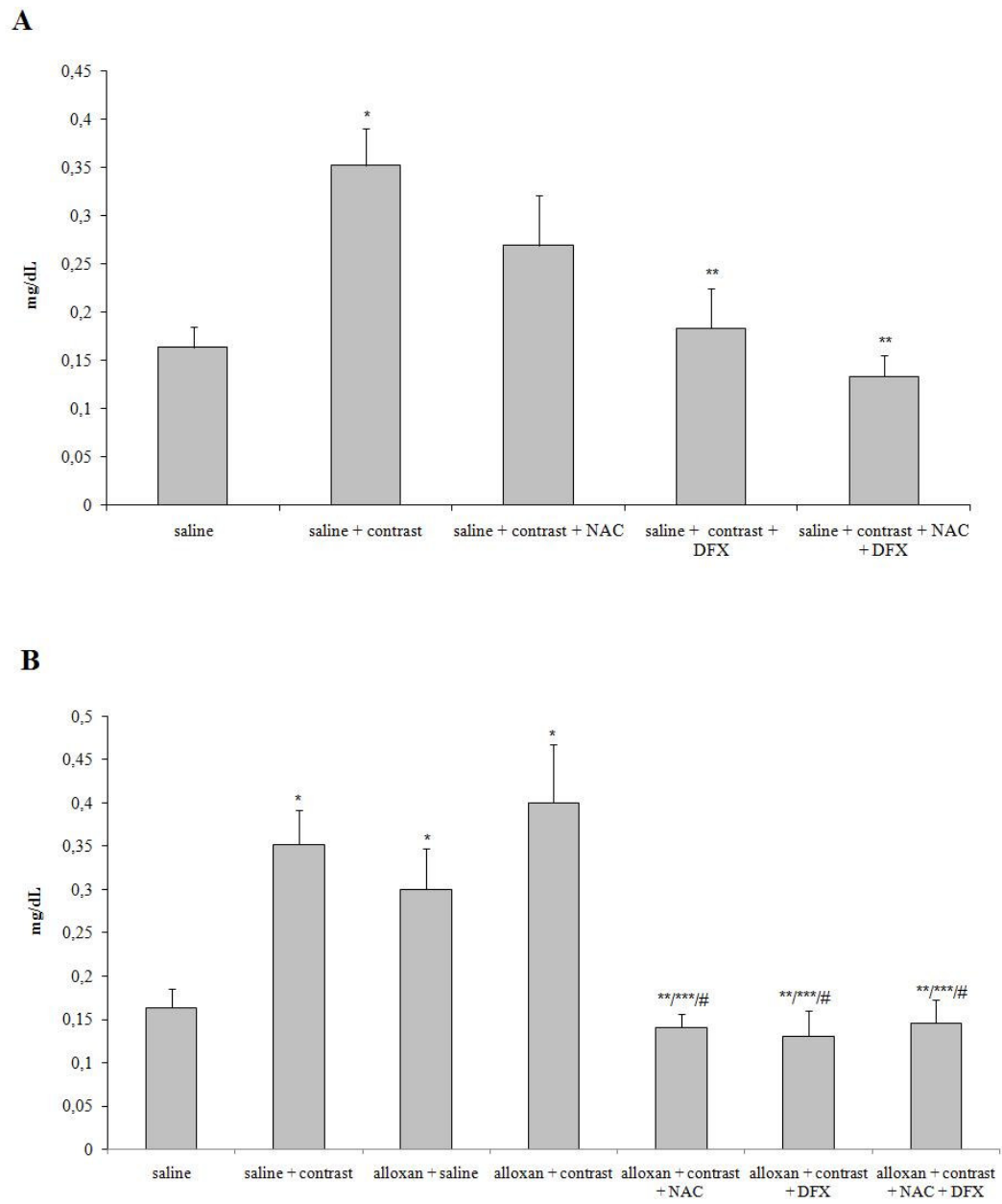


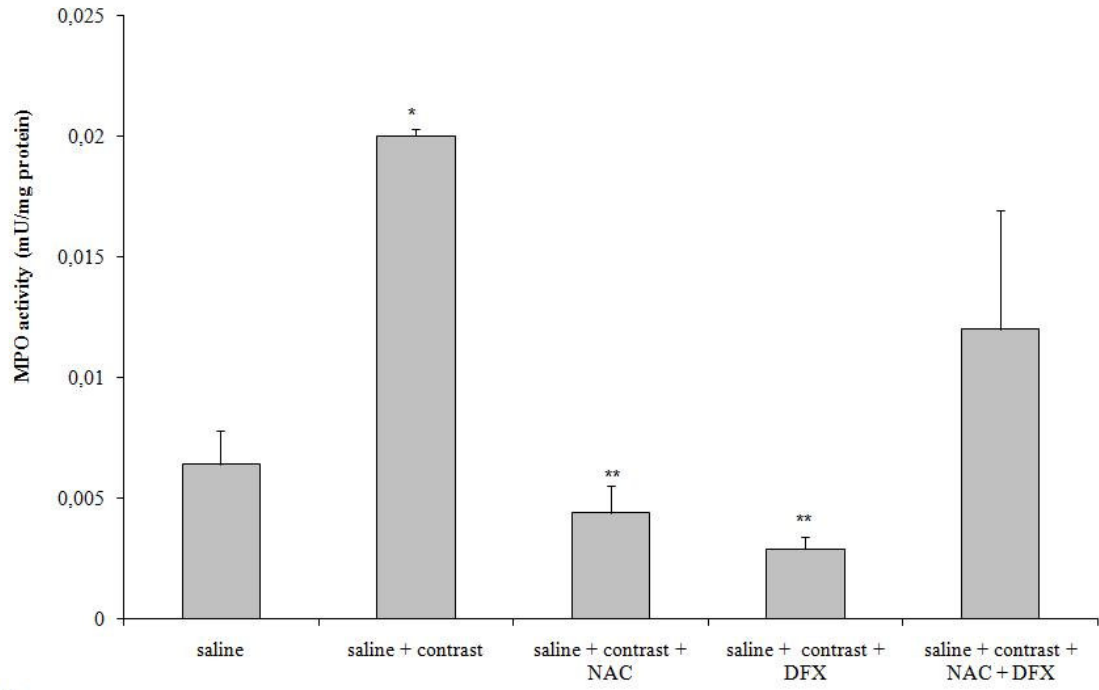
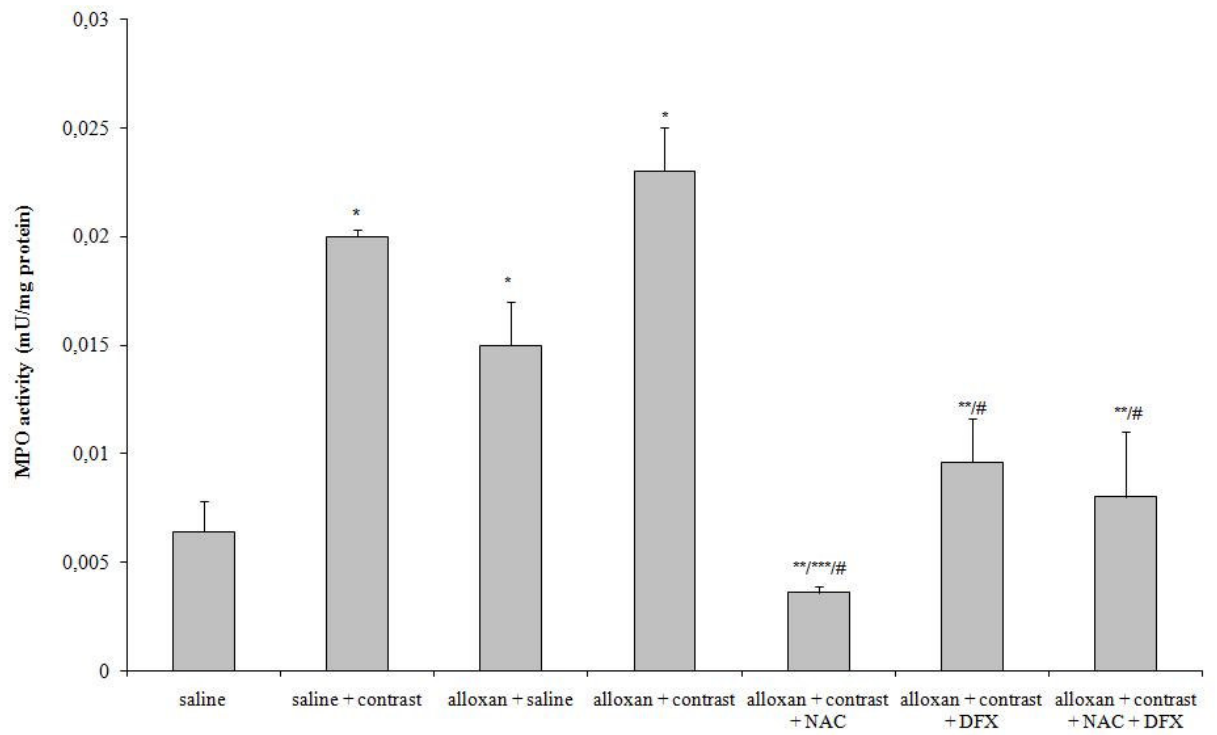
Figure 2**A****B**

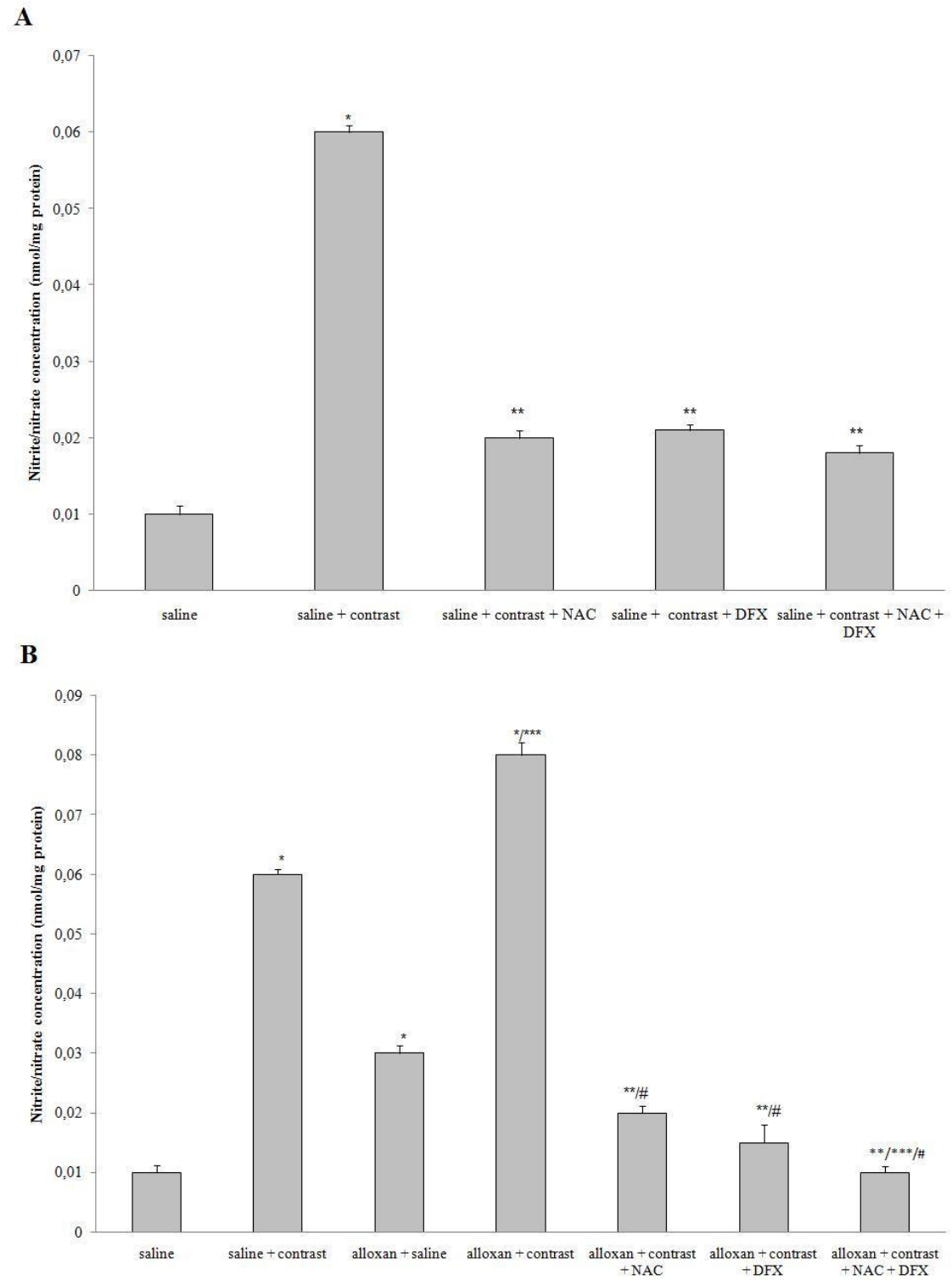
Figure 3

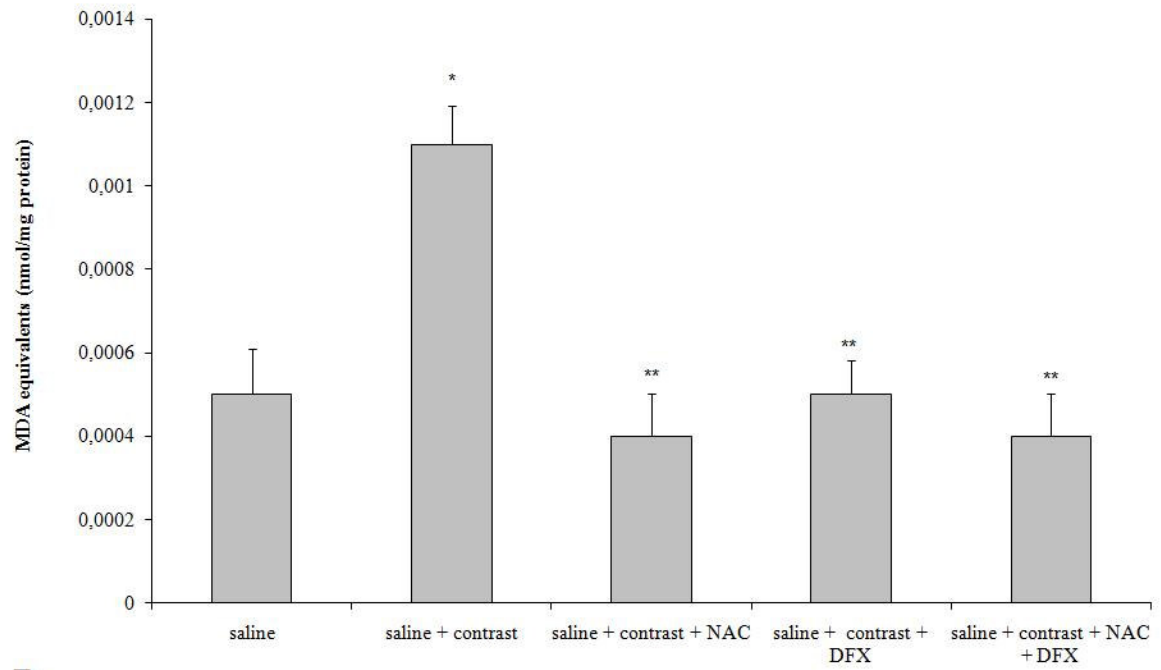
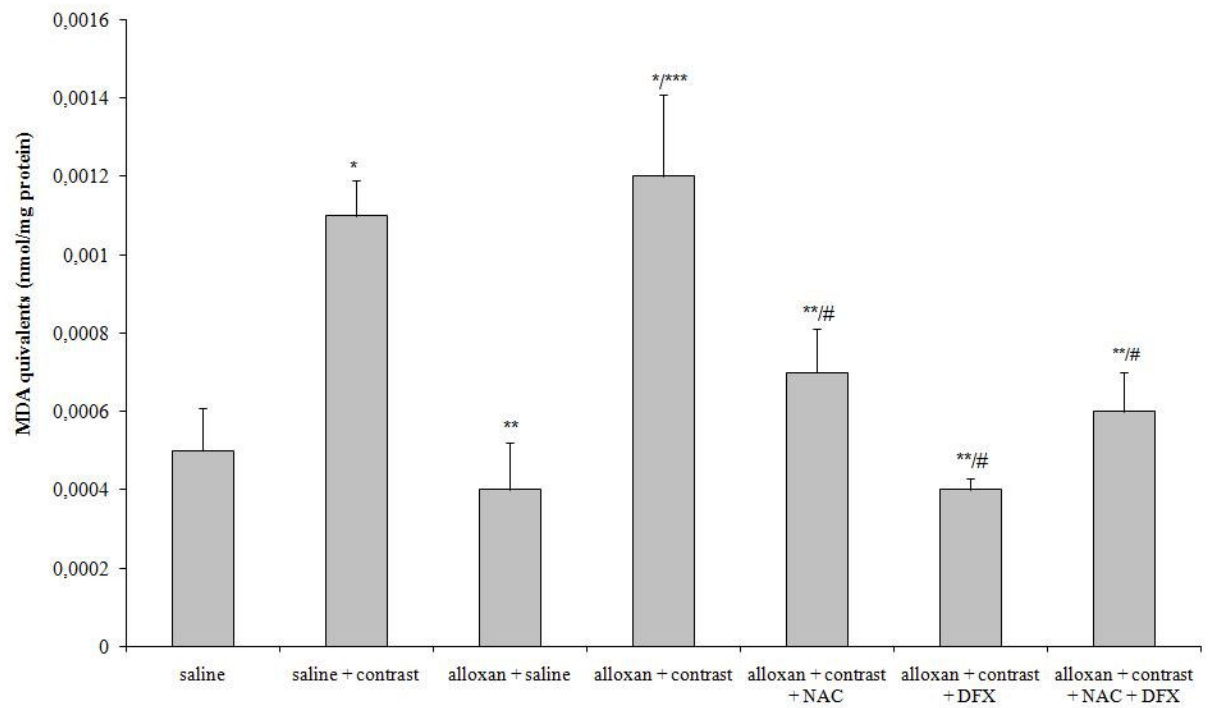
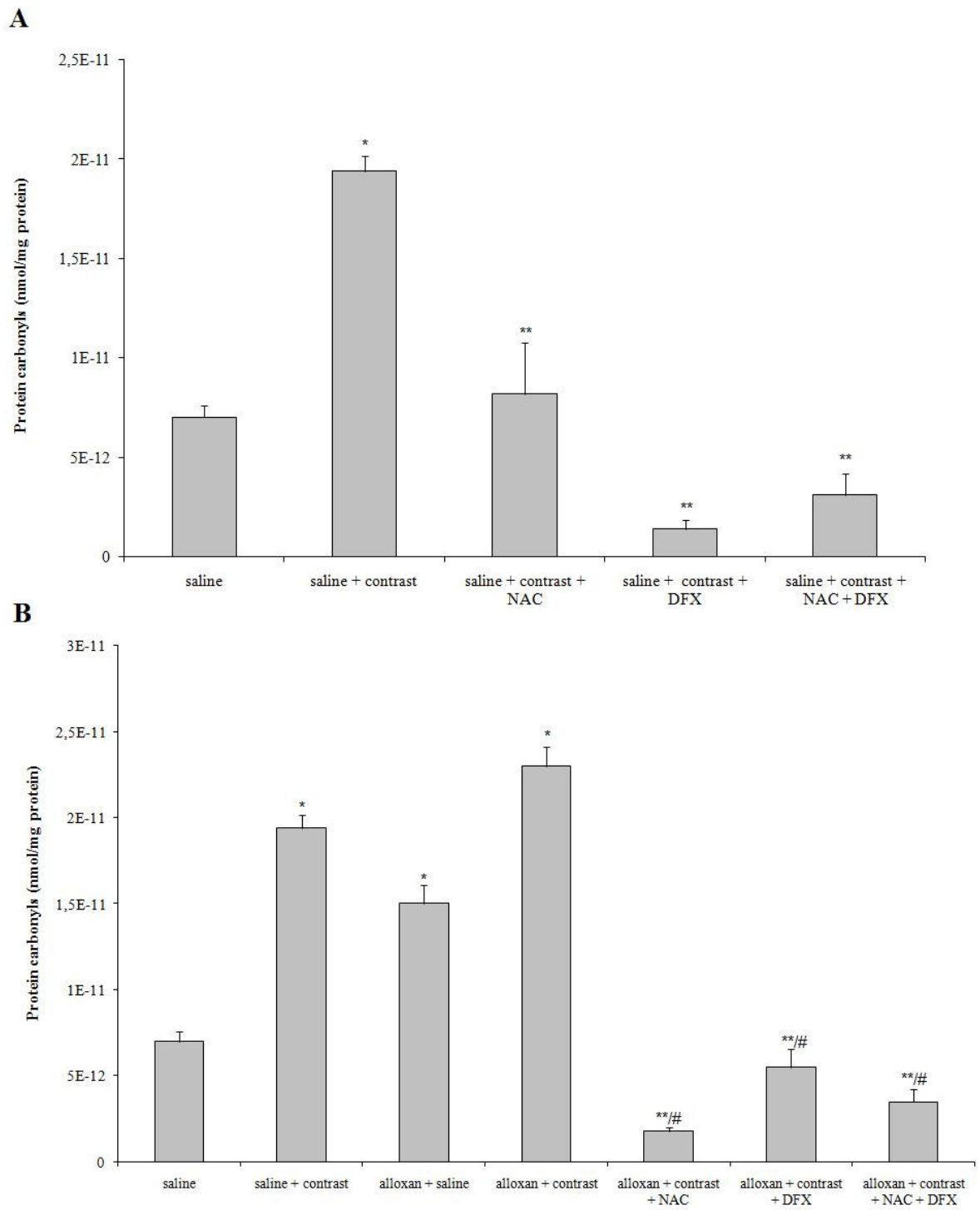
Figure 4**A****B**

Figure 5

3 DISCUSSÃO

Neste trabalho, determinamos que o uso da combinação de NAC e DFX é mais eficiente ao uso isolado de NAC para prevenir nefropatia induzida pelo contraste em animais não-diabéticos. Apesar de não atingir significância estatística, apresenta tendência de ser mais efetivo do que o uso de DFX isolado nesta mesma situação. Apesar disto, em animais diabéticos, o uso de NAC, DFX ou ambos é igualmente eficaz na prevenção da NIC. Tentamos explorar diferentes mecanismos responsáveis por esta efetividade, e determinamos que estes antioxidantes atuam em pelo menos dois diferentes aspectos da fisiopatologia das doenças estudadas: dano oxidativo e atenuação da resposta inflamatória.

Apesar de o uso isolado de NAC ser inferior na proteção renal quando comparado ao uso de DFX ou NAC + DFX em animais não diabéticos, seu potencial efeito protetor contra a formação de TBARS e CPP é similar aos outros regimes. Desta forma, apesar de o estresse oxidativo ser importante no desenvolvimento da NIC, este efeito não parece ser o diferencial entre os regimes estudados. Certamente determinamos produtos finais do estresse oxidativo (dano em lipídeos e proteínas) e não seus iniciadores, portanto podemos não estar observando fenômenos anteriores, como por exemplo a geração de radical hidroxil via reação de Fenton, importantes na gênese da doença, por limitações das técnicas utilizadas no presente estudo. Este último argumento é reforçado pelo fato de que dentre todas as formas de geração de estresse oxidativo, a produção de peróxido de hidrogênio parece ter um papel central na produção e manutenção desta condição. Apesar do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ser considerado um oxidante relativamente estável, assume seus efeitos deletérios através da sua interação com íons ferro e conseqüente geração de hidroxil ($\bullet\text{OH}$) - reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} +$

•OH + OH⁻). Além do ferro, íons cobre também são capazes, *in vitro*, de gerar •OH, mas, provavelmente, devido a maior disponibilidade intracelular, *in vivo*, o ferro parece ser o metal envolvido na síntese de •OH a partir de H₂O₂ (Meneghini, 1997). Por isto a presença de DFX pode atenuar eventos iniciais importantes na geração de estresse oxidativo não detectados por técnicas que determinam eventos finais deste ciclo. Além disto pode haver estresse oxidativo em regiões específicas do néfron que pode ser melhor prevenida com uso de NAC e DFX, mas como trabalhamos com homogenato de rim não podemos testar esta hipótese. Em animais diabéticos, da mesma forma que observados em não diabéticos, todos antioxidantes apresentaram mesmo potencial em diminuir os níveis de TBARS e CPP e apresentaram o mesmo potencial protetor da função renal. Este resultado é contrário ao esperado por nós. Esperávamos que a presença de diabetes, que normalmente gera estresse oxidativo em diferentes órgãos (Friederich et al., 2009), incluindo o rim (Pflueger et al., 2009), associado a NIC levaria a grande estresse oxidativo, fazendo com que o uso de NAC e DFX associados pudesse ser mais efetivo que seu uso isolado, enquanto que esperávamos que os antioxidantes fossem igualmente eficazes em animais não-diabéticos.

O segundo mecanismo estudado no presente estudo é a resposta inflamatória. Determinamos esta indiretamente medindo a atividade da MPO (como índice da infiltração de neutrófilos) e a quantidade de NO (produzido em grandes quantidades por células imunes ativadas). Em animais não diabéticos observamos que o uso associado de NAC e DFX não atenuou a atividade de MPO em relação ao uso isolado de NAC e DFX, apesar de ter a tendência de ser mais efetivo na prevenção da perda de função renal. Apesar de a resposta inflamatória poder potencializar o dano renal em diversas situações (Zoja et al., 2009), principalmente

por aumentar o estresse oxidativo (Koyner et al., 2008), existem evidências de que a infiltração de neutrófilos é importante na regeneração do tecido renal lesado (Reinders et al., 2006). Em uma situação onde o estresse oxidativo é efetivamente controlado, há a possibilidade de que a manutenção de um certo grau de resposta inflamatória possa ser benéfica nas fases tardias da recuperação do parênquima renal após o insulto. Da mesma forma que observamos com marcadores de estresse oxidativo, o resultado com marcadores inflamatórios nos surpreendeu. Esperávamos que o uso conjunto de NAC e DFX fosse mais efetivo em animais diabéticos, por esta doença cursar com ativação inflamatória (Brown, 2008), mas todos os esquemas antioxidantes igualmente modularam os marcadores inflamatórios avaliados.

Estresse oxidativo e resposta inflamatória são eventos normalmente associados. O processo de indução de genes inflamatórios é mediado pela ativação de fatores de transcrição como o ativador de proteína 1 (AP-1) e o fator nuclear κ B (NF- κ B) (Roebuck et al., 1999). Destes o NF- κ B parece participar na fisiopatologia da NIC (Xu et al., 2008) e ele pode ser regulado por radicais livres (Liu et al., 2006). Da mesma forma, parece haver envolvimento importante desta via na doença renal associada ao diabetes (Menini et al., 2007). A regulação redox do NF- κ B parece ocorrer através da oxidação/redução de resíduos de cisteínas altamente conservados no sítio de ligação ao DNA do NF- κ B (Gloire et al., 2006). Não sabemos se o esquema antioxidante utilizado em nossos estudos interfere com NF- κ B, mas já existe demonstração que NAC exerce este papel em células do sistema imune (Victor et al., 2003).

Meta-análise recém publicada confirma dados destes estudos clínicos individuais, reforçando o uso de NAC em pacientes submetidos a exames com

necessidade de uso de contraste iodado, principalmente os pacientes de alto risco (Kelly et al., 2008). Em pacientes de baixo risco os resultados dos estudos clínicos ainda são controversos (Kelly et al., 2008), apesar de haver uma tendência a favor de sua efetividade (Kelly et al., 2008). Neste sentido, apesar de não esperado, nossos resultados somam ao já existente na literatura, uma vez que demonstram a efetividade maior de esquemas com DFX quando comparados ao uso isolado de NAC, apesar de o exato mecanismo associado a esta maior efetividade não ser completamente esclarecido em nosso estudo.

Em resumo, nossos achados reforçam o papel do estresse oxidativo e resposta inflamatória na patogênese da NIC e a importância do uso de antioxidantes na sua prevenção. Por nossos achados a presença de íons ferro deve ter papel maior na gênese da NIC em animais não diabéticos o que sugere a importância da adição de DFX em esquemas antioxidantes em estudos da prevenção de NIC em grupos de baixo risco.

REFERÊNCIAS

- AGMON Y; PELEG H; GREENFELD Z; ROSEN S; BREZIS M. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. **The Journal of Clinical Investigation** 94: 1069-1075. 1994.
- BROWN WV. Microvascular complications of diabetes mellitus: renal protection accompanies cardiovascular protection. **American Journal of Cardiology** 102: 10L-13L. 2008.
- BURDMANN EA; JÚNIOR JMV; VIDAL EC. Nefropatia Tóxica e Tubulointersticial. In: **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos** (Riella MC, ed). Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp 460-461. 2003.
- COX CD; TSIKOURIS JP. Preventing contrast nephropathy: what is the best strategy? A review of the literature. **The Journal of Clinical Pharmacology** 44: 327-337. 2004.
- DETRENIS S; MESCHI M; MUSINI S; SAVAZZI G. Lights and shadows on the pathogenesis Of contrast-induced nephropaty: state of the art. **Nephrology Dialysis Transplantation** 20: 1542-1550. 2005.
- De YOUNG IM; KHEIFETS JB; BALLARON SJ; YOUNG JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions** 26: 335-341. 1989.
- DRAPER HH; HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology** 186: 421-431. 1990.
- FRIEDERICH M; HANSELL P; PALM F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. **Current Diabetes Reviews** 5: 120-144. 2009.

- GLOIRE G; LEGRAND-POELS S; PIETTE J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochemical Pharmacology** 72: 1493-1505. 2006.
- GONZALES DA; NORSWORTHY KJ; KERN SJ; BANKS S; SIEVING PC; STAR RA; NATANSON C; DANNER RL. A meta-analysis of N-acetylcysteine in contrast-induced nephrotoxicity: unsupervised clustering to resolve heterogeneity. **BioMed Central Medicine** 5: 32. 2007.
- HU ML; LOUIE S; CROSS CE; MOTCHINIK P; HALLIWELL B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 121: 257-262. 1993.
- KATAYAMA H; YAMAGUCHI K; KOZUKA T; TAKASHIMA T; SEEZ P; MATSUURA K. Adverse reaction to ionic and nonionic contrast media. A report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media. **Radiology** 175: 621-628, 1990.
- KELLY AM; DWAMENA B; CRONIN P; BERNSTEIN SJ; CARLOS RC. Meta-analysis: Effectiveness of drugs for Preventing Contrast-Induced Nephropathy. **Annals of Internal Medicine** 148: 284-294. 2008.
- KOYNER JL; SHER ALI R; MURRAY PT. Antioxidants. Do they have a place in the prevention or therapy of acute kidney injury? **Nephron Experimental Nephrology** 109: 109-117. 2008.
- LEVINE RL; GARLAND D; OLIVER CN; AMICI A; CLIMENT I; LENZ AG; AHN BW; SHALTIEL S; STADMAN ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology** 186: 464–478. 1990.

- LIU SF; MALIK AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. **The American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology** 290: L622-L645. 2006.
- MCCULLOUGH PA; STACUL F; BECKER CR; ADAM A; LAMEIRE N; TUMLIN JA; DAVIDSON CJ; CIN CONSENSUS WORKING PANEL. Contrast- induced nephropathy (CIN) consensus working panel: executive summary. **Reviews in Cardiovascular Medicine** 7: 177-197. 2006.
- MENEGHINI R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine** 23: 783-792. 1997.
- MENINI S; IACOBINI C; RICCI C; ODDI G; PESCE C; PUGLIESE F; BLOCK K; ABOUD HE; GIORGIO M; MIGLIACCIO E; PELICCI PG; PUGLIESE G. Ablation of the gene encoding p66Shc protects mice against AGE-induced glomerulopathy by preventing oxidant-dependent tissue injury and further AGE accumulation. **Diabetologia** 50: 1997-2007. 2007.
- MOUSSA SA. Oxidative stress in diabetes mellitus. **Romanian Journal of. Biophysics** 18:225-236. 2008.
- MUNDAY R. Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of "active oxygen" species. **Biochemical Pharmacology** 37: 409-413. 1988.
- MYERS SI; WANG L; LIU F; BARTULA LL. Iodinated contrast induced renal vasoconstriction is due in part to the downregulation of renal cortical and medullary nitric oxide synthesis. **Journal of Vascular Surgery** 44: 383-391. 2006.
- OHKAWA H; OHISHI N; YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** 95: 351-358. 1979.

- PANNU N; WIEBW N; TONELLI M. Alberta kidney disease network, prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy. **The Journal of the American Medical Association** 295: 2765-2779. 2006.
- PFLUEGER A; ABRAMOWITZ D; CALVIN AD. Role of oxidative stress in contrast-induced acute kidney injury in diabetes mellitus. **Medical Science Monitor** 15: RA125-136. 2009.
- REINDERS E; RABELINK TJ; BRISCOE DM. Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. **Journal of the American Society of Nephrology** 17: 932-942. 2006.
- RITTER C; ANDRADES ME; REINKE A; MENNA-BARRETO S; MOREIRA JCF; DAL-PIZZOL F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Critical Care Medicine** 32: 342-349. 2004.
- RITTER C; REINKE A; ANDRADES ME; MARTINS RM; ROCHA J; MENNA-BARRETO S; QUEVEDO J; MOREIRA JCF; DAL-PIZZOL F. Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic in rats. **Critical Care Medicine** 32: 2079-2083. 2004.
- RITTER C; CUNHA AA; ECHER IC; ANDRADES M; REINKE A; LUCCHIARI N; ROCHA J; STRECK EL; MENNA-BARRETO S; MOREIRA JCF; DAL-PIZZOL F. Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. **Critical Care Medicine** 34: 471-477. 2006.
- ROEBUCK KA; CARPENTER LR; LAKSHMINARAYANAN V; PAGE SM; MOY JN; THOMAS LL. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. **Journal of Leukocyte Biology** 65: 291-298. 1999.

- RUSSO D; TESTA A; DELLA VOLPE L; SANSONE G. Randomized prospective study on renal effects of two different contrast media in humans: protective role of calcium channel blocker. **Nephron** 55: 254-257. 1990.
- SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research** 50: 536–546. 2001.
- SPARGIAS K; ALEXOPOULOS E; KYRZOPOULOS S; IOKOVIS P; GREENWOOD
Ascorbic acid prevents contrast-mediated nephropathy in patients with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention. **Circulation** 110: 2837-2842. 2004.
- SULE SS; FRISHMAN W. Nebivolol: new therapy update. **Cardiology in Review** 14: 259-264. 2006.
- SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research** 50: 536–546. 2001.
- TEPEL M; ASPELIN P; LAMEIRE N. Contrast-induced nephropathy: a clinical and evidence-based approach. **Circulation** 113: 1799-1806. 2006.
- TOPRAK O; CIRIT M. Risk factors for contrast-induced nephropathy. **Kidney & Blood Press Research** 29: 84-93. 2006.
- TOPRAK O; CIRIT M; TANRISEV M; YAZICI C; CANOZ O; SIPAHIOGLU M; UZUM A; ERSOY R; SOZMEN EY. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. **Nephrology Dialysis Transplantation** 23: 853-859. 2008.
- TOPRAK O; CIRIT M; YESIL M; BAYATA S; TANRISEV M; VAROL U; ERSOY R; ESI E. Impact of diabetic and pre-diabetic state on development of contrast-induced nephropathy in patients with cronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation** 22: 819-826. 2007.

- VICTOR VM; ROCHA M; DE LA FUENTE M. N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. **Free Radical Research** 37: 919-929. 2003.
- VEVERKA A; NUZUM DS; JOLLY JL. Nebivolol: a third-generation beta-adrenergic blocker. **The Annals of Pharmacotherapy** 40: 1353-1360. 2006.
- XU X; WU T; DING X; ZHU J; ZOU J; HE J. The role of nuclear factor-kappaB in rats of radiocontrast-media-induced nephropathy. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology** 22: 416-421. 2008.
- YAMASOWA H; SHIMIZU S; INOUE T; TAKAOKA M; MATSUMARA Y. Endothelial NO contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 312: 153-159. 2005.
- YENICERIOGLU Y; YILMAZ O; SARIOGLU S; ORMEN M; AKAN P; CELIK A; CANSARI T. Effects of N-acetylcysteine on radio contrast nephropathy in rats. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology** 40: 63-69. 2006.
- ZOJA C; GARCIA PB; REMUZZI G. The role of chemokines in progressive renal disease. **Frontiers in Bioscience** 14: 1815-1822. 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)