

**UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE NEFROPROTETORA DA RESINA DE *Virola oleifera***  
**(Schott) A. C. Smith NA NEFROPATIA INDUZIDA POR**  
**CONTRASTE**

**IGOR SANTOS FONTE BÔA**

**VILA VELHA**  
**JUNHO/2015**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE NEFROPROTETORA DA RESINA DE *Virola oleifera***  
**(Schott) A. C. Smith NA NEFROPATIA INDUZIDA POR**  
**CONTRASTE**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**IGOR SANTOS FONTE BÔA**

**VILA VELHA**  
**JUNHO/2015**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

B662a Fonte Boa, Igor Santos.

Atividade nefroprotetora da resina de *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith na nefropatia induzida por contraste / Igor Santos Fonte Boa. – 2015.

75 f.: il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Co-orientadora: Denise Coutinho Endringer.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Rins - Doenças. 2. Rins - Tratamento. 3. Histopatologia. I. Fonte Boa, Igor Santos, II. Pereira, Thiago de Melo Costa, III. Endringer, Denise Coutinho. IV. Universidade Vila Velha. VI. Título.

CDD 615

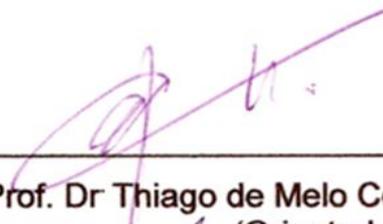
**IGOR SANTOS FONTE BÔA**

**ATIVIDADE NEFROPROTETORA DA RESINA DE *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith NA NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

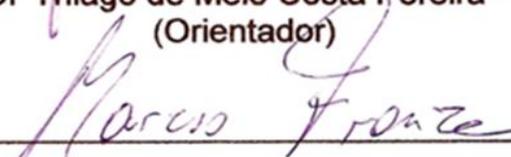
Aprovada em 11 de junho de 2015.

**Banca examinadora:**



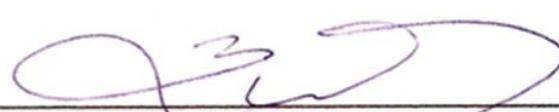
---

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - UVV  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Márcio Fronza - UVV



---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - UFES

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois nada se consegue sem suas bênçãos.

Ao meu orientador, Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, por ter me aceitado como seu orientado mesmo sabendo da minha pesada carga horária na graduação em medicina concomitante a grande jornada de trabalho que o mestrado exigiria de mim, por ter confiado em minha capacidade de conciliar as duas tarefas, além disso, por ter dispensado a mim tanto tempo para que eu adquirisse conhecimento específico e prática nas mais variadas atividades deste trabalho científico. São coisas que serei eternamente grato.

A Doutoranda Marcella Leite Porto, pela análise das minhas amostras com muita boa vontade e atenção, assim como ao Doutorando Jairo de Oliveira pela obtenção das imagens em microscopia eletrônica, ambos dispensaram seu precioso tempo em prol desse trabalho.

Ao mestrando, Jean Louzada, por me ajudar muitas vezes fora do seu horário de trabalho nas análises do material nos laboratórios da UVV.

Ao professor e colega Rogério Piontkovski, pela ajuda cedida, realizando o processamento do material para análise histológica.

Ao professor Tadeu Uggere de Andrade e à professora Denise Coutinho Endringer, pelas demandas atendidas durante este mestrado.

Aos laboratórios de fisiologia e de morfologia, respectivamente coordenados pelos Dr. Elisardo Corral Vasquez e Dr. Breno Valentim Nogueira, na UFES, pelo acolhimento e tempo dispensado.

Ao laboratório Tommasi e Dr. Jorge Terrão, pela análise bioquímica das minhas amostras e à FAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu grande amigo, colega de turma e aluno de iniciação científica, Arthur Lourensute Porto, pela ajuda e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

A minha família, pela compreensão e apoio, e à minha namorada, Raniele Ramalho, pela força que me dá nas horas mais difíceis, e por terem entendido a minha ausência em muitos momentos ao longo desses anos.

*“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”  
-(Frank Clark).*

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Capacidade de reação das sondas de fluorescência.	28
Tabela 2	Resumo de resultados de mortes por grupo, ureia plasmática, creatinina sérica, viabilidade de células corticais e medulares.	47

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Fontes enzimáticas de ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ).	21
Figura 2	Estresse oxidativo gerado pelo meio de contraste iodado.	23
Figura 3	Principais enzimas endógenas antioxidantes.	25
Figura 4	Formação do dihidroetídeo oxidado fluorescente (DHE) para detecção indireta de ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ).	26
Figura 5	Formação da diclorofluoresceína fluorescente (DCF) para detecção direta de $\text{H}_2\text{O}_2$ .	27
Figura 6	Formação da hidroxifenilfluoresceína fluorescente (HPF) para detecção direta de peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ) e radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ).	28
Figura 7	Esquema mostrando a oxidação proteica (formação dos grupos carbonilados) com a formação do AOPP.	29
Figura 8	Mecanismo Fisiopatológico da Nefropatia Induzida por Contraste (NIC).	31
Figura 9	Esquema de tratamento dos grupos experimentais.	38
Figura 10	Valores de creatinina dosados nos grupos nefropatia induzida por contraste (NIC), controle, N-acetilcisteína 200 mg/kg (NAC), <i>Virola oleifera</i> 10 mg/kg (V10), <i>Virola oleifera</i> 100 mg/kg, (V100) e , <i>Virola oleifera</i> 300 mg/kg (V300).	48
Figura 11	Valores de ureia dosados nos grupos nefropatia induzida por contraste (NIC), controle, N-acetilcisteína 200 mg/kg	

(NAC), <i>Virola oleifera</i> 10 mg/kg (V10), <i>Virola oleifera</i> 100 mg/kg, (V100) e , <i>Virola oleifera</i> 300 mg/kg (V300).	49
Figura 12 Produção de espécies reativas do oxigênio (ROS).	50
Figura 13 Quantificação de produtos avançados de proteína oxidada (AOPP).	51
Figura 14 Análise da apoptose por citometria de fluxo.	53
Figura 15 Imagens típicas das lâminas de tecido renal coradas em HE.	55
Figura 16 Quantificação do índice de lesão túbulointersticial (TILI).	56
Figura 17 Microfotografias de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tecido renal de camundongos.	57

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADH	Hormônio antidiurético
ANOVA	Análise de variância de uma via
AOPP	Produtos avançados de proteína oxidada
ATP	Adenosina-5-trifosfato
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
cNOS	Óxido nítrico sintase constitucional
CYP's	Citocromo P oxidases
Cu-Zn SOD	Cobre-zinco superóxido dismutase
DCF	Diclorofluoresceína
DHE	Dihidroetídeo
DNA	Acido desoxiribonucleico
DiTyr	Aminoácidos de ditirosina
ECA	Enzima conversora da angiotensina
FITC	Anexina V
FS	Fosfatidilserina
FSC	Parâmetros de tamanho ou volume relativo
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Dissulfureto de glutaciona (reduzida)
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
G6PD	Glicose - 6 - fosfato desidrogenase
HE	Hematoxilina e eosina
HPF	Hidroxifenilfluoresceína
hROS	Espécies de oxigênio altamente reativas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRA	Insuficiência renal aguda
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster (Inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase)

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mn-SOD	Manganês superóxido dismutase
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência
NAC	N-acetilcisteína
NIC	Nefropatia induzida por contraste
•NO	Radical óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
•OH	Radical hidroxila
OONO <sup>-</sup>	Peroxidnitrito
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
PBS	Solução tampão fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina-2
PI	Iodeto de propídeo
ROS	Espécies Reativas de oxigênio
RV	Resina de <i>Virola oleifera</i> (Schott) A. C. Smith
SOD	Superóxido dismutase
SSC	Parametro de granulidade ou complexidade interna
SFB	Soro fetal bovino
TFG	Taxa de filtração glomerular
TXA2	Tramboxano A2
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UVV	Universidade Vila Velha
V 10	Grupo tratado com 10 mg/kg resina de <i>Virola oleifera</i> (Schott) A. C. Smith
V100	Grupo tratado com 100 mg/kg resina de <i>Virola oleifera</i> (Schott) A. C. Smith
V 300	Grupo tratado com 300 mg/kg resina de <i>Virola oleifera</i> (Schott) A. C. Smith

## RESUMO

FONTE BÔA, Igor Santos, M.Sc., Universidade Vila Velha-ES, junho de 2015. Atividade nefroprotetora da resina de *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith na nefropatia induzida por contraste. Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira. Co-orientadora: Denise Coutinho Endringer.

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é um evento médico iatrogênico para o qual ainda não há uma terapia bem sucedida. Evidências crescentes em roedores sugere que esta doença está associada com lesão tubular e vascular renal desencadeada diretamente por estresse oxidativo. No presente estudo, foi avaliado se a resina de *Virola oleifera* (RV) pode atenuar o dano renal no modelo experimental murino submetido à nefropatia induzida por contraste (NIC). Para tanto, camundongos suíços machos adultos foram subdivididos em seis grupos experimentais: três grupos pré-tratados por via oral com RV (10, 100 e 300 mg/kg), um grupo pré-tratado com N-acetilcisteína (200 mg/kg), um grupo sem pré-tratamento que recebeu veículo e um grupo controle, o qual também recebeu veículo, durante 5 dias antes da indução de NIC. A função renal foi avaliada pelos níveis de creatinina e ureia no plasma após 24h da indução da NIC. Já o estresse oxidativo renal, a taxa de apoptose e a viabilidade das células renais foram determinados por análises realizadas através de citometria de fluxo. Além disso, os tecidos renais foram seccionados para exame histopatológico. De uma forma dose-dependente, o tratamento com RV no modelo de nefropatia induzida por contraste melhorou a função renal, diminuiu a taxa de mortalidade, reduziu o estresse oxidativo e a taxa de apoptose tanto nas células da medula como nas do córtex renal. Além disso, a RV demonstrou efeitos benéficos sobre as mudanças estruturais do rim mostrando superioridade em relação ao tratamento convencional com N-acetilcisteína. Estes dados de nefroproteção sugerem que a resina de *Virola oleifera* possa ser utilizada como uma nova estratégia terapêutica para prevenir nefropatia induzida por contraste, dada a sua capacidade para preservar a função renal em adição aos efeitos antioxidante e anti-apoptóticos indiretos.

**Palavras-chave:** Resina; *Virola oleifera*; Nefropatia induzida por contraste (NIC); Estresse oxidativo; Apoptose.

## ABSTRACT

FONTE BÔA, Igor Santos, M.Sc., Universidade Vila Velha-ES, June, 2015. Nefroprotect Activity *Virola oleifera* (Schott) AC Smith resin in contrast-induced nephropathy. Advisor: Thiago de Melo Costa Pereira. Co-advisor: Denise Coutinho Endringer

Contrast-induced nephropathy (CIN) is an iatrogenic medical event for which there is not yet a successful therapy. Increasing evidence in rodents has suggested that this disease is associated with renal tubular and vascular injury triggered directly by oxidative stress. In the present study, we evaluated if the antioxidant resin from *Virola oleifera* (RV) can attenuate renal damage in the experimental mice model of CIN. Adult male Swiss mice were subjected into six groups pre-treated orally: three groups with RV (10, 100 and 300 mg/Kg), one group with N-acetylcysteine (200 mg/Kg), one group without pre-treatment and a control group both received vehicle for 5 days before the induction of CIN. Renal function was assessed by plasma creatinine and urea levels 24 hours later of CIN induction. Also, renal oxidative stress and apoptosis/cell viability were determined by flow cytometry. Finally, kidney tissues were sectioned for histopathological examination. In a dose-dependent manner, the treatment with RV in CIN model improved renal function, diminished the mortality rate, reduced the oxidative stress and apoptosis in both medulla and cortex renal cells. Moreover, the RV demonstrated beneficial effects on the structural changes of the kidney showing superiority to standard treatment with N-acetylcysteine. These data suggest that resin from *Virola oleifera* may have potential as a new therapeutic approach to prevent Contrast-induced nephropathy given its ability to preserve renal function in addition to antioxidative and indirect anti-apoptotic effects.

**Keywords:** Resin; *Virola oleifera*; Contrast-induced nephropathy (CIN); Oxidative stress; Apoptosis

# SUMÁRIO

	<b>LISTA DE TABELAS</b>	v
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vi
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	viii
	<b>RESUMO</b>	x
	<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1.1	<b>Sistema Renal</b>	15
1.1.1.1	Anatomia e Importância Fisiológica	15
1.1.1.2	Néfron	16
1.1.1.3	Produção de Urina	16
1.1.2	<b>Biomarcadores de função renal</b>	17
1.1.3	<b>Hemodinâmica Renal: substâncias que regulam sua hemodinâmica</b>	18
1.1.4	<b>Estresse oxidativo</b>	19
1.1.4.1	Conceito	19
1.1.4.2	Principais biomoléculas envolvidas no estresse oxidativo	21
1.1.4.3	Fatores Antioxidantes	22
1.1.4.4	Como analisar o estresse oxidativo?	25
1.1.4.4.1	Citometria de fluxo	26
1.1.4.4.1.1	Sondas fluorescentes	26
1.1.4.4.2	Produtos avançados de proteína oxidada (AOPP)	29
1.1.5	<b>Nefropatia induzida por contraste</b>	29
1.1.6	<b>Estratégias terapêuticas da atualidade contra a NIC</b>	32
1.1.7	<b><i>Virola oleifera</i>: por que testá-la?</b>	33
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	35
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	36
3.1	MATERIAL VEGETAL	36
3.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	36

3.3	MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA NEFROPATIA POR CONTRASTE	37
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
3.5	INDUÇÃO DA NEFROPATIA POR CONTRASTE	38
3.6	PRODUTOS NITROGENADOS DO SORO (UREIA E CREATININA)	39
3.7	ISOLAMENTO DE CÉLULAS DO TECIDO RENAL	39
3.8	CITOMETRIA DE FLUXO	40
3.8.1	<b>Funcionamento do citômetro de fluxo</b>	41
3.8.2	<b>Determinação da viabilidade e apoptose (anexina)</b>	42
3.8.3	<b>Medida do estresse oxidativo pela determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DHE, DCF E HPF)</b>	43
3.9	ANÁLISE HISTOLÓGICA	44
3.9.1	<b>Microscopia óptica</b>	44
3.9.2	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b>	44
3.10	PRODUTOS AVANÇADOS DE PROTEÍNA OXIDADA (AOPP)	45
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4.	<b>RESULTADOS</b>	47
4.1	EFEITO DA RESINA DE <i>Virola oleifera</i> NA ATENUAÇÃO DA DISFUNÇÃO RENAL DA NIC EM CAMUNDONGOS	47
4.2	PRODUÇÃO DE ROS	49
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE AOPP NO TECIDO RENAL	51
4.4	APOPTOSE	51
4.5	PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS RENAIIS	54
5.	<b>DISCUSSÃO</b>	58
6.	<b>CONCLUSÃO</b>	62
	<b>REFERÊNCIAS</b>	63
	<b>ANEXOS</b>	74

## 1. INTRODUÇÃO

---

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma doença de alta prevalência e incidência, podendo alcançar mais de 30% de todos os pacientes com transtornos iatrogênicos (Prasad et al., 2001). Os fatores de risco para a NIC são aumentados para pacientes com idade avançada, hepatopatas, insuficientes cardíacos, nefropatas pré-existentes e diabéticos os quais inclusive pertencem ao grupo mais vulnerável a procedimentos diagnósticos e intervencionistas que utilizam o contraste iodado (Möcke et al., 2008; Santos et al., 2011; Curtis e Agarwal, 2007; Andreucci, 2014). Paradoxalmente, apesar do uso de meios de contraste iodados ser essencial em várias técnicas de diagnóstico por imagem, as estratégias para evitar NIC ainda são insuficientes (Andreucci et al., 2014; Itoh et al., 2005; Yomaku et al., 2008) predispondo a perda a longo prazo da função renal e gerando despesas médicas (Seelinger et al., 2012). Portanto, o desenvolvimento de estratégias para a prevenção da NIC é fundamental, a fim de evitar danos renais, bem como, minimizar os custos econômicos.

Embora a fisiopatologia da NIC não seja totalmente conhecida, estudos experimentais indicam ser oriunda de uma toxicidade tubular direta do contraste acompanhada de isquemia renal medular (Curtis e Agarwal, 2007; Andreucci, 2014) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Itoh et al., 2005; Zager et al., 2003; Heyman et al., 2010; Pattharatima e Tasanarong, 2014), o que constitui um fator determinante para as alterações histológicas de dano tubular proximal como tem sido observado na NIC clínica e experimental (Billings et al., 2008; Khongkhan, Sriwong e Tasanarong, 2013; Curtis e Agarwal, 2007; Andreucci et al., 2014; Barret e Parfrey, 2006). Neste contexto, a N-acetilcisteína (NAC), ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) foram testados para prevenir a NIC, devido às suas atividades antioxidantes (Spargias et al., 2004; Khongkhan, Sriwong e Tasanarong, 2013; Pattharatima e Tasanarong, 2014; McCullough e Akrawinthawong, 2013). No entanto, foram obtidos resultados inconsistentes em várias destas investigações clínicas, o que levou à busca de outras substâncias com potencial renoprotetor, tal como a *Virola oleifera* (Schott) AC Smith, Myristicaceae, popularmente conhecida

como "Bicuíba", "bocuva", "bicuíva" ou "candeia-do-caboclo" é uma árvore encontrada na Mata Atlântica (Colombo e Joly, 2010). Interessantemente, sua casca produz uma resina comumente utilizada como cicatrizante (Baliano et al., 2010) contendo uma mistura de vários compostos fenólicos e flavonoides, que exibem propriedades altamente antioxidantes (Milaneze et al., 2010). Portanto, é hipotetizado que a resina de *Virola oleifera* (RV) possa atenuar os parâmetros anormais, que caracteriza a lesão renal em um modelo experimental de NIC. A confirmação dessa hipótese pode oferecer uma nova abordagem para evitar NIC.

No presente estudo propusemos, de maneira inédita, estudar os possíveis efeitos nefroprotetores da resina de *Virola oleifera* na prevenção de NIC em células corticais e medulares renais de camundongos suíços (*Mus musculus*) objetivando verificar o grau de estresse oxidativo, taxa de apoptose e viabilidade celular. Dessa forma, novas propostas para viabilizar a prevenção da NIC tem uma grande relevância na medicina translacional a fim de melhorar a segurança desses procedimentos de diagnóstico.

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Sistema Renal

#### 1.1.1.1 Anatomia e Importância Fisiológica

O aparelho urinário é formado pelos rins, ureteres, bexiga e a uretra. Este aparelho contribui para a manutenção da homeostase corporal, produzindo urina através da qual são eliminados diversos resíduos do metabolismo, água, eletrólitos e não-eletrólitos em excesso no meio interno. Além disso, têm a função de produzir hormônios, como a renina e a eritropoetina (Zeisberg e Kalluri, 2015; Junqueira e Carneiro, 2013). Anatomicamente, o rim é composto por uma cápsula de tecido denso, zona cortical e zona medular. A zona medular é formada por 10 a 18 pirâmides medulares, cada pirâmide é recoberta pelos lados e sua base por tecido cortical, formando um lobo renal. No tecido cortical encontramos os túbulos

contorcidos proximais e distais, os glomérulos e os ductos coletores (Junqueira e Carneiro, 2013; Aires, 2008).

#### 1.1.1.2 Néfron

O néfron é a unidade morfofuncional dos rins, em que cada rim possui de um a quatro milhões de néfrons. Cada néfron é formado pelo corpúsculo renal, túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e túbulo coletor e ducto coletor (Riella, 2003). O corpúsculo renal, também chamado de corpúsculo de Malpighi, é formado pelo glomérulo capilar envolto por uma cápsula membranosa - a cápsula de Bowman. O glomérulo é um tufo de capilares recobertos por podócitos e tem a função de realizar a ultrafiltração do sangue. Os corpúsculos renais possuem dois polos, um polo vascular onde penetram uma arteríola aferente e é emitida uma arteríola eferente e o polo urinário, que dá origem ao túbulo contorcido proximal (Junqueira e Carneiro, 2013).

#### 1.1.1.3 Produção de urina

O trabalho de milhões de néfrons resulta na formação da urina. Cerca de 25% do plasma que atinge o rim são ultrafiltrados pelos glomérulos, levando à formação de 100 a 120 ml/min de ultrafiltrado em média no homem. A ultrafiltração glomerular representa a primeira etapa no processo de geração da urina. Durante seu trajeto ao longo dos capilares glomerulares, o plasma é forçado a atravessar a parede do vaso, o que resulta na formação de um ultrafiltrado que, a partir de então, será processado ao longo do néfron (Riella, 2003; Junqueira e Carneiro, 2013) Entretanto, apenas 1,2% desse volume são eliminados, e o restante reabsorvido da luz tubular para o espaço peritubular. Além da reabsorção tubular temos outro mecanismo muito importante, o de secreção tubular. Este se caracteriza pelo transporte de substâncias do espaço peritubular (vasos e interstício) para a luz tubular e permite a excreção de substâncias na urina que não foram filtradas pelos capilares glomerulares,

como as macromoléculas ou partículas ligadas a proteínas. Portanto, a formação da urina resulta de três processos: a filtração glomerular, reabsorção tubular e a secreção tubular (Riella, 2003).

### **1.1.2 Biomarcadores de função renal**

A creatinina e a ureia são produtos nitrogenados finais do metabolismo. Enquanto a creatinina é proveniente do catabolismo da fosfocreatina muscular (Walker et al., 1990), a ureia é um metabólito proveniente da dieta proteica e do “turnover” proteico tecidual (Walker et al., 1990). Embora possuam interferentes conhecidos que possam comprometer a confiabilidade desses marcadores na rotina clínica (Riella, 2003; Magro e Vattimo, 2007; Kirsztajn, 2010), a creatinina é uma substância endógena que não necessita de infusão venosa para avaliação rotineira da filtração glomerular. A concentração de creatinina no soro é amplamente utilizada como um indicador substituto simples para a taxa de filtração glomerular (TFG) em pacientes e em modelos animais. A creatinina sérica é rotineiramente medida por meio de uma reação colorimétrica com ácido pícrico que produz um derivado de absorbância de 485 - 520 nm (Walker et al., 1990).

A ureia representa o produto final do catabolismo humano das proteínas e primariamente excretada pelos rins por se tratar de uma molécula de baixo peso molecular (60 daltons) e estar amplamente distribuída na água corporal (Lima et al., 2005). Os níveis normais de ureia podem se alterar devido à ingestão proteica, catabolismo proteico endógeno, estado de hidratação, síntese hepática e pela sua excreção renal (Walker et al., 1990; Riella, 2003). Quando existe diminuição do fluxo sanguíneo renal, a reabsorção tubular de ureia pode atingir valores ao redor de 90% deixando a medula renal hiperosmolar, favorecendo a reabsorção de água livre no túbulo coletor sob ação do hormônio antidiurético (ADH) (Riella, 2003).

### 1.1.3 Hemodinâmica Renal: substâncias que regulam sua hemodinâmica

O rim sofre influência de substâncias endógenas e exógenas que produzem interações complexas entre as células glomerulares, tubulares e intersticiais, gerando vasoconstrição como também vasodilatação em diferentes segmentos vasculares renais. Dentre os que promovem vasodilatação existe o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pelo endotélio vascular catalizado pela óxido nítrico sintase (NOS). Este tem a capacidade de regular o tônus vascular através de sua liberação contínua estimulada pelos níveis de acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, serotonina e outros, ou por estímulos causados pelos atritos no endotélio vascular (*shear stress*) (Lindholt, 2003; Papaharalambus e Griedling, 2007).

Outra classe contribuinte para a manutenção da hemodinâmica renal são os eicosanoides provenientes do ácido araquidônico, conhecidos como prostaglandinas e tromboxanos. As prostaglandinas promovem redistribuição do fluxo sanguíneo renal para a região intramedular. Além de mediar efeitos diuréticos e antagonizarem a ação da vasopressina (Murphy et al., 2002; Batlouni, 2010). As prostaglandinas são produzidas através das ciclooxigenases (COX) as quais estão presentes ao longo da vasculatura renal (arteríolas aferente e eferente, capilares peritubulares e glomerulares), nas células epiteliais do túbulo coletor e nas células intersticiais. Além disso, já foram identificadas nas células do epitélio do ducto coletor, musculatura lisa e nas células endoteliais dos vasos renais.

O tromboxano  $A_2$  é formado pela contribuição de outra enzima denominada tromboxano sintetase. Considerado um autacoide vasoconstritor, possui a capacidade de antagonizar os efeitos vasodilatadores das prostaglandinas como PGE2 e PGI2 (Batlouni, 2010).

Outra substância liberada pelas células endoteliais em resposta a vários estímulos é a endotelina. Trata-se de um potente vasoconstritor dez vezes mais potente que a angiotensina II (outro importante peptídeo vasoativo), vasopressina e neuropeptídeo Y, sendo considerada a substância vasoativa endógena mais potente. A elevação da endotelina pode levar a contração da arteríola eferente e da *vasa recta*, desenvolvendo hipóxia medular e apoptose

de células tubulares. A endotelina também é um marcador de disfunção endotelial.

Outra substância com propriedades vasoativas é a adenosina, um produto da decomposição do ATP que na maioria dos tecidos (coração e cérebro, por exemplo) provoca vasodilatação. Entretanto, nos rins ela promove vasoconstrição. É considerada como um importante fator parácrino dos rins (Hansen e Schnermann, 2003).

#### **1.1.4 Estresse oxidativo**

##### **1.1.4.1 Conceito**

Ainda que o oxigênio possua efeitos positivos como acceptor final da cadeia transportadora de elétrons dos quais torna a vida possível a manutenção da vida de organismos multicelulares complexos, parte da sua forma reduzida se converte em espécies altamente reativas, denominadas espécies reativas do oxigênio (ROS). Estas ROS apesar de apresentarem fisiologicamente um papel importante na homeostase, quando em excesso possuem efeitos nocivos secundários para os sistemas biológicos (Nevitt e Rodrigues, 2007; Paravicini e Touyz, 2008).

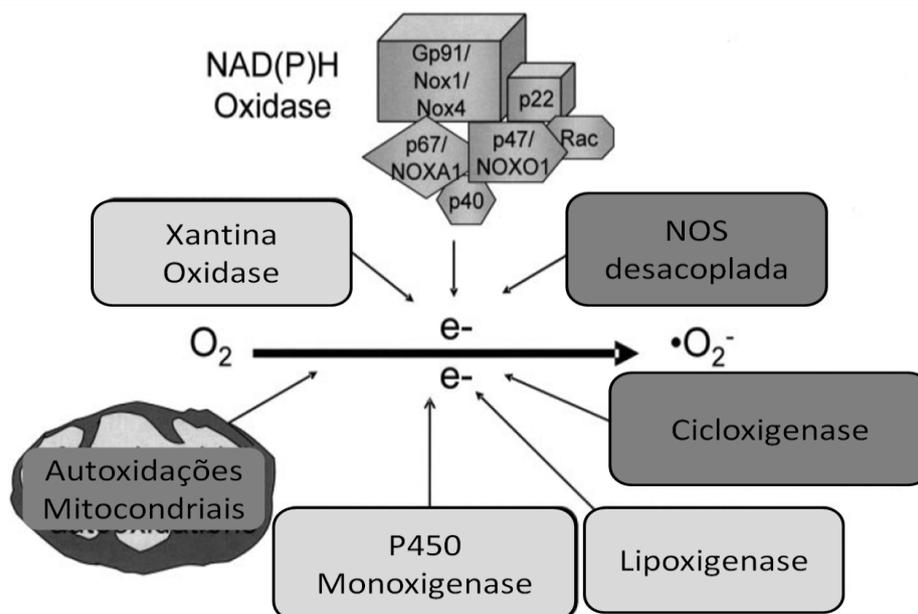
As ROS e seus produtos parecem ser as maiores causas de dano. Tanto o oxigênio quanto seus subprodutos reativos são vulneráveis para atacar moléculas biológicas, podendo ser uma proteína, um lipídeo ou até mesmo o DNA (Halliwell et al., 1999; Paravicini e Touyz, 2008), gerando desta forma o estresse oxidativo. O termo estresse oxidativo é usado para indicar uma condição em que as células estão expostas a altos níveis de ROS (Tonini et al., 2013). É comum, o estresse oxidativo ser desencadeado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, que potencialmente pode induzir uma lesão (OGA, 2003; Paravicini e Touyz, 2008). Sendo assim, a superprodução de ROS, tais como ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), ânion peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), pode resultar em morte celular por necrose ou apoptose, através da interação destes com lipídeos, proteínas e o DNA (Tonini et al.,

2013; Dias et al., 2014).

Para que ocorra o estresse oxidativo é necessário um desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes. A perturbação deste equilíbrio pode ser desencadeada por um aumento na geração de ROS ou por meio de deficiências ou defeitos genéticos nas defesas antioxidantes, uso de drogas, algumas toxinas ou transferência de elétrons ao oxigênio por metais de transição (Vasconcelos et al., 2007). Convém salientar que nem sempre as ROS são subprodutos prejudiciais. A presença de ROS em quantidades fisiológicas são necessárias para a homeostasia. Atualmente, é reconhecido que eles desempenham um papel importante como segundos mensageiros em muitas vias de sinalização intracelular e resposta imunológica (Dröge, 2002; Ribeiro et al., 2006; Tonini et al., 2013). Assim, pequenas perturbações no equilíbrio do estresse oxidativo são necessárias para a homeostase, enquanto que perturbações mais significativas do equilíbrio oxidativo podem levar a danos irreparáveis e morte celular (Dias et al., 2014). O limite entre as alterações fisiológicas normais e lesivas não é distinta. A definição de estresse oxidativo é necessária porque o resultado depende, em parte, do compartimento celular em que as ROS são geradas. As circunstâncias ambientais prevaletentes que irão orquestrar as contribuições relativas das muitas potenciais fontes de ROS. Desta forma, as células estão constantemente expostas aos possíveis danos causados pelas ROS, que podem ser geradas endogenamente (fonte majoritária) e/ou exogenamente. As ROS endógenas são formadas pelo próprio metabolismo celular através da mitocôndria, peroxissomos, lipoxigenases (Boveris et al., 1972; Turrens e Boveris, 1980; Turrens, 1997; Gutteridge e Halliwell, 2010). Por vias exógenas, uma destas fontes mais comuns é fonte de interesse no presente estudo: a disfunção endotelial gerada pelo radiocontraste iodado, a qual será discutida posteriormente (Machado et al., 2003).

### 1.1.4.2 Principais biomoléculas envolvidas no estresse oxidativo

As ROS são moléculas altamente reativas as quais se subdividem em dois grupos principais: os radicais livres que apresentam elétrons desemparelhados ( $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$  e  $\bullet\text{NO}$  e, como consequência mais instáveis) e os derivados não radicais ( $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{OONO}^-$ , mais estáveis). Os  $\bullet\text{O}_2^-$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  são as espécies reativas mais abundantes em sistemas biológicos (Paravicini e Touyz, 2008; Tonini et al., 2013). Há também outras fontes de produção das ROS, denominadas fontes enzimáticas pró-oxidantes, as quais estão resumidamente apresentadas na figura 1. As principais fontes são mediadas pela NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, NOS desacoplada, cicloxigenase, lipoxigenase e enzimas do citocromo p450 (CYP's).



**Figura 1** – Fontes enzimáticas de ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). As principais enzimas responsáveis pela geração de ROS na vasculatura inclui a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, NOS desacoplada. A NAD(P)H oxidase é uma enzima com várias subunidades, compreendendo a gp 91 phox, p22 phox, p 47 phox, p67 phox e p40 phox. Outras enzimas participantes são: cicloxigenase, lipoxigenase e enzimas do citocromo p450 (CYP's). Adaptado de Paravicini e Touyz, 2008.

O  $\bullet\text{O}_2^-$  é rapidamente reduzido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por ação da enzima superóxido dismutase (SOD). A carga do  $\bullet\text{O}_2^-$  dificulta sua travessia pelas membranas, exceto por canais iônicos. Em contraste, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é mais difusível e possui maior

tempo de meia vida (Paravicini e Touyz, 2008; Tonini et al., 2013).

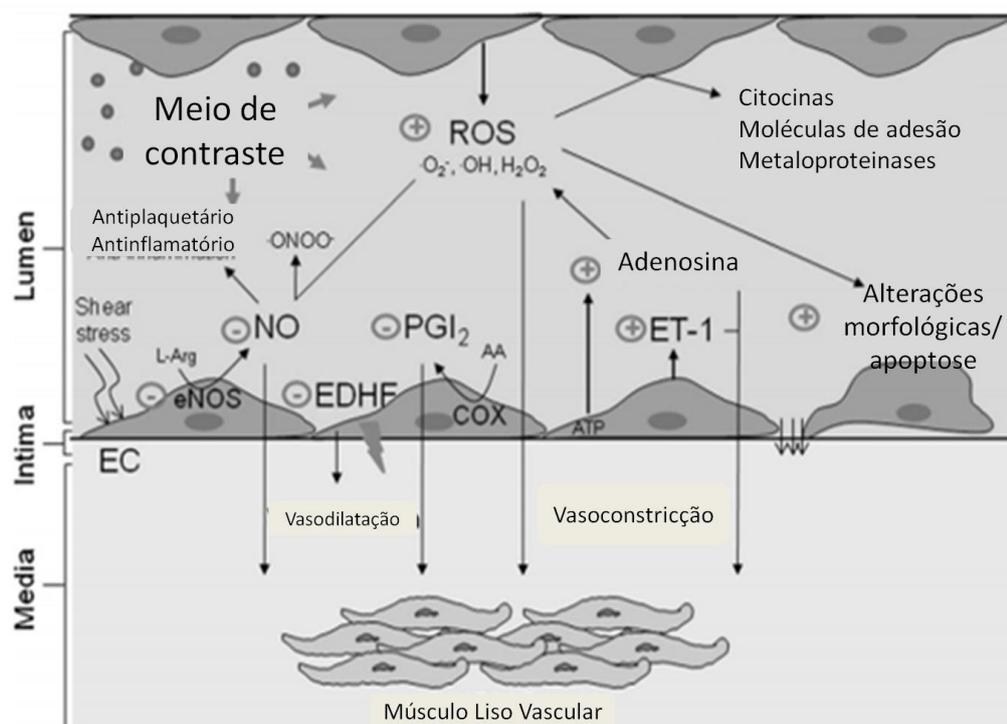
O estresse oxidativo promove a diminuição da biodisponibilidade de NO desencadeada pela presença de  $\bullet\text{O}_2^-$ . Quando estas duas espécies são formadas nas células, mesmo na presença de radicais sequestrantes e enzimas antioxidantes, elas reagirão devido à constante de velocidade mais elevada do que outras reações (Kalyanaraman, 2013). Como consequência, geram um produto denominado peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ) (figura 2) (Paravicini e Touyz, 2008; Tonini et al., 2013; Balarini et al., 2013). Como consequência, os efeitos fisiológicos importantes mediados pelo NO podem ser comprometidos.

O radical NO é sintetizado a partir de um aminoácido chamado L-arginina, que sofre um processo de oxidação catalisado por uma enzima chamada NO sintase (NOS), produzindo L-citrulina e NO. A NOS pode ser do tipo induzível (iNOS) ou constitutiva (cNOS), esta última subdividida em NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS) (Noris *et al.*, 2004). O NO é um radical importante para a fisiologia humana. A eNOS é fundamental no processo de vasodilatação e proteção endotelial seja quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, serotonina e outros, ou por estímulos causados pelos atritos no endotélio vascular (*shear stress*), produzindo assim o NO (Papaharalambus e Griendling, 2007). O NO atua na proteção vascular regulando o tônus vascular através de sua liberação em pequenas quantidades de forma contínua. Além de prevenir a agregação plaquetária pela elevação da GMPc e diminuição do cálcio intraplaquetário, essencial na ativação das plaquetas, o NO inibe tanto a produção de  $\text{TXA}_2$  plaquetário (Loscalzo et al., 2001; Ray et al., 2012) como também a adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular (Tousoulis et al., 2012).

#### 1.1.4.3 Fatores Antioxidantes

As enzimas envolvidas na produção e remoção das ROS são expressas na grande maioria dos tecidos, incluindo células vasculares (Clempus e Griendling, 2006). A produção intencional de ROS é importante para promover uma função vascular normal, atuando como moléculas de sinalização celular,

na proliferação de células musculares lisas até mesmo no controle de seu tônus (Paravicini e Touyz, 2008). O endotélio é um importante regulador do tônus vascular, pois controla a agregação plaquetária, a inflamação, coagulação, regeneração e a permeabilidade vascular (figura 2). O tecido endotelial funcionando expressa, por exemplo, enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) que degrada ROS, convertendo  $\bullet\text{O}_2^-$  em peróxido de hidrogênio  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ross, 1993; Tonini et al., 2013). Em seguida, outras enzimas denominadas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), podem converter o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , removendo integralmente os subprodutos das ROS e evitando assim danos permanentes em lipídeos, proteínas e DNA (Lönn et al, 2012; Tonini et al., 2013; Kalyanaraman, 2013).



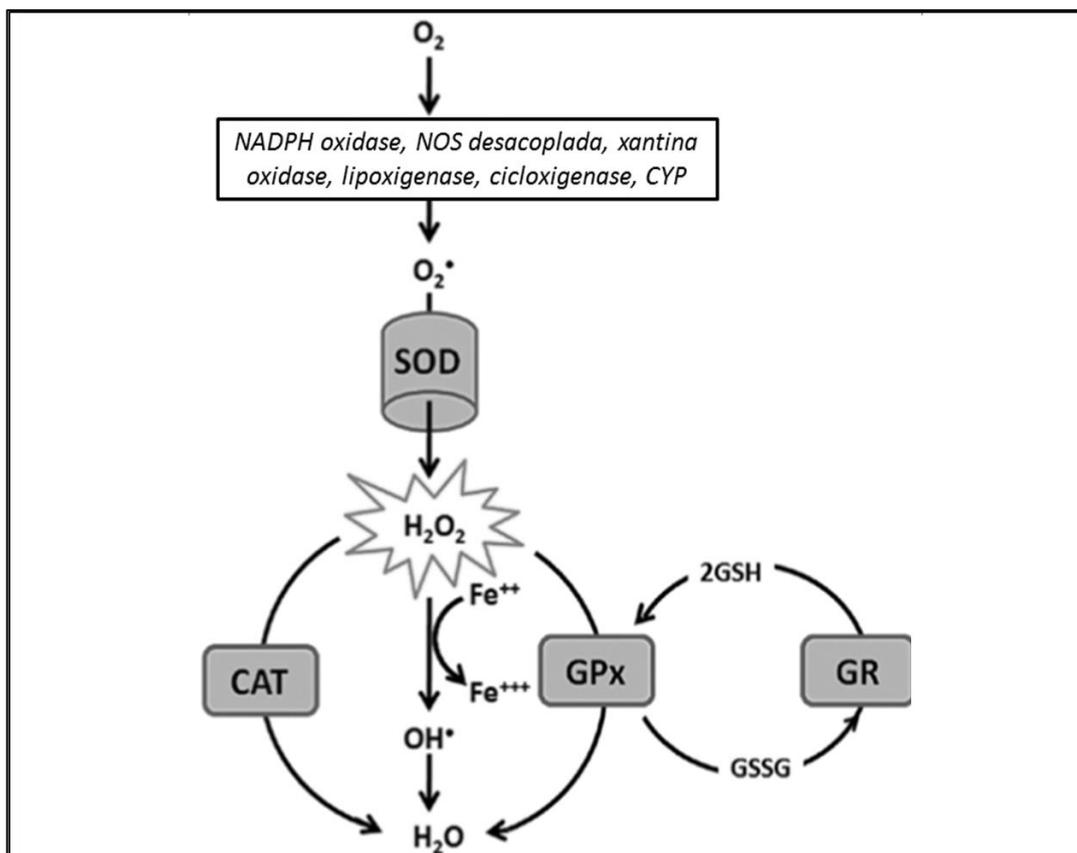
**Figura 2** – Estresse oxidativo gerado pelo meio de contraste iodado. Adaptado de Scoditti et al., 2013.

Durante o metabolismo celular normal são produzidas várias formas de ROS, porém existem defesas enzimáticas e não enzimáticas que participam da remoção dessas ROS. Os mecanismos protetores enzimáticos já foram previamente citados: SOD, CAT e GPx. Também existem os mediadores não enzimáticos conhecidos como a glutatona, o ácido ascórbico, flavonoides e

carotenoides (Buettner, 1993; Kalyanaraman, 2013). A N-acetilcisteína também pode atuar como antioxidante pelo seu efeito “scavenger” intrínseco e por aumentar a oferta de glutathiona.

É necessária uma abordagem mais detalhada das enzimas antioxidantes. São descritas duas isoformas de SOD em mamíferos, a Cu-Zn SOD, encontrada no citosol, no espaço intermembranar da mitocôndria e no espaço extracelular e a Mn-SOD, encontrada apenas na matriz mitocondrial (Jacob, 2009). Essas enzimas tem um metal de transição em sua essência, podendo assumir diferentes valências como transferência de elétrons durante o processo de desintoxicação. As duas formas de SOD convertem  $\bullet\text{O}_2^-$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o co-fator manganês, e as formas de cobre e zinco (Mistry et al., 2011). Por fim,  $\text{H}_2\text{O}_2$  é então transformado em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  pelas ações da CAT ou GPx conforme citado anteriormente. A atividade da GPx depende da presença de glutathiona reduzida (GSH) como um doador de hidrogênio (figura 3). A glutathiona é o principal tampão redox tiol celular e é sintetizado no citosol a partir de L-glutamato, L-cisteína e glicina. A GSH participa num grande número de reações desintoxicantes que formam dissulfureto de glutathiona (GSSG), que é convertido de volta para GSH pela ação da glutathiona redutase (GR), à custa de NADPH. O último é gerado através da via das pentoses fosfato, dos quais a glicose - 6 - fosfato desidrogenase (G6PD) é a primeira enzima. Esta enzima está sujeita a polimorfismos comuns, e sua diminuição da atividade pode comprometer as concentrações de GSH (Nicol et al., 2000).

As defesas não enzimáticas e as enzimáticas atuando em conjunto, podem inibir a peroxidação lipídica e conseqüentemente o estresse oxidativo (Packer e Wilson, 1979; Burton et al., 1985; Buettner, 1993).



**Figura 3** – Principais enzimas endógenas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona Redutase (GR). A SOD catalisa a dismutação do  $\bullet O_2^-$  para  $H_2O_2$ , uma espécie menos reativa. Em seguida, pode ocorrer uma conversão de  $H_2O_2$  para  $\bullet OH$  (reação de Fenton), que é uma forma muito mais reativa. A Gpx neutraliza o  $H_2O_2$  pela redução através de duas moléculas de glutaciona resultando na formação de uma de glutaciona reduzida (GSSG) e duas de duas moléculas de  $H_2O$ . A GR participa convertendo novamente a GSSG em GSH, renovando o ciclo (Adaptado de Pandey e Rizvi, 2010).

#### 1.1.4.4 Como analisar o estresse oxidativo?

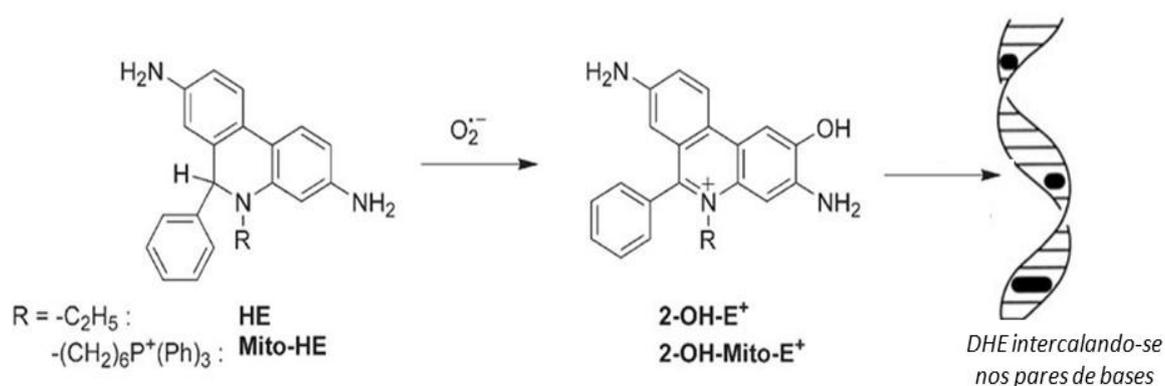
A medida do estresse oxidativo pode ser feita por vários métodos, dividindo-se em dois grandes grupos: os métodos diretos e os indiretos. Um dos métodos diretos é através de sondas fluorescentes utilizadas no citômetro de fluxo e um dos métodos indiretos é através da detecção dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) (Poljsal et al., 2013) como descrito a seguir.

#### 1.1.4.4.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular que proporciona a determinação das características físicas, biológicas e químicas das células. É um método que permite a análise de um grande número de células em um curto período de tempo. Todo material biológico, com tamanho entre 0,5 e 50 $\mu\text{m}$ , que contém células ou partículas em suspensão pode ser analisado por citometria de fluxo. É uma tecnologia que mede e analisa simultaneamente várias características físicas das partículas individuais, à medida que passam em um fluxo laminar através de um feixe de luz. As propriedades medidas incluem o tamanho relativo de uma partícula, granulidade ou complexidade interna e intensidade de fluorescência (Tonini et al., 2013; Dias et al., 2014).

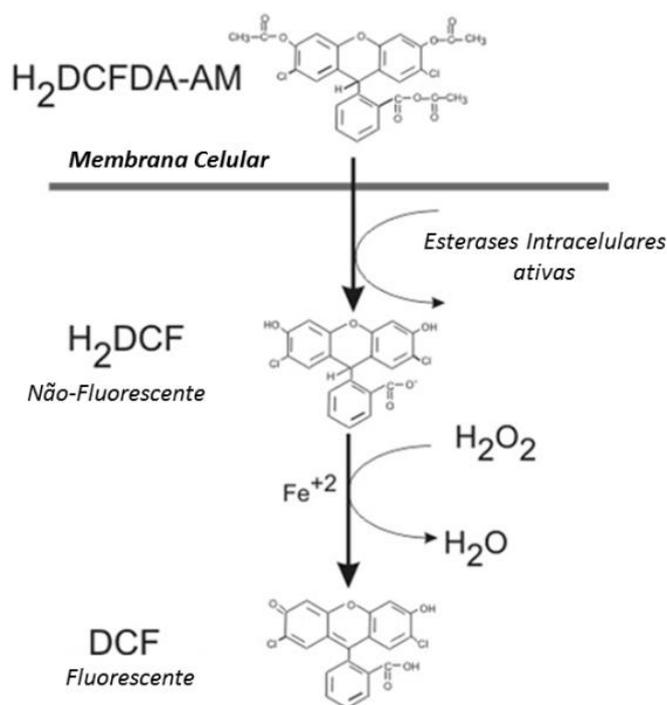
##### 1.1.4.4.1.1 Sondas fluorescentes

O DHE é a forma reduzida do brometo de etídeo. É permeável às células e é relativamente mais sensível ao  $\bullet\text{O}_2^-$ , podendo ainda reagir com outras ROS para formar etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm) (figura 6).



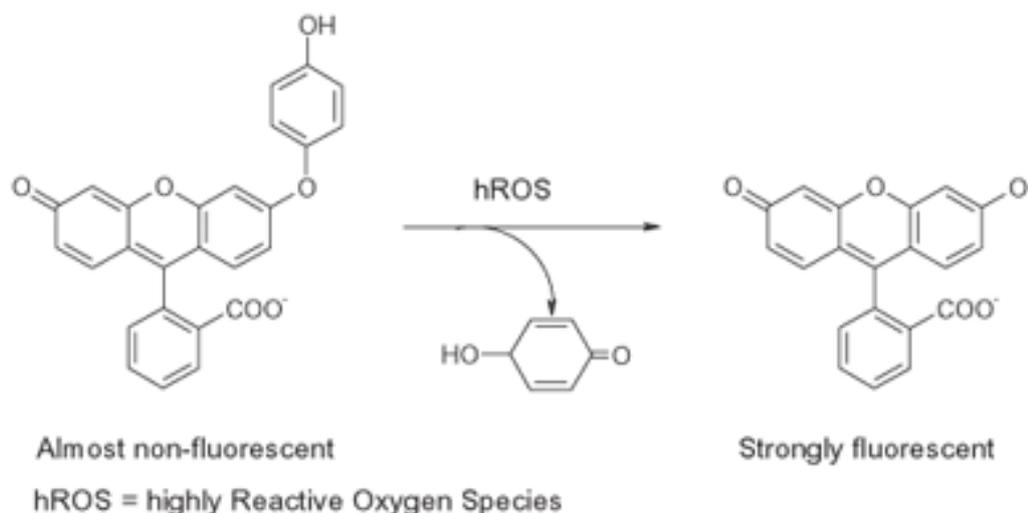
**Figura 4** – Formação do dihidroetídeo oxidado fluorescente (DHE) para detecção direta de  $\bullet\text{O}_2^-$  (Adaptado de Zeilonka and Kalyanaraman, 2010)

O H<sub>2</sub>DCFDA é um éster não fluorescente, que é internalizado pelas células e se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o H<sub>2</sub>DCFDA, sofre a ação de esterases intracelulares perdendo o grupo diacetato e formando o diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser oxidado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente (Figura 7). É importante entender que outras espécies reativas de oxigênio, tais como NO, ONOO<sup>-</sup> e radical peróxil (ROO<sup>-</sup>) podem também oxidar o DCFH. Assim, o DCF não pode ser caracterizado como um marcador exclusivo para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 5** – Formação da diclorifluoresceína fluorescente (DCF) para detecção direta de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (fonte: <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>).

O hidroxifenilfluoresceína (HPF) é um reagente celular permeável fluorescente (490 - 515 nm) para a detecção de espécies de oxigênio altamente reativas (hROS). Reage imediatamente com as hROS, tais como o radical hidroxila e peroxinitrito, sendo que na presença deste último a intensidade da fluorescência aumenta significativamente (figura 8). Além disso, o peroxinitrito pode ser detectado na distinção de óxido nítrico e de superóxido, pois o HPF não reage com o óxido nítrico, superóxido e de peróxido de hidrogênio (tabela 1).



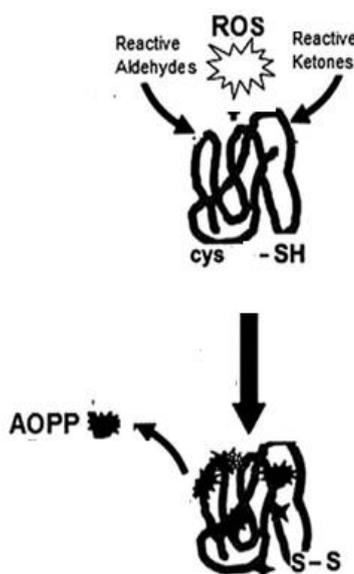
**Figura 6** – Formação da hidroxifenilfluoresceína fluorescente (HCF) para detecção direta de peróxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ) e radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ). (Modificado de <http://www.enzofluciences.com/ALX-620-074/hpf/>).

**Tabela 1** – Capacidade de reação das sondas de fluorescência. Reagentes de sonda de fluorescência foram adicionados ao tampão fosfato de sódio (0.1 M, pH 7,4) (10  $\mu\text{M}$  final, 0,1% de DMF como co-solvente). As intensidades de fluorescência das HPF, APF e DCFH foram medidas no comprimento de onda de excitação de 490, 490 e 500 nm e comprimento de onda de emissão de fluorescência de 515, 515 e 520 nm, respectivamente. <sup>a</sup> 100  $\mu\text{M}$  de perclorato ferroso (II) e 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi adicionado. <sup>b</sup> 3  $\mu\text{M}$  (final) de  $\text{ONOO}^-$  foi adicionado. <sup>c</sup> 3  $\mu\text{M}$  (final) de  $\text{NaOCl}$  foi adicionado. <sup>d</sup> 100  $\mu\text{M}$  de ácido 3- (1,4-Di-hidro-1,4-epidióxido-1-naftil) propiônico foi adicionado. <sup>e</sup> 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{KO}_2$  foi adicionado. <sup>f</sup> 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi adicionado. <sup>g</sup> 100  $\mu\text{M}$  de 1-hidroxi-2-oxo-3- (3-aminopropil) -3-metil-1-triazeno foi adicionado. <sup>h</sup> 100  $\mu\text{M}$  de 2,2 - azobis (2-amidinopropano) foi adicionado. <sup>i</sup> soluções reagentes de sonda fluorescentes foram colocadas sob uma lâmpada fluorescente durante 2,5 horas.

ROS	HPF	APF	DCFH
$\cdot\text{OH}^a$	730	1200	7400
$\text{ONOO}^{-b}$	120	560	6600
$\text{OCl}^-c$	6	3600	86
$^1\text{O}_2^d$	5	9	26
$\text{O}_2^-e$	8	6	67
$\text{H}_2\text{O}_2^f$	2	<1	190
$\text{NO}^g$	6	<1	150
$\text{ROO}^{\cdot h}$	17	2	710
Autoxidation <sup>i</sup>	<1	<1	2000

#### 1.1.4.4.2 Produtos avançados de proteína oxidada (AOPP)

Como as ROS podem oxidar proteínas dando origem aos resíduos de aminoácidos carbonilados ou de ditirosina (DiTyr), os níveis de carbonilas proteicas e DiTyr podem representar bons marcadores de oxidação proteica (figura 7).



**Figura 7-** Esquema mostrando a oxidação proteica (formação dos grupos carbonilados) com formação de AOPP (adaptado de Atukeren et al., 2010).

#### 1.1.5 Nefropatia induzida por contraste

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é a terceira maior causa de insuficiência renal aguda (IRA) no ambiente hospitalar (Detrenis et al., 2005; Seelinger et al., 2012). Essa alta prevalência é justificada pela crescente utilização de meios de contraste em exames de imagem e em procedimentos cirúrgicos endovasculares (Reuter et al., 2014). Clinicamente, a NIC é definida por um aumento da creatinina sérica de pelo menos 0,5 mg/dL ou de 25% do valor basal nas primeiras 48 horas após a administração de contraste na ausência de outras causas de disfunção renal (Santos et al., 2011).

Embora a NIC tenha usualmente evolução benigna com reestabelecimento da função renal entre 7 a 14 dias, existem fatores de risco que podem fazer com que certos grupos de pacientes evoluam com lesões

renais permanentes. Convém salientar que independente da evolução da lesão, o simples fato de existência de NIC aumenta em até cinco vezes a morbimortalidade em relação aos pacientes submetidos ao contraste sem o desenvolvimento da NIC (Machado et al., 2003). Os principais fatores de risco para a NIC são nefropatia diabética, desidratação, hipotensão, insuficiência cardíaca, idade avançada (acima dos 70 anos), nefropatias prévias com diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e consumo de medicamentos nefrotóxicos como os anti-inflamatórios não esteroidais (Santos et al., 2011; Seeliger et al., 2012). Além disso, doenças que comprometem a integridade do endotélio como diabetes, hipertensão arterial e aterosclerose podem comprometer a liberação de substâncias com ação vasodilatadora, tais como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), podendo ser a explicação para o risco aumentado de NIC nestes pacientes (Solomon, 1998; Watanabe et al., 2009)

A patogênese da NIC parece ser multifatorial, havendo contribuição de fatores vasculares (hemodinâmicos) e tubulares (Ultramari et al., 2006) (figura 8). A diminuição da oferta de óxido nítrico promove vasoconstrição que leva à hipoperfusão medular e conseqüentemente, hipóxia medular e diminuição da taxa de filtração glomerular. Da mesma forma, o radiocontraste aumenta a viscosidade do fluido tubular em comparação ao sangue, diminuindo a taxa de fluxo urinário, levando à retenção do contraste. Além disso, o radiocontraste quando administrado induz citotoxicidade direta, produzindo lesão endotelial e tubular, os quais geram aumento na oferta de espécies reativas do oxigênio (ROS), e estes podem diminuir diretamente a biodisponibilidade de NO (Machado et al., 2003). Conseqüentemente, há um incremento na vasoconstrição renal, elevando a resistência vascular intra-renal, culminando com a queda da TFG e diminuição do fluxo sanguíneo renal. Adicionalmente, pode haver um aumento da precipitação tubular de urato, contribuindo para a obstrução intratubular.



**Figura 8** – Mecanismo Fisiopatológico da Nefropatia Induzida por Contraste (NIC). Apesar de a NIC parecer ser multifatorial é conhecida a contribuição de fatores vasculares e tubulares (Adaptado de Seelinger et al., 2012).

A isquemia renal afeta mais a região medular, haja vista a perfusão e a pressão de oxigênio ser menores que as encontradas na região do córtex. Com isso, o aumento de ROS é potencializado pela diminuição de enzimas antioxidantes (figura 3) (Solomon, 1998; Detrenis et al., 2005).

É importante frisar que as ROS quando produzidas de forma balanceada em relação aos mecanismos antioxidantes, são de suma importância para a homeostase, influenciando nos mecanismos de defesa contra patógenos, apoptose, migração/proliferação celular, entre outros. Entretanto, quando a produção das ROS está exacerbada (estresse oxidativo), essas moléculas se ligam às moléculas constitutivas das células (lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos) e promovem transformações malignas nas células e até morte celular (Paravicini e Touyz, 2008).

### 1.1.6 Estratégias terapêuticas da atualidade contra a NIC

Assim que os primeiros trabalhos mostraram a eficácia da hidratação à base de solução salina a 0,9% na prevenção da NIC, evidenciou-se também que o uso simultâneo de diuréticos, como a furosemida e manitol contribuía para o aumento da frequência de nefropatia por contraste, sendo a partir de então não mais recomendado o uso de fármacos diuréticos na NIC (Gu et al., 2015; Machado, et al, 2003).

Outra proposta foi baseada no mecanismo de ação vasoconstritor gerado pelo aumento da osmolaridade sobre a musculatura lisa vascular o qual é mediado aparentemente pelo cálcio (Silva et al, 2010). Dessa forma, os bloqueadores de canais de cálcio foram apoiados pela diminuição da vasoconstrição observada em pacientes recebendo contraste iodado (Neumayer et al., 1989). Apesar de existirem ensaios clínicos que demonstram atenuação da redução na taxa de filtração glomerular após a exposição ao contraste (Ultramari et al., 2006; Oguzhan et al., 2013), outros estudos não comprovaram redução na frequência de NIC com o uso profilático destes medicamentos (Beyazal et al., 2014; Quintavalle et al., 2013; Oguzhan et al., 2013)

O uso de teofilina ou de aminofilina foi avaliado em ensaios clínicos, com resultados conflitantes. Assim como o peptídeo natriurético atrial, os antagonistas da endotelina, a prostaglandina E1, os inibidores da ECA e a L-arginina, que apesar de serem drogas vasodilatadoras, não mostraram benefício em relação ao placebo na prevenção da NIC (Yang et al., 2013; Ultramari et al., 2006).

A hemofiltração está indicada somente para os pacientes de alto risco visando diminuir os efeitos adversos do contraste, porém, eleger precocemente diálise não demonstrou benefício para evitar o desenvolvimento da NIC (Silva et al, 2010).

Alguns estudos citam que a hidratação com bicarbonato de sódio ao invés de cloreto de sódio seria benéfica, baseando-se que com a alcalinização da urina tubular o bicarbonato de sódio pode prevenir a formação de radicais livres e lesão por estresse oxidativo. No entanto, ensaios randomizados e estudos de observação foram contraditórios sobre a eficácia do bicarbonato de

sódio em comparação com o cloreto de sódio para a prevenção da IRA (Vanommeslaeghe et al., 2015; Beyazal et al., 2014; Quintavalle et al., 2013; Brar et al, 2009). Isso pode ser devido o bicarbonato de sódio ser reabsorvido nos túbulos proximais e, portanto, ser baixa a sua concentração na medula (Seeliger et al., 2012).

O uso de N-acetilcisteína (NAC) vem sendo utilizado como um antioxidante direto (“scavenger”) de ROS, agindo também como um precursor para a síntese do tripeptídeo antioxidante glutathiona (Glu-Cys-Gli). A NAC melhora o fluxo sanguíneo por induzir vasodilatação através de vias mediadas pelo NO, devido sua ação de elevar a biodisponibilidade de GMPc. Assim, a NAC é usada para oferecer proteção contra a NIC devido a suas propriedades antioxidante (“scavenger”) e conseqüentemente, vasodilatadora. Estudos demonstraram que a inibição das ROS pode representar um mecanismo-chave do efeito protetor da NAC (Xing et al., 2015; Kama et al., 2014; Li et al., 2014). O estudo farmacocinético confirma que apenas uma pequena proporção do NAC administrado por via oral é absorvida na sua forma livre, principalmente devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado, que é onde a NAC é biotransformada em cisteína e posteriormente mobilizada para síntese de glutathiona, um potente antioxidante. Por isso, administra-se oralmente a NAC horas antes da aplicação do contraste, havendo assim tempo hábil para a produção de glutathiona. Talvez as controvérsias que existem nos estudos quanto ao efeito protetor da NAC sejam devido à via de administração usadas nestes trabalhos (Sun et al, 2013; Buur et al, 2013).

#### **1.1.7 *Virola oleifera*: por que testá-la?**

Devido ao potencial antioxidante da espécie *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith (Konya; Vargas; Antus, 2001) e pelos efeitos gastroprotetor e hepatoprotetor em camundongos (artigo ainda não publicado, resultados de pesquisa em nossos laboratórios). O gênero *Virola* já foi objeto de diversos estudos, sendo relatadas propriedades anti-Leishmania (Barata et al., 2000; Costa et al., 1999; Morais et al., 2009), anti-inflamatória (Carvalho et al., 1999;

Lima et al., 2011), antiproliferativa (Denny et al., 2007), anti-ulcerogênica (Hiruma-Lima et al., 2009).

É uma espécie arbórea com 20 a 30 metros de altura e 50 a 90 centímetros de diâmetro de tronco (Ferri, 1993; Rodrigues et al., 1998). Pertencente à família Myristicaceae, que é composta por 18 gêneros e abrange em torno de 300 espécies. Dentre as representantes brasileiras, o gênero *Virola* é um dos mais frequentes, apresentando em torno de 60 espécies (Schultes, 1979). Essa família tem importância botânica devido a seu valor econômico e por sua grande dispersão no território brasileiro (Rodrigues, 1980). É uma árvore da Mata Atlântica, em regiões de Floresta Ombrófila Densa e Floresta Pluvial. Ocorre desde o sul do estado da Bahia, Minas Gerais até o nordeste do Rio Grande do Sul (Colombo e Joly, 2010; Ferri, 1993)

É uma planta popularmente conhecida em algumas regiões do Espírito Santo como bicuíba, bocuva, bicuíva, ucuúba, candeia-do-caboclo e muito usada pela população. O óleo extraído da semente de espécies de *Virola* é utilizado popularmente para dores reumáticas, crises asmáticas, tumores nas articulações, parasitoses intestinais, mau hálito, hemorroidas e moléstias da pele (Rodrigues, 1980). A casca do tronco, quando raspada, produz uma resina que é utilizada como cicatrizante de úlceras e feridas crônicas, combate diarreias, leucorréias e hemoptises. Em homeopatia é muito útil nas cólicas gastrointestinais e como tônico e restaurador de forças, além de ser utilizada como estimulante cerebral (memória) (Fenner et al., 2006; Rodrigues, 1980).

Nos estudos já realizados com a *V. oleifera*, principalmente com folhas, foram isolados vários tipos de lignanas e neolignanas (Ferri, 1993; Sartonelli, 1998; Azevedo et al., 1997; Fernandes et al., 1993), ciclolignana (Sartonelli, 1998) e ácidos graxos (Fontanari et al., 2012). Portanto, a resina de *Virola oleifera* (Schott) A.C. Smith possui características que indicam uma potencial atividade nefroprotetora.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito nefroprotetor da resina da *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith em modelo murino de nefropatia induzida por contraste.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por parâmetros bioquímicos a função renal *in vivo* dos camundongos suíços tratados com a resina da *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith no modelo de NIC através da creatininemia e uremia.
- Investigar a capacidade da resina da *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith de proteger das lesões renais induzidas por radiocontraste através de:
  - Biomarcadores de função renal;
  - Análise de produtos avançados de oxidação protéica (AOPP)
  - Ensaio morfo-histológicos (microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura)
  - Análise do estresse oxidativo, índice de apoptose e viabilidade de células do córtex e medula renal (citometria de fluxo).

### 3. METODOLOGIA

---

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

A resina da *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith foi coletada (fevereiro de 2012) no distrito de Fazenda Guandu, região de Rio da Cobra no município de Afonso Cláudio (Espírito Santo – Brasil). O exsudato fluido foi obtido por meio de incisões no tronco da árvore, de aproximadamente 0,5 cm de profundidade, coletando-se a resina em plástico asséptico, sendo finalmente transferida para frasco de vidro âmbar também asséptico e mantida sob refrigeração. Uma exsicata foi preparada e tombada sob o número VIES 19648, no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo. O exsudato fluido foi então submetido à secagem, em estufa, a 40°C, onde depois de seco foi pulverizado e obteve-se ao final 24 g de material seco, sendo denominada resina seca, armazenada atualmente a 4°C em vidro âmbar no laboratório do complexo de biopráticas da Universidade Vila Velha.

#### 3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

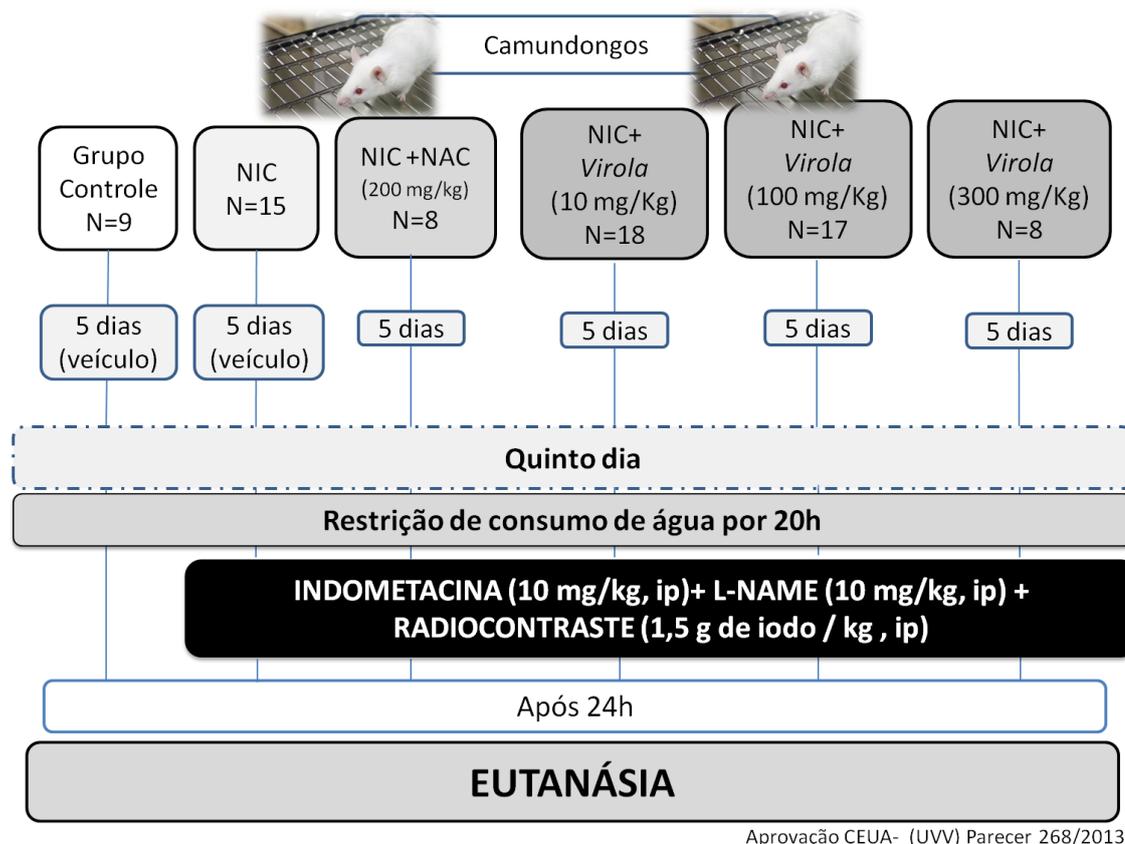
Os animais utilizados foram camundongos suíços (*Mus musculus*), machos, adultos, com peso entre 25 a 40 gramas mantidos no biotério da Universidade Vila Velha, em condições controladas e estáveis (22 °C, 50-70% de umidade e ciclo claro-escuro de 12/12h), com oferta de água e ração *ad libitum*. Todos os ensaios biológicos foram realizados de acordo com os princípios internacionalmente aceitos do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH). O protocolo foi submetido ao Comitê de Ética e Utilização de Animais (CEUA-UVV) e aprovado pelo mesmo em 03/07/2013, conforme parecer (nº 268/2013).

### 3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA NEFROPATIA POR CONTRASTE

Para indução da NIC foi desenvolvido um modelo experimental com camundongos suíços, baseado no modelo previamente validado em camundongos C57 e ratos, a qual produz de forma confiável a nefropatia de acordo com Billings et al. (2008). Além disso, a via utilizada para indução foi aprimorada, pois foi utilizada a via intraperitoneal ao invés das vias intrapeniana ou a venosa através da punção da veia caudal (Khan et al., 2013)

### 3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Conforme apresentado na figura 5, foram eleitos seis grupos experimentais: grupo 1: controle (Controle; n=9), grupo 2: nefropatia induzida por contraste (NIC; n=15), grupo 3: N-acetilcisteína 200 mg/Kg (NAC; n=8), grupo 4: *Virola oleifera* 10 mg/Kg (V 10; n=18) e grupo 5: *Virola oleifera* 100 mg/Kg (V 100; n=17), grupo 6: *Virola oleifera* 300 mg/Kg (V 300; n=8). Os camundongos dos grupos V 10, V 100 e V 300 receberam a resina de *Virola oleifera* por gavagem por 5 dias consecutivos. A resina liofilizada era reconstituída em água deionizada nas concentrações de 2mg/ml para ser usada no grupo *Virola oleifera* 10 mg/Kg, 20mg/ml para ser usada no grupo *Virola oleifera* 100 mg/Kg e 60mg/ml para ser usada no grupo *Virola oleifera* 300 mg/Kg. Permitindo assim, um volume por gavagem máximo de 200µl. Da mesma forma, o grupo NAC recebeu a N-acetilcisteína através de gavagem por 5 dias consecutivos com a concentração de 100mg/ml (Fluimucil® injetável, n-acetilcisteína 10% Zambon, SP, Brasil). Finalmente, os grupos controle e NIC (grupos 1 e 2) receberam veículo (água deionizada) por gavagem. Após o 5º dia, todos os grupos foram privados de água por 20 h e a partir deste período foi induzida a nefropatia. O procedimento de NIC em camundongos foi adaptado a partir de protocolos previamente validados em camundongos por Lee et al. (2006) e Billings et al. (2008).



**Figura 9.** Esquema de tratamento dos grupos experimentais. NIC: nefropatia induzida por contraste. NAC: n-acetilcisteína.

### 3.5 INDUÇÃO DA NEFROPATIA POR CONTRASTE

A nefropatia por contraste foi induzida com associação de três substâncias administradas: 1) indometacina, um inibidor da cicloxigenase (10 mg/kg intraperitoneal., dissolvido em dimetilsufóxido), 2) L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, (10 mg/kg intraperitoneal, dissolvido em água deionizada) e após 15 minutos, 3) o radiocontraste iohexol, monomérico e de baixa osmolaridade (Omnipaque<sup>®</sup>, 1,5 g de iodo/kg intraperitoneal). Apenas os camundongos do grupo controle não receberam nenhuma intervenção, resguardando apenas o tempo necessário para a eutanásia.

Concluída a etapa das administrações dos fármacos que contribuem para a NIC, os animais voltaram a ter acesso à água e comida imediatamente após a indução da nefropatia por contraste. Após 24h foram eutanasiados com

pentobarbital sódico (Cristália, São Paulo, Brasil, de 200 mg/kg, ip) submetidos a incisão laparoscópica tóraco-abdominal para a coleta do sangue através da punção por agulha no átrio direito e coletado cerca de 700µl de sangue, que foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos para a coleta do soro para dosagens de creatinina e ureia.

Logo após a coleta do sangue, os rins foram perfundidos com 3 mL de solução tampão fosfato (PBS, pH 7.4, 0.1 mol/L) através de punção no ventrículo esquerdo e em seguida os rins foram excisados e separados aleatoriamente para: 1) microscopia óptica (coloração em hematoxilina e eosina – HE. mantidos em solução de formaldeído a 10%) e microscopia eletrônica de varredura (MEV – mantidos em glutaraldeído 2,5% + folmaldeído 2%); 2) avaliação de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP - mantidos em PBS resfriados a -20°C); 3) extração de células para análise do estresse oxidativo, índice de apoptose e viabilidade de células do córtex e medula renal através da citometria de fluxo (mantidos em PBS resfriados a -20°C).

### 3.6 PRODUTOS NITROGENADOS DO SORO (UREIA E CREATININA)

Após a coleta do sangue dos animais os microtubos eram identificados, separados por grupos e centrifugados a 3000 g por 10 minutos (centrífuga de bancada) para obtenção do soro. As dosagens de creatinina e ureia foram obtidas do soro através de analisador de espectrofotometria automático (Billings et al., 2008; Gomes et al., 2014).

### 3.7 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DO TECIDO RENAL

Após a eutanásia, os rins foram excisados e mantidos resfriados em solução PBS onde foram separados os tecidos do córtex e da medula. Cada amostra de córtex e medula foram colocados em tubos Falcon de 15 mL e acrescidos de 1 mL de solução enzimática de colagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, esses tubos foram mantidos em estufa a 37° C

sob agitação por 30 minutos. Logo após, a suspensão de células foi filtrada através de uma membrana de nylon Falcon de 70 µm (Becton Dickinson, San José, CA, EUA) para remover os detritos celulares. Esse filtrado contendo as células foi submetido à centrifugação (Equipamento – Eppendorf 5702) por 10 minutos a 1200rpm (rotações por minuto). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de células ressuspense em 1mL de PBS para lavar o excesso de gradiente. Este processo de centrifugação foi repetido mais duas vezes. Na terceira centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas com solução de armazenamento em soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mantidas em freezer a -20° C por 24h e seguida por armazenamento em ultrafreezer a -80° C para posterior análise em citômetro de fluxo.

### 3.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Neste experimento, foi utilizado o citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) acoplado a um computador. Onde foram adquiridos 30.000 eventos de cada amostra (10.000 eventos em triplicata) e os dados coletados foram analisados pelos *softwares* BDFACSDiva e FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). As células foram analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas, tais como tamanho e complexidade interna ou granulosidade e intensidade de fluorescência a qual é proporcional à quantidade de marcação pela sonda fluorescente utilizada, diclorofluoresceína (DCFH-DA), dihidroetídeo (DHE), por hidroxifenilfluoresceína (HPF), anexina V (FITC) e iodeto de propídeo (PI). As bolhas de ar foram retiradas do sistema fluídico do citometro de fluxo para evitar a aquisição de erros nas leituras das amostras. E antes de adquirir as amostras, foi utilizado o reagente CS&T (Cytometer Setup and Tracking; Becton Dickinson, San José, CA, EUA) para ajustar as voltagens dos tubos fotomultiplicadores e avaliar suas sensibilidades. Este reagente é utilizado para manutenção do padrão de qualidade das leituras e permite a reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo citômetro. Além disso, após cada aquisição, foi realizada a limpeza do tubo de injeção de amostra (SIT: Sample

Injection Tube), pois poderia haver pequenas quantidades de fragmentos residuais de células no interior do circuito que poderiam contaminar a próxima amostra a ser processada.

Para todos os protocolos de citometria de fluxo, as células foram visualizadas em gráfico de pontos (*dot plot*) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho ou volume relativo (FSC) e granulosidade ou complexidade interna (SSC), em escala linear, para identificação das populações celulares e exclusão de debris. Seguida da realização de um *gate* eletrônico único em torno das células de interesse para excluir células inviáveis da região analisada. Além disso, foram feitos histogramas e *dot plots* para análise em escala logarítmica de cada marcador fluorescente utilizado em cada protocolo.

Os valores referentes à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelas células analisadas conforme outros trabalhos prévios (Tonini et al., 2013; Dias et al., 2014). E utilizou-se a porcentagem de células positivas para a proteína Annexina V e o corante vital iodeto de propídio (PI) para a avaliação de apoptose.

### 3.8.1 Funcionamento do citômetro de fluxo

As fluorescências do FITC e do DCFH-DA e HPF foram captadas pelo filtro *bandpass* 530/30 ( $530\pm 15$ ) nm e medidas pelo detector E (octógono). Assim como as fluorescências do PI e do DHE foram captadas pelo filtro *bandpass* 585/42 ( $585\pm 21$ ) nm e medidas pelo detector D (octógono). É importante frisar que os dados de fluorescência foram coletados em escala logarítmica. E nos protocolos em que foram utilizados dois marcadores simultaneamente (no caso da avaliação da apoptose), foi realizada a compensação das fluorescências com o objetivo de minimizar a interferência da luz emitida e captada pelos tubos fotomultiplicadores.

### 3.8.2 Determinação da viabilidade e apoptose (anexina)

A avaliação da viabilidade das células foi realizada pelo iodeto de propídio (PI) por coloração de exclusão. Um total de  $10^6$  células foram incubadas com 2  $\mu$ L de PI durante 5 minutos em ambiente escuro à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e analisadas com um citômetro de fluxo FACS - II Canto (Becton Dickinson, San José, CA, EUA). Para quantificação da viabilidade, as amostras eram adquiridas em triplicada, e 10.000 eventos foram usados para cada medição. As células foram excitadas com um comprimento de onda de 488 nm, e a fluorescência de PI foi detectada utilizando um filtro de *bandpass* 585/42. Os dados são expressos como a porcentagem de células não coradas / viáveis (Rua et al., 2014).

Células renais em apoptose foram quantificadas por anexina V - FITC e PI coloração dupla, usando um kit de anexina V - FITC de detecção de apoptose (Becton Dickinson, San José, CA, EUA). Em resumo, células do córtex e medula foram lavadas duas vezes com PBS, ajustado a 500  $\mu$ l do tampão de ligação ( $5 \times 10^5$  células) . Em seguida, a suspensões de células foram incubadas com anexina V - FITC e PI, durante 15 minutos à temperatura ambiente (25 °C) no escuro. Na sequência, as células foram analisadas por citômetro de fluxo FACSCanto II (BD). As células viáveis coradas positivamente para anexina V (Q2 + Q4) foram consideradas células em apoptose.

Foram retiradas alíquotas de 200 $\mu$ l de células e estas, centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. Em seguida, ressuspendidas em 400 $\mu$ l de tampão *Binding Buffer* 10% (10mmol/L HEPES, NaOH, pH7.4, 140 mmol/L NaCl, 2,5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml. A seguir, 100 $\mu$ l desta solução ( $1 \times 10^5$  células) foram transferidos para um novo tubo, onde receberam 2 $\mu$ l de anexina V-FITC e 2 $\mu$ l de PI. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Para controle positivo foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente às marcações, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1200 rpm e por fim, 400 $\mu$ l de PBS com 10% de Soro Fetal Bovino foram adicionados a cada tubo e as amostras analisadas no citômetro de fluxo. Este ensaio determina a proporção de células vivas (anexina V<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com conseqüente marcação com a anexina V

(anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). O resultado é um gráfico de *dot plot* com quadrantes Q1, Q2, Q3, Q4 sendo, Q1: positiva apenas para PI<sup>-</sup> células com dano; Q2: Apoptose (positiva para Anexina e PI); Q3: células viáveis (negativa para Anexina e PI); Q4: apoptose precoce (Positiva para Anexina e negativa para PI). Para cálculo da taxa de apoptose total foram somados quadrantes Q2+Q4. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software DIVA e FCS Express 4 Flow Research Edition.

### **3.8.3 Medida do estresse oxidativo pela determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DHE, DCF e HPF)**

A análise de ROS foi realizada por citometria de fluxo, como previamente descrito (Tonini et al, 2013). Foram adicionados à suspensão de células (10<sup>6</sup> células) Dihydroethidium (DHE, 160 µM) e 2', 7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCF, 20 mM) e incubadas a 37 °C durante 30 min, no escuro, para estimar a concentração intracelular •O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. Espécies de oxigênio altamente reativas (hROS), tais como o radical hidroxilo e peroxinitrito, foram detectados selectivamente por 2- [6-(4'-hidroxi) fenoxi-3H-xanten-3-em-9-il] benzóico (HPF, 10 µM) como concebido e descrito por Setsukinai et al., (2003).

As células foram então lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citômetro de fluxo (FACSCanto II). Os dados foram adquiridos utilizando software FACSDiva (BD) e a sobreposição histogramas foram analisados por meio de teste de software FCS Express (De Novo). Para a quantificação de fluorescência de DHE, DCF e HPF, as amostras foram adquiridas em duplicada e foram utilizados 10.000 eventos para cada medição. As células foram excitadas a 488 nm, a fluorescência DHE foi detectada usando o filtro de banda 585/42 e a fluorescência DCF/HPF foram detectadas utilizando filtro bandpass 530/30 e os dados foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI, in a.u.). Todos os protocolos de citometria de fluxo foram realizados no

laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

### 3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

#### 3.9.1 Microscopia óptica

Os rins dos animais foram removidos após eutanásia e fixados em solução de formol tamponado 10%. Logo após o emblocamento em parafina foram cortadas em secções de 4  $\mu\text{m}$  e coradas com hematoxilina-eosina (HE) (Heyman et al., 2010; Lee et al., 2006). A lesão túbulo-intersticial, caracterizada por atrofia tubular, espessamento da membrana basal e dilatação, foi avaliada pelo índice de lesão túbulo intersticial (TILI), é uma análise semiquantitativa de trinta campos corticais e medulares de cada animal com um aumento de X400 e classificado em graus de 0-4: grau 0, sem lesão túbulo-intersticial; grau 1, <25% de lesão túbulo-intersticial; grau 2, 25-50% de lesão túbulo-intersticial; grau 3, 51-75% e grau 4, 76- 100% de lesão túbulo-intersticial. Sendo todos avaliados de maneira cega (Liu, et al., 2013). Essas análises foram feitas nos laboratórios do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Vila Velha e nos laboratórios de microscopia óptica do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES).

#### 3.9.2 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras típicas dos rins dos camundongos dos grupos controle, NIC, NAC, V 10, V 100 e V 300 foram fixadas (glutaraldeído 2,5% + folmaldeído 2%) em solução tamponada (Cacodilato 0,1mol/L) por 24 horas e posteriormente lavadas em tampão Cacodilato (0,1 mol/L; pH 7,2-7,4) para a etapa de pós-fixação em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e Tetróxido de Ósmio 1,0% tamponadas (Cacodilato 0,1mol/L) por uma hora a temperatura ambiente. Após a etapa de pós-fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão cacodilato 0,1M. Para a criofratura, seguiu se então a etapa

de infiltração com glicerol, que tem por finalidade evitar a formação de cristais de gelo na amostra. O glicerol 30% foi adicionado no recipiente que continha a amostra em solução tampão lentamente em intervalos de 5 minutos até que esse recipiente alcançasse a concentração de 15% de glicerol, após isso esta solução foi removida e substituída por solução de glicerol 30% em tampão cacodilato 0,1M onde permaneceu por 2 horas. As amostras foram congeladas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e fraturadas utilizando uma pinça previamente resfriada. As fraturas dos rins foram lavadas com solução tampão cacodilato e água “miliQ”, seguido da desidratação em diferentes concentrações de etanol e levadas para secagem em ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis) e posterior cobertura de ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum) para visualização em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, do Departamento de Morfologia da UFES.

### 3.10 PRODUTOS AVANÇADOS DE PROTEÍNA OXIDADA (AOPP)

Foi utilizado o método de acordo com Witko-Sarsat e colaboradores (1996) para avaliar o conteúdo de produtos avançados de proteína oxidada (AOPP). Durante o estresse oxidativo são criadas as AOPP, e foram analisadas em comparação às reações de agentes oxidantes clorinados como as cloraminas. Para esse fim, os níveis de AOPP no tecido renal foram determinados por meio de um método que consiste na utilização de 200 $\mu\text{L}$  de homogenato de tecido renal obtido por uma mistura de 40  $\mu\text{L}$  de tecido renal e 160  $\mu\text{L}$  de PBS. Foi diluído em 1:5 de PBS, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de 1,16 M KI em cada tubo. Logo após, adicionado 20  $\mu\text{L}$  de ácido acético (ultrapuro), essas adições foram feitas diretamente em microplaca de fundo chato, a qual foi agitada por seis minutos antes da leitura. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 340 nm contra o branco contendo 200 $\mu\text{L}$  de PBS, 20 $\mu\text{L}$  de ácido acético e 10 $\mu\text{L}$  de KI. A quantidade de AOPP foi calculada baseando-se em uma curva padrão de 0 a 100  $\mu\text{M}$  realizada com equivalentes de cloramina T. Os resultados são expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de cloramina T/mg proteína (Matteucci et al., 2001).

É necessário fazer uma relação entre a quantidade de AOOP e a de proteínas contidas em cada amostra. Esta quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Onde foi necessário a diluição de 1:10 das amostras para a realização desta medição. Este protocolo foi realizado nos laboratórios do programa de pós graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Vila Velha.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão expressos como a média  $\pm$  EPM. A citometria de fluxo de dados de produção de ROS são expressos como o coeficiente médio de duas medições repetidas e estatisticamente reprodutíveis de pelo menos 5 animais independentes (o teste de Friedman). A análise estatística foi realizada por análise unidireccional da variância (ANOVA) utilizando o software Prism (6 Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Quando a ANOVA mostrou diferenças significativas, o teste de Tukey foi usado como uma análise *post hoc*. As variáveis categóricas são apresentadas como freqüências e foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ( $X^2$ ) ou teste exato de Fisher, quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DA RESINA DE *Virola oleifera* NA ATENUAÇÃO DA DISFUNÇÃO RENAL DA NIC EM CAMUNDONGOS

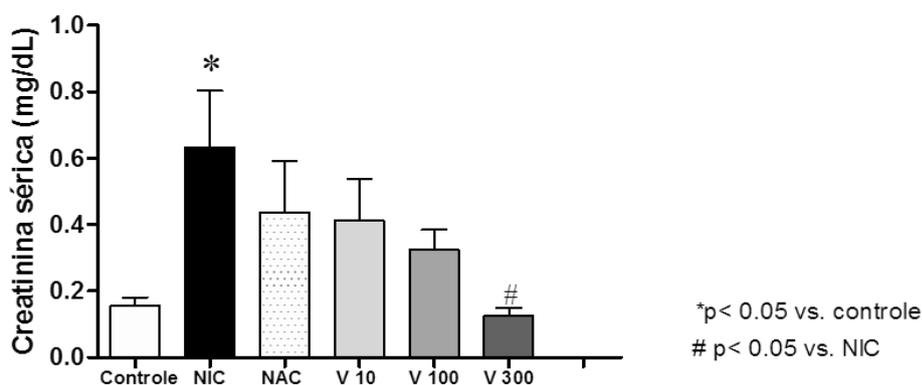
A Tabela 2 resume os valores médios dos parâmetros como o número de mortes por grupo e índices bioquímicos da função renal. O modelo experimental de NIC em camundongos apresentou 40% de mortes por grupo ( $p < 0,05$  em relação ao controle), enquanto que o tratamento convencional com NAC mostrou 25%. Curiosamente, a RV reduziu o número de mortes por grupo de uma forma dependente da dose, mantendo vivos aproximadamente 90% dos animais tratados com a dose mais elevada. Através dos parâmetros bioquímicos, o grupo NIC exibiu concentrações plasmáticas significativamente elevadas de ureia e de creatinina (~ 4 vezes) em comparação com animais controle ( $66 \pm 2$  e  $0,16 \pm 0,03$  mg /dL, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Interessantemente, a RV mostrou um decréscimo na azotemia de forma dose-dependente, reduzindo significativamente apenas na dose mais elevada (V300:  $136 \pm 22$  e  $0,12 \pm 0,03$  mg / dL, respectivamente,  $p < 0,05$ ), sendo, portanto, mais eficaz do que o tratamento convencional com NAC ( $250 \pm 50$  e  $0,44 \pm 0,15$  mg/dL).

**Tabela 2** – Resumo de resultados de mortes por grupo, ureia plasmática, creatinina sérica, viabilidade de células corticais e medulares. Valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n=6$  a 13 animais por grupo. **NIC**=grupo nefropatia induzida por contraste; **NAC**=grupo n-acetilcisteína (200mg/kg); **V10**=grupo *Virola oleifera* 10 mg/kg; **V100**=grupo *Virola oleifera* 100 mg/kg. **V300**=grupo *Virola oleifera* 300 mg/kg. \*  $p < 0,05$  vs controle. #  $p < 0,05$  vs NIC.

Parâmetros	Controle (n=9)	NIC (n=9)	NAC (n=6)	V 10 (n=10)	V 100 (n=13)	V 300 (n=7)	P
Peso (g)	$37 \pm 2$	$40 \pm 1$	$38 \pm 1$	$37 \pm 1$	$38 \pm 1$	$40 \pm 2$	0.65
Número de mortes por grupo	0%	40%*	25%	44%*	23%	12%	0.01
Ureia plasmática (mg/dL)	$66 \pm 2$	$259 \pm 31^*$	$250 \pm 50^*$	$244 \pm 33^*$	$209 \pm 34^*$	$136 \pm 22$	<0.0001

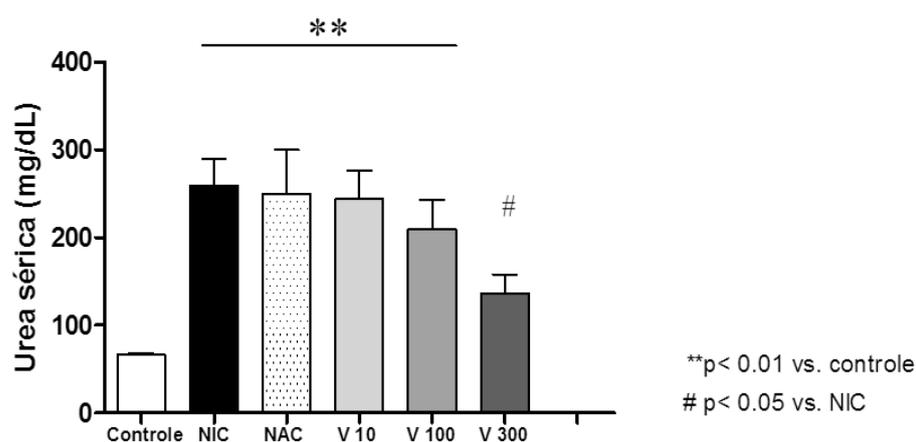
Creatinina sérica (mg/dL)	0.16±0.03	0.63±0.17*	0.44±0.15	0.41±0.13	0.32±0.06	0.12±0.03#	<0.005
Viabilidade de células corticais (%)	98.0 ± 0.1	96.6 ± 0.3*	97.2 ± 0.3	96.7 ± 0.5	97.9 ± 0.2	98.3 ± 0.3#	0.0002
Viabilidade de células medulares (%)	98.5 ± 0.2	96.2 ± 0.3*	96.9 ± 0.4	95.3 ± 0.6*	97.6 ± 0.3	98.5 ± 0.3#	<0.0001

A figura 10 destaca o comportamento dos valores de creatinina quantificados nos grupos NIC, controle, NAC, V 10, V 100 e V 300. Foi observado um aumento de creatinina no grupo NIC em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e queda nos níveis de creatinina proporcionais ao aumento da dose de RV nos grupos tratados, mostrando um perfil dose-dependente. Inclusive, a dose de 300 mg/Kg mostrou o restabelecimento da creatininemia comparado aos animais controle.



**Figura 10-** Valores de creatinina dosados nos grupos nefropatia induzida por contraste (NIC), controle, N-acetilcisteína 200 mg/kg (NAC), *Virola oleifera* 10 mg/kg (V10), *Virola oleifera* 100 mg/kg, (V100) e , *Virola oleifera* 300 mg/kg (V300). Valores são apresentados como média ±EPM. \*p < 0,05 vs. controle #p < 0,05vs. NIC.

A figura 11 apresenta valores de ureia quantificados nos grupos NIC, controle, NAC, V 10, V 100 e V 300. Foi observado aumento nos níveis de ureia nos grupos que receberam meio de contraste em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) e queda nos valores de ureia dos grupos tratados com RV de maneira dose-dependente. Novamente, o grupo que tratado com 300 mg/kg de RV apresentou a maior redução dos níveis urêmicos em relação ao grupo NIC ( $p < 0,05$ ).



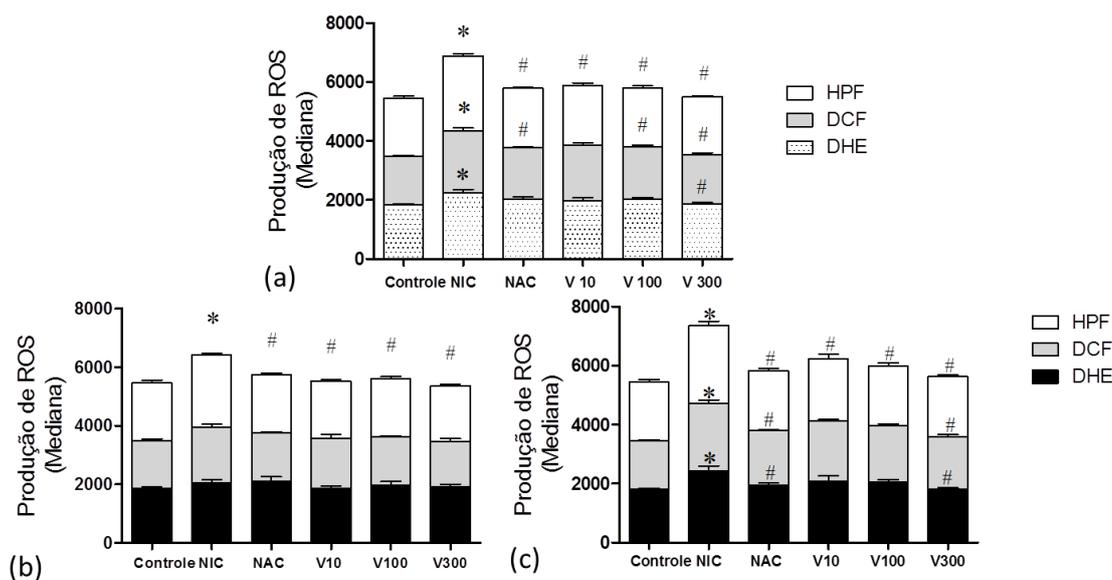
**Figura 11-** Valores de ureia dosados nos grupos nefropatia induzida por contraste (NIC), controle, N-acetilcisteína 200 mg/kg (NAC), *Virola oleifera* 10 mg/kg (V 10), *Virola oleifera* 100 mg/kg, (V 100) e , *Virola oleifera* 300 mg/kg (V 300). Valores são apresentados como media  $\pm$ EPM. \*p < 0,05 vs. controle #p < 0,05 vs. NIC.

Ainda referente à tabela 2, a viabilidade das células renais foi menor nas células corticais e medulares do grupo NIC quando comparado com o grupo controle (NIC:  $96,6 \pm 0,3$  e  $96,2 \pm 0,3$  vs. Controle:  $98,0 \pm 0,1$  e  $98,5 \pm 0,2\%$ , p < 0,05 respectivamente). Interessantemente, apenas a dose mais elevada de RV (V300) restabeleceu a viabilidade celular às condições normais (córtex:  $98,3 \pm 0,3$  e medula:  $98,5 \pm 0,3\%$ , p < 0,05), novamente, mostrando-se mais eficaz que o tratamento padrão com NAC.

## 4.2 PRODUÇÃO DE ROS

Conforme resumido nos gráficos de barras da Figura 12, foram utilizados através da citometria de fluxo as abordagens de DHE, DCF e HPF para quantificar a produção de  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\bullet\text{ONOO}^- / \bullet\text{OH}^-$ , respectivamente, que são relatados como a intensidade média de fluorescência (IMF, in a.u.). Como esperado, observou-se um aumento notável na produção de ROS no grupo NIC, especialmente na medula (DHE: 34%, DCF: 40%, HPF: 32%) quando comparado com controle (DHE:  $1808 \pm 34$ , DCF:  $1633 \pm 45$ , HPF:  $1996 \pm 86$  a.u., p < 0.05). No córtex, houve diferença apenas na produção  $\bullet\text{ONOO}^- / \bullet\text{OH}^-$  (+ 25%), quando comparado com os camundongos de controle ( $1965 \pm 102$

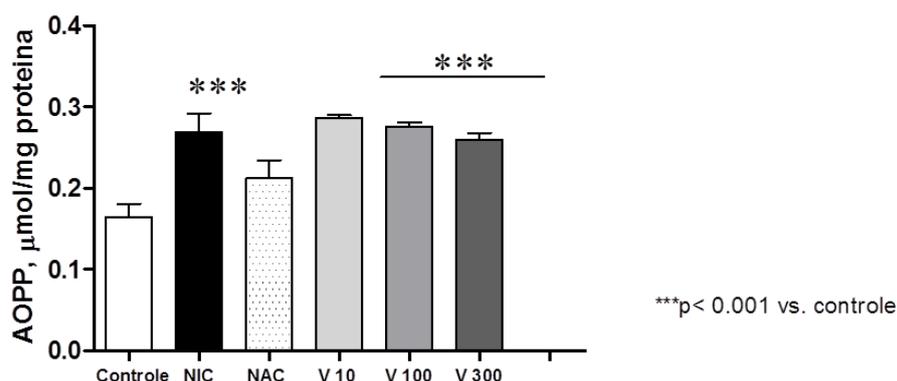
a.u.,  $p < 0.05$ ). Com base em experiências anteriores que mostram que a proteção das células tubulares renais contra o estresse oxidativo é uma via importante para evitar a nefropatia por radiocontraste (Itoh et al., 2005; Pattharanitima e Tasanarong, 2014), foram avaliados os níveis de ROS intracelulares em tecidos do córtex e medula renais em todos os grupos de animais tratados. Curiosamente, a dose mais elevada de RV (V300) restaurou para níveis basais os três tipos de ROS medidos na medula (DHE:  $1802 \pm 52$ , DCF:  $1782 \pm 75$ , HPF:  $2041 \pm 57$  a.u.,  $p < 0,05$ ), bem como tratamento convencional com NAC (DHE:  $1947 \pm 86$ , DCF:  $1840 \pm 45$ , HPF:  $2035 \pm 65$  a.u.,  $p < 0,05$ ). No tecido do córtex renal, observou-se um pequeno benefício em estresse oxidativo apenas na produção de  $\bullet\text{ONOO}^- / \bullet\text{OH}^-$  no grupo de tratamento convencional com NAC, bem como em todos os grupos tratados com as diferentes doses de RV.



**Figura 12-** Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). (a) Gráfico representativo de citometria de fluxo, usando dihidroetídio (DHE), diclorodihidrofluoresceína (DCF) e hidroclorofluoresceína (HPF), em células do tecido renal de camundongos dos grupos controle, NIC, NAC, V 10, V 100 e V 300. (b) Gráfico representativo de citometria de fluxo, usando DHE, DCF e HPF, somente em células do córtex renal de camundongos de todos os grupos. (c) Gráfico representativo de citometria de fluxo, usando DHE, DCF e HPF somente em células da medula renal de camundongos de todos os grupos. Assim, podemos verificar que há uma maior produção de ROS na medula em comparação com o córtex renal. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. **NIC**=grupo nefropatia induzida por contraste; **NAC**=grupo n-acetilcisteína (200mg/kg); **V10**=grupo *Virola oleifera* 10 mg/kg; **V100**=grupo *Virola oleifera* 100 mg/kg. **V300**=grupo *Virola oleifera* 300 mg/kg. \*  $p < 0,05$  vs controle. #  $p < 0,05$  vs NIC.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE AOPP NO TECIDO RENAL

Uma das maneiras de estimar o grau de dano mediado pela oxidação proteica de forma indireta no tecido renal é investigar a presença de produtos avançados de proteína oxidada (AOPP). Não foi possível demonstrar a atenuação do dano oxidativo do radiocontraste com o tratamento de RV com esta técnica (figura 13).



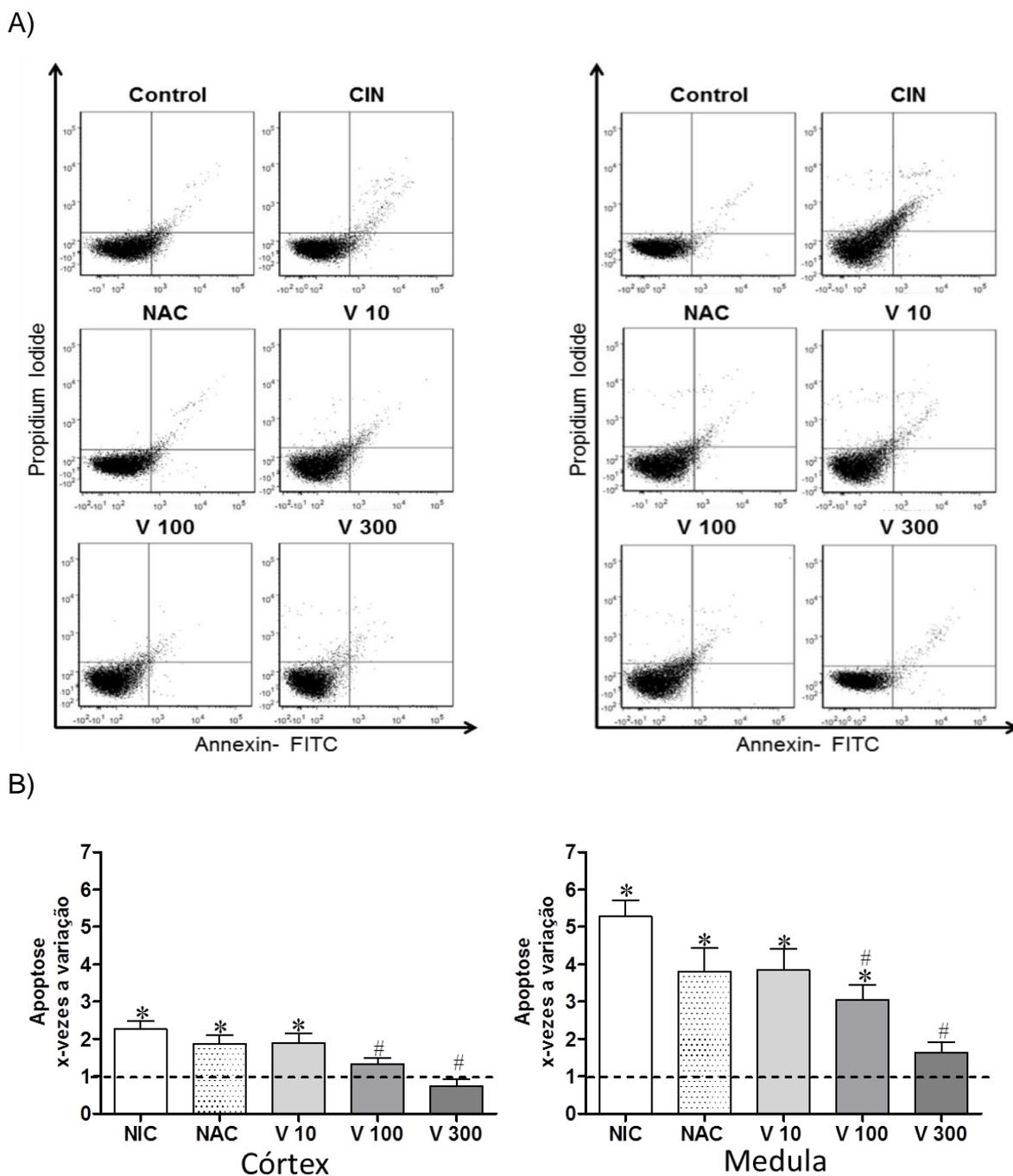
**Figura 13-** Quantificação de produtos avançados de proteína oxidada (AOPP). Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em tecido renal de animais dos grupos controle, NIC, NAC, V10, V 100 e V 300. Os valores estão corrigidos com Bradford e expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*\* p < 0,001 vs. controle. **NIC**=grupo nefropatia induzida por contraste; **NAC**=grupo n-acetilcisteína (200mg/kg); **V10**=grupo *Virola oleifera* 10 mg/kg; **V100**=grupo *Virola oleifera* 100 mg/kg. **V300**=grupo *Virola oleifera* 300 mg/kg.

### 4.4 APOPTOSE

Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V conjugada a um fluorocromo. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são capazes de excluir o corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para

permitir a identificação de células em estágio inicial de apoptose. O PI penetra em células, nas quais há perda da integridade da membrana celular, enquanto que células marcadas apenas com Anexina V-FITC indicam morte apoptótica. Já as células marcadas com ambos os fluorocromos representam a porcentagem de células nos estágios finais de apoptose.

A Figura 14 mostra gráficos representativos para cada grupo de pontos, percentual médio de células apoptóticas e em número de vezes a quantidade de células em apoptose em relação ao controle. Foi observado um claro aumento no número de células por apoptose (Q2 + Q4) no grupo NIC (medula: ~ 5 vezes; córtex: ~ 2 vezes) em comparação com os camundongos controle (medula:  $0,6 \pm 0,1\%$ ; córtex:  $1,2 \pm 0,1\%$  ,  $p < 0,05$ ). Em adição ao efeito antioxidante, as doses de RV mostraram efeito anti-apoptótico de uma maneira dose dependente tanto na medula renal (V10: ~ 4 vezes, V100: ~ 3 vezes e V300: ~ 2 vezes) quanto no tecido cortical (V10: ~ de 2 vezes; V100: ~ 1,5 vezes e V300: ~ 1 vezes). Convém frisar que as doses de V100 e V300 mostraram uma redução de apoptose quando comparado com o grupo NIC ( $p < 0,05$ ). Finalmente, quando comparado ao tratamento convencional, a dose V300 foi melhor que o grupo NAC (medula: ~ 4 vezes e córtex: ~ 2 vezes,  $p < 0,05$ ).

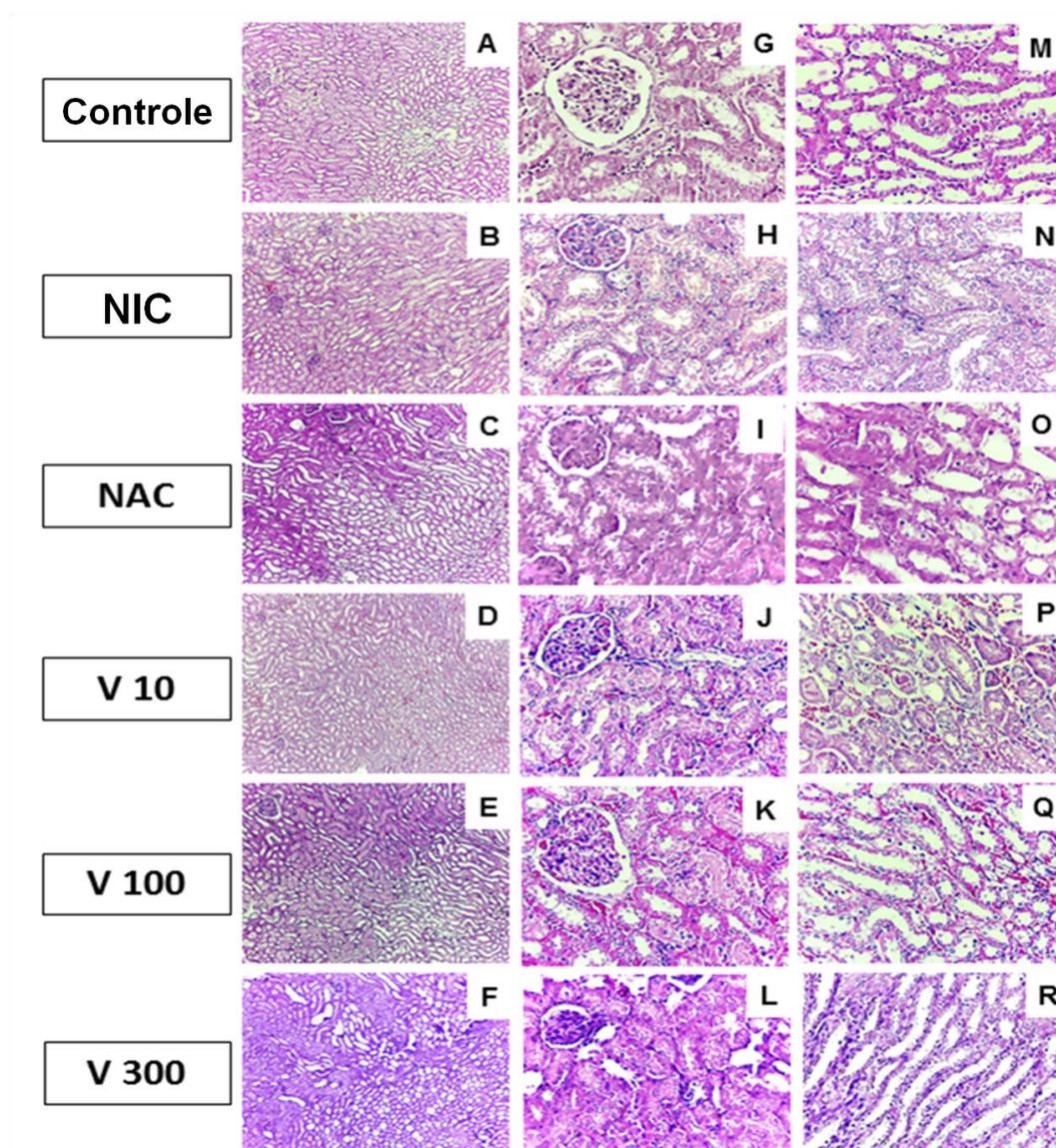


**Figura 14-** Análise da apoptose por citometria de fluxo. Gráficos *dot plot* típicos, mostrando dados de apoptose comparando células do córtex e da medula renais dos grupos controle, NIC, NAC, V 10, V 100 e V 300. (A) córtex (esquerda) e medula (direita), usando iodeto de propídeo (PI) e anexina V. Quadrante 1 (Q1) representa células inviáveis (PI positivo e anexina negativo). Quadrante 2 (Q2) representa as células em apoptose tardia, ou necrose (PI e anexina positivos). Quadrante 3 (Q3) representa as células viáveis, isto é estas células são PI e anexina negativas. Quadrante 4 (Q4) representa células em apoptose precoce (anexina positiva e PI negativa). (B) Análise de apoptose em número de vezes em relação ao controle (linha tracejada). **NIC**=grupo nefropatia induzida por contraste; **NAC**=grupo n-acetilcisteína (200mg/kg); **V10**=grupo *Virola oleifera* 10 mg/kg; **V100**=grupo *Virola oleifera* 100 mg/kg.

**V300**=grupo *Viola oleifera* 300 mg/kg. . Os valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*Aumento no número de células por apoptose em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ). # Doses que mostraram redução de apoptose quando comparado com o grupo NIC ( $p < 0,05$ ).

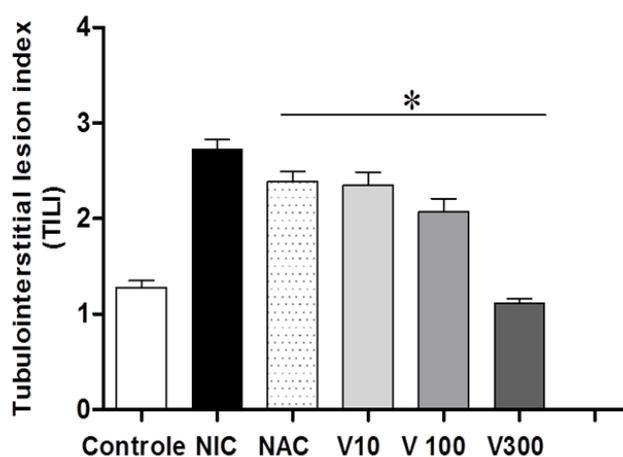
#### 4.5 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS RENAIIS

Na Figura 15, estão evidenciadas as imagens da avaliação histológica dos rins demonstraram que o grupo NIC exibiu alterações notáveis na arquitetura tubular renal típica como o aumento da descamação de células epiteliais, dilatação tubular e lesões tubulointersticiais (2 vezes) quando comparados com camundongos controle (NIC: controle  $2,7 \pm 0,11$  vs:  $1,3 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ). Curiosamente, a RV reduziu significativamente as lesões apenas por meio da dose mais elevada (V300:  $1,1 \pm 0,04$ ,  $p < 0,05$ ). Nem o tratamento com NAC ( $2,4 \pm 0,11$ ) ou com doses mais baixas de RV foram capazes de proteger contra a lesão tubular aguda (V10:  $2,4 \pm 0,13$ ; V100:  $2,0 \pm 0,14$ ).



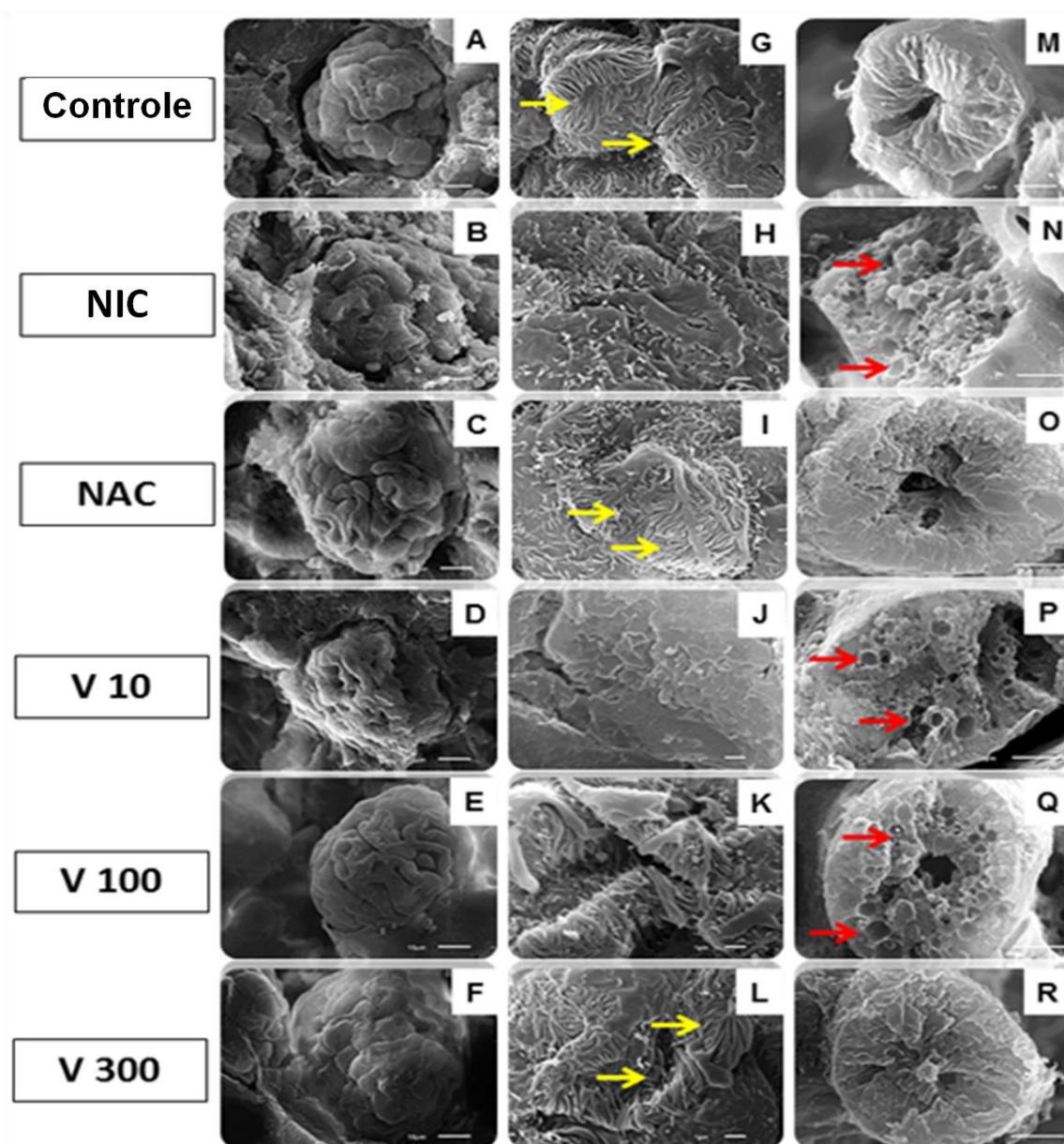
**Figura 15** - Imagens típicas das lâminas de tecido renal coradas em HE. Coluna 1 (A, B, C, D, E e F) Imagens incluindo as regiões cortical e medular em aumento de 100x; Coluna 2 (G, H, I, J, K, e L) Imagens com detalhes da região cortical com magnificação de 400x; Coluna 3 (M, N, O, P, Q, e R) Imagens com detalhes da região medular também com magnificação de 400x. **HE**=hematoxilina e eosina; **NIC**=grupo nefropatia induzida por contraste; **NAC**=grupo n-acetilcisteína (200mg/kg); **V10**=grupo *Virola oleifera* 10 mg/kg; **V100**=grupo *Virola oleifera* 100 mg/kg. **V300**=grupo *Virola oleifera* 300 mg/kg.

A figura 16 apresenta os valores do índice de lesão túbulo intersticial (TILI), comportando-se de forma dose-dependente nos grupos tratados com RV. Demonstrando a grande redução do TILI no grupo V 300 em relação ao grupo NIC ( $p < 0,001$ ), levando a alcançar novamente valores basais.



**Figura 16-** Quantificação do índice de lesão túbulo intersticial (TILI). Valores expressos como média  $\pm$ EPM. **NIC**=grupo nefropatia induzida por contraste; **NAC**=grupo n-acetilcisteína (200mg/kg); **V10**=grupo *Virola oleifera* 10 mg/kg; **V100**=grupo *Virola oleifera* 100 mg/kg. **V300**=grupo *Virola oleifera* 300 mg/kg; Os valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*p <0,0001 vs NIC.

A Figura 17 mostra microfotografias típicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tecido renal contendo imagens de glomérulos e túbulos e detalhes de maior aumento das fendas de filtração dos capilares glomerulares e da região transversal de túbulos renais. No grupo controle a arquitetura glomerular, as fendas de filtração e os túbulos apresentavam-se com aspecto normal. No grupo NIC, corroborando os resultados bioquímicos e de estresse oxidativo por citometria de fluxo, foram encontrados glomérulos alterados com áreas de fusão podocitária, com os prolongamentos secundários dos pedicelos se desprendendo da superfície do capilar, deformando a arquitetura das fendas de filtração glomerular. Seus túbulos possuíam células repletas de vacúolos, alterando a anatomia tubular e justificando a disfunção tubular confirmada pela azotemia. Nos animais do grupo V 10, V 100 e V 300, a lesão gerada pelo contraste iodado foi minimizada de acordo com o aumento das concentrações de RV, de forma dose dependente. Esses achados confirmam os resultados obtidos em nossos protocolos anteriores. Curiosamente, apenas os grupos NAC e V300 mostraram atenuação da lesão induzida por contraste iodado tanto nos podócitos glomerulares quanto nas células tubulares.



**Figura 17-** Microfotografias de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tecido renal de camundongos. Na coluna 1 (A - F) Imagem típica de glomérulos em aumento de 1500x. Na coluna 2 (G - L) imagens de detalhes dos capilares glomerulares evidenciando as fendas de filtração (setas amarelas) em aumento de 10000x. Na coluna 3 (M - R) detalhes de túbulos com aumento de 5000x. Imagens mostram a vacuolização gerada pelo contraste iodado às células tubulares (setas vermelhas). **NIC**=grupo nefropatia induzida por contraste; **NAC**=grupo n-acetilcisteína (200mg/kg); **V10**=grupo *Virola oleifera* 10 mg/kg; **V100**=grupo *Virola oleifera* 100 mg/kg. **V300**=grupo *Virola oleifera* 300 mg/kg.

## 5. DISCUSSÃO

---

O presente estudo é o primeiro trabalho que investiga os efeitos da RV na função e na estrutura renal submetida ao estresse oxidativo gerado pela nefrotoxicidade induzida por radiocontraste em camundongos. Observou-se que a maior dose de RV (V300 - 300mg/kg) possui um efeito protetor no desenvolvimento de disfunção renal e melhora a lesão por estresse oxidativo em camundongos submetidos à NIC através de marcadores bioquímicos e por análise do estresse oxidativo, índice de apoptose e viabilidade de células renais através da citometria de fluxo. Além disso, RV diminuiu acentuadamente a incidência de lesões glomerulares e tubulares renais, como mostrado por análise histológica.

O desenvolvimento de novas substâncias renoprotetoras candidatas para a prevenção de NIC tem sido dificultado pela falta de um modelo experimental reprodutível e simples de nefropatia por contraste. Sabe-se que os animais murinos (assim como os seres humanos saudáveis) são resistentes a nefropatia induzida por contraste (Khan et al., 2013). Desta forma, até o desenvolvimento do presente estudo, eram utilizados modelos experimentais padronizados com ratos wistar ou camundongos C57, os quais são úteis para desenvolvimento de modelos transgênicos e “knockout”. Apesar dessa vantagem do ponto de vista biotecnológico, suas ninhadas são em média compostas por 6 a 8 crias, muito menor que as dos camundongos suíços (10 a 20 crias) (Ku et al., 2003), incrementando assim o custo das pesquisas com esses animais mais difícil reprodução.

Em nosso modelo de camundongos, foram administradas meio de contraste em dose compatíveis com as do uso clínico em humanos (1,5 g / kg de iodo na prática angiográfica de rotina). Adicionalmente, foram utilizados inibidores das prostaglandinas e NO-sintase, a fim de mimetizar condições clínicas que predisõem a NIC, aumentando o estresse hipóxico medular, e como consequência, levando a uma diminuição da função renal (Agmon et al., 1994; Itoh et al, 2005; Lee et al., 2006; Kongkham et al., 2013). Interessantemente, observou-se um aumento das concentrações de ureia e creatinina sérica em grupo NIC, confirmando assim o sucesso sem precedentes da NIC no modelo de camundongos suíços, mas não em

camundongos induzidos pela NIC suplementadas com a maior dose de RV (V300 - 300mg/kg). É implícito que o tratamento V300 impede a disfunção renal causada pelos meios de contraste iodado e, conseqüentemente, melhora as taxas de sobrevivência de um modo dependente da dose. Estudos anteriores demonstraram que as estratégias convencionais de profilaxia farmacológica para NIC incluem vasodilatadores e / ou agentes antioxidantes, mas até agora com resultados conflitantes em vários ensaios clínicos (Barret et al., 2006; Goldfarb et al., 2009; Gurm et al., 2012.; Kongkham et al., 2013.; Pattharanitima e Tasanarong, 2014). Alternativamente, a NAC (um precursor da glutatona) tem sido utilizada para prevenir o NIC devido à sua propriedade antioxidante associada a um baixo risco de efeitos adversos e de baixo custo (Barret et al., 2006; Goldfarb et al., 2009; Gurm et al., 2012.; Kongkham et al., 2013.; Pattharanitima e Tasanarong, 2014), o que justifica a inclusão deste grupo em nosso estudo como um tratamento padrão. Deve-se notar que a diminuição de azotemia com V300 foi mais pronunciada que no grupo NAC, demonstrando um relevante potencial na proteção contra lesão renal induzida por contraste. Considerando também que o estresse oxidativo é um dos mecanismos-chave subjacentes na patogênese NIC (Andreucci et al., 2014) e que a RV apresenta altas propriedades antioxidantes (Milaneze et al., 2014), decidimos investigar os parâmetros relacionados com o stress oxidativo nos rins de todos os grupos.

Dados recentes demonstraram vários marcadores de estresse oxidativo indiretos na NIC, tais como aumento da peroxidação lipídica (Zager et al., 2003; Kongkham et al., 2013.; Liu et al., 2013), comprometimento na defesa antioxidante (Colbay et al., 2010.; Kongkham et al., 2013) e/ ou por aumentar a síntese de enzimas pró-oxidantes (Zager et al., 2003; Khan et al., 2013). No presente estudo, relatou-se pela primeira vez a superprodução de ROS pelo método direto (usando sondas fluorescentes) (Poljšak et al., 2013) em rins de um modelo experimental de NIC. Portanto, estes resultados destacam duas conclusões importantes. Em primeiro lugar, os nossos dados descrevem a participação de distintos  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e principalmente espécies  $\cdot\text{OONO}^-/\cdot\text{OH}$ , enfatizando assim a importante contribuição do estresse oxidativo no modelo experimental de NIC em camundongos. Especula-se que a preponderância da espécie peroxinitrito pode ser justificada pela sua alta estabilidade, participando diretamente da citotoxicidade durante a lesão (Beckman e Crow, 1993;

Kalyanaraman, 2013; Kwak et al., 2014). Em segundo lugar, Esses dados revelaram que o estresse oxidativo ocorre em todo rim, porém mais intensamente na medula, o local original da NIC devido a hipoperfusão e consequente dano mitocondrial (Persson et al., 2005; Heyman et al., 2008). A diferença de estresse oxidativo entre o córtex e a medula renais pode justificar-se devido ao suprimento sanguíneo se dar de forma distinta em cada uma dessas regiões. Pois a região medular recebe seu aporte nutricional única e exclusivamente através da *vasa recta* - ramo arterial originado das arteríolas eferentes. As quais recebem esta denominação por seguirem uma trajetória retilínea e descendente do córtex até as porções mais profundas da medula renal. Assim, devido ao meio de contraste diminuir a TFG e provocar disfunção endotelial (Santos, 2011), promove vasoconstricção da arteríola eferente, aumentando por conseguinte, o estresse oxidativo medular devido à hipóxia medular.

Outro novo achado do presente estudo é que a RV (V300) aboliu a diferença na produção de ROS observada entre o grupo controle e NIC, tão bem quanto o efeito antioxidante do tratamento padrão NAC. Assim, este efeito anti-ROS observado por V300 corrobora com a nossa análise antioxidante in vitro (DPPH•) e com outros estudos recentes que têm associado nefroproteção à presença de compostos fenólicos (Karami et al, 2014.; Domitrović et al, 2014) e compostos flavonóides (Gomes et al, 2014.; Kinaci et al., 2012), que também são abundantes na resina do presente estudo (Milaneze et al., 2014).

Paradoxalmente, os resultados obtidos com a AOPP divergiram dos demais encontrados pelas análises bioquímicas, morfométricas (HE e MEV) e de estresse oxidativo através da citometria de fluxo. Porém, como se trata de uma aferição indireta do estresse oxidativo, essa técnica pode não possuir bom desempenho para a detecção de AOPP em tecido renal murino. Sabendo que, a AOPP demonstrou ter boa acurácia quando utilizada em amostras de sangue humano para a detecção de dano oxidativo (Rua et al., 2014).

Dados prévios de nosso laboratório (Nogueira et al, 2012; Gomes et al, 2014; Dias et al, 2014) e outros (Hizoh e Haller, 2002; Brune et al., 2003; López-Novoa et al, 2011; Osthoff e Trendelenburg, 2013) demonstraram que ROS regula vias ligadas à apoptose e contribui para a lesão glomerular e tubular. Ao mesmo tempo, outros estudos recentes têm demonstrado que o

meio de contraste desenvolve efeito tóxico direto sobre as células tubulares renais, tais como a despolarização da membrana mitocondrial (que contribui para a produção de ROS), fragmentação de DNA, a apoptose e alterações morfológicas celulares (Goldenberg e Matetzky, 2005; Itoh et al., 2005; Yokomaku et al., 2008; Michael et al., 2014). Dessa forma, hipotetizamos que a RV antioxidante poderia inibir a apoptose de células renais pela NIC, portanto, também contribuindo para evitar a disfunção renal induzida por meio de contraste. Como esperado, os nossos dados de citometria de fluxo mostraram que o modelo NIC é acompanhado por apoptose em todo o rim (principalmente na medula como um tecido alvo primário), corroborando os resultados anteriores avaliados através das imagens microscópicas, marcadores relacionados com apoptose ou ensaios de citotoxicidade (Billings et al., 2008; Yokomaku et al., 2008; Khan et al., 2013). O mais importante, é que estamos demonstrando pela primeira vez que a RV foi capaz de diminuir significativamente a apoptose e restaurar a viabilidade celular de um modo dependente da dose, sendo ainda maior do que a do grupo NAC. Assim, os nossos dados reforçam duas características importantes para a resina de *V. oleifera*: além de ser renoprotetora, não mostra nenhuma evidência de citotoxicidade mesmo a uma dose elevada (V300), favorecendo o seu potencial para futuras investigações clínicas.

Sabe-se que os meios de contraste iodados, após filtração são concentrados no interior dos túbulos renais, expondo-o diretamente às células tubulares, piorando o dano direto (Andreucci et al., 2014). Portanto, em adição aos parâmetros bioquímicos e da análise do estresse oxidativo, índice de apoptose, viabilidade de células renais e os nossos dados histopatológicos por HE e MEV indicam uma alteração significativa da estrutura renal no grupo NIC em comparação com os animais controle, de acordo com outros relatos (Billings et al., 2008; Yokomaku et al., 2008; Colbay et al., 2010; Khan et al., 2013.; Duan et al., 2013). Interessantemente, demonstrou-se que a RV também apresenta um efeito nefroprotetor através da melhoria da estrutura glomerular e da vacuolização acompanhada pelas propriedades anti-azotêmicas diretas, antioxidante e anti-apoptóticas, de uma forma dependente da dose. De acordo com outras revisões recentes sobre estudos de ervas (Grassi et al., 2010; Pashkow de 2011), podemos especular que esses resultados renoprotetores

por RV pode ser exercida por um “pool” de antioxidantes contidos nesta espécie, justificando a superioridade quando comparado a NAC, um antioxidante convencional utilizado no tratamento clínico.

Uma limitação relativa de nosso estudo é que nós não analisamos outros parâmetros renais tais como proteinúria ou a cistatina C, um potencial biomarcador de dano tubular e insuficiência renal. Além disso, pretendemos em estudos futuros investigar o papel da RV em parâmetros fisiológicos, tais como no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular neste modelo experimental NIC em camundongos suíços.

## **6. CONCLUSÃO**

---

Em resumo, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, o papel renoprotetor de resina de *Virola oleifera*, o que melhora a disfunção renal e morfológica da lesão tubular em camundongos causadas pela indução da nefropatia induzida por contraste, essa melhora é acompanhada pelas atividades antioxidante e anti – apoptótica indireta. Assim, esta resina pode ser um agente terapêutico promissor que poderia potencialmente ser utilizada para a prevenção e / ou tratamento de disfunção renal induzida pelo contraste. Ensaio clínico precisam ser realizados para estabelecer a eficácia, tolerabilidade e farmacocinética desse extrato natural.

## 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. *J Clin Invest.* 1994 Sep;94(3):1069-75.

Aires, MM. *Fisiologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Andreucci M, Faga T, Pisani A, Sabbatini M, Michael A. Acute kidney injury by radiographic contrast media: pathogenesis and prevention. *Biomed Res Int.* 2014;2014:362725.

Aspelin P, Aubry P, Fransson SG, Strasser R, Willenbrock R, Berg KJ; Nephrotoxicity in High-Risk Patients Study of Iso-Osmolar and Low-Osmolar Non-Ionic Contrast Media Study Investigators. Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):491-9.

Atukeren P, Aydin S, Uslu E, Gumustas Mk, Cakatay U. Redox homeostasis of albumin in relation to alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2010;3(3):206-213.

Azevedo, NR, Santos, SC, Miranda, EG, Ferri, PH. A 2-Acylcyclohexane-1,3-dione from *Virola oleifera*. *Phytochemistry* 1997;46(8):1375-1377.

Balarini CM, Leal MA, Gomes IB, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med.* 2013 Jan 5;11:3.

Baliano AP, Alves FS, Pereira ACH, Aquije GM de FV, Lenz D, Andrade TU, Endringer DC: Centennial Knowledge of Medicinal Plants Held in Communities of Espírito Santo, Brazil. *Ethnobot Res Applic* 2015;14:155-62.

Barata, LES; Santos, LS; Ferri, PH; Phillipson, JD; Paine, A; Croft, S. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 2000;55:589-595.

Barrett BJ, Parfrey PS. Clinical practice. Preventing nephropathy induced by contrast medium. *N Engl J Med.* 2006 Jan 26;354(4):379-86.

Batlouni, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(4):556-563.

Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 1993 May;21(2):330-4.

Beyazal H, Caliskan Z, Utaç C. Comparison of effects of isotonic sodium chloride with diltiazem in prevention of contrast-induced nephropathy. *Ren Fail.* 2014 Apr;36(3):351-5.

Billings FT, Chen SW, Kim M, Park SW, Song JH, Wang S, Herman J, D'Agati V, Lee HT.  $\alpha$ 2-Adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Sep;295(3):F741-8.

Borges, FC; Santos, LS; Corrêa, MJC; Oliveira, MN; Souza Filho, APS. Potencial alelopático de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Mysticaceae). *Planta Daninha*. 2007;25(1):51-9.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem.J*. 1972;128:617–630.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brar. SS.; Hiremath, S.; Dangas, G.; Mehran, R.; Brar SK.; Leon, MB. Sodium bicarbonate for the prevention of contrast induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Oct;4(10):1584–1592.

Brüne B, Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl*. 2003 May;(84):S22-4.

Buettner, GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993;300(2):535-543.

Burton, GW. et al. Biological Antioxidants [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 1985: 311(1152):565-578,.

Buur JL, Diniz PP, Roderick KV, KuKanich B, Tegzes JH. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine after oral and intravenous administration to healthy cats. *Am J Vet Res*. 2013 Feb;74(2):290-3.

Carvalho JC, Ferreira LP, da Silva Santos L, Corrêa MJ, de Oliveira Campos LM, Bastos JK, Sarti SJ. Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivatives from *Virola michelli* Heckel. *J Ethnopharmacol*. 1999 Feb;64(2):173-7.

Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2006;71(2):216-25

Colbay M, Yuksel S, Uslan I, Acarturk G, Karaman O, Bas O, Mollaoglu H, Yagmurca M, Ozen OA. Novel approach for the prevention of contrast nephropathy. *Exp Toxicol Pathol*. 2010 Jan;62(1):81-9.

Colombo AF, Joly CA: Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Braz J Biol* 2010;70(3):697-708.

Costa, MCA; Barata, LES; Takahata, Y. Conformation of neolignans that bind to the arginine residue in adenosine-kinase from *Leishmania donovani*. Journal of Molecular Structure: Theochem 1999; 464:281-287.

Curtis LM, Agarwal A. HOpe for contrast-induced acute kidney injury. Kidney Int. 2007 Oct;72(8):907-9.

Denny, C; Zacharias, ME; Kohn, LK; Foglio, MA; Carvalho, JE. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 2007; 17(4):598-603.

Detrenis, S; Meschi, M; Musini, S; Savazzi, G. Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art. Nephrol Dial Transplant. 2005 Apr;20:1542–1550.

Dias AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, Palomino Z, Casarini DE, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. J Transl Med. 2014 Feb 6;12:35.

Domitrović R, Potočnjak I, Crnčević-Orlić Z, Škoda M. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. Food Chem Toxicol. 2014 Apr;66:321-8.

Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews, 2002;82(1):47-95.

Duan SB, Liu GL, Chen GC, Wang P, Pan P, Xu XQ. Aged rats are susceptible to nephrotoxicity induced by iodinated contrast media. Ren Fail. 2013;35(1):150-4.

Fenner, R, Betti, AH, Mentz, LA; Rates, SMK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2006;42(3):369-394.

Fernandes, AMAP, Barata, LES, Ferri, PH. Lignans and a neolignan from *Virola oleifera* leaves. Phytochemistry. 1993;32(6):1567-1572.

Ferri, PH. Fitoquímica das folhas de *Virola oleifera* e síntese de compostos [1,4]-benzodioxanos e análogos nitrogenados. Tese de Doutorado em Química – Instituto de Química, Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas. 1993;1:177.

Fontanari, G.G.; Soares, R.A.M.; Kobelnik, M.; Figueiredo, A.G.; Ribeiro, C.A., 2012. Estudo do comportamento térmico do óleo extraído de Bicuíba (*Virola bicuhyba*). VIII Congresso Brasileiro e III Congresso Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria 01 a 04 de Abril de 2012; Campos do Jordão, SP, Brasil.

Goldenberg I, Matetzky S. Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies. *CMAJ*. 2005 May 24;172(11):1461-71.

Goldfarb S, McCullough PA, McDermott J, Gay SB. Contrast-induced acute kidney injury: specialty-specific protocols for interventional radiology, diagnostic computed tomography radiology, and interventional cardiology. *Mayo Clin Proc*. 2009 Feb;84(2):170-9.

Gomes IB, Porto ML, Santos MC, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids Health Dis*. 2014 Dec 6;13:184.

Grassi D, Desideri G, Ferri C. Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*. 2010 Aug;2(8):889-902.

Gu G, Zhang Y, Lu R, Cui W. Additional furosemide treatment beyond saline hydration for the prevention of contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jan 15;8(1):387-94.

Gurm HS, Smith DE, Berwanger O, Share D, Schreiber T, Moscucci M, Nallamothu BK; BMC2 (Blue Cross Blue Shield of Michigan Cardiovascular Consortium). Contemporary use and effectiveness of N-acetylcysteine in preventing contrast-induced nephropathy among patients undergoing percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc Interv*. 2012 Jan;5(1):98-104.

Gutteridge JM, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 19;393(4):561-4.

Halliwell, Barry et al. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford university press, 1999.

Hansen, PB; Schnermann, J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Oct;285(4):F590-9.

Heyman SN, Rosen S. Dye-induced nephropathy. *Semin Nephrol*. 2003 Sep;23(5):477-85.

Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée JM, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. *Invest Radiol*. 2010 Apr;45(4):188-95.

Hiruma-Lima, CA., Batista, LM, Almeida, ABA, Magri, LP, Santos, LC. Vilegas, W, Souza-Brito, ARM. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;122:406-409.

Hizoh I, Haller C. Radiocontrast-induced renal tubular cell apoptosis: hypertonic versus oxidative stress. *Invest Radiol.* 2002 Aug;37(8):428-34.

Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R. Clinical and experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast media. *J Pharmacol Sci.* 2005 Apr;97(4):473-88.

Jacob C.; Winyard P. G. Introduction in Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine; Jacob C., Winyard P. G., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2009;1–12.

Junqueira, LC; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2013.

Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013 Feb 8;1:244-57.

Kama A, Yilmaz S, Yaka E, Dervişoğlu E, Doğan NÖ, Erimşah E, Pekdemir M. Comparison of short-term infusion regimens of N-acetylcysteine plus intravenous fluids, sodium bicarbonate plus intravenous fluids, and intravenous fluids alone for prevention of contrast-induced nephropathy in the emergency department. *Acad Emerg Med.* 2014 Jun;21(6):615-22.

Karami M, Karimian Nokabadi F, Ebrahimzadeh MA, Naghshvar F. Nephroprotective effects of Feijoa Sellowiana leaves extract on renal injury induced by acute dose of ecstasy (MDMA) in mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2014 Jan;17(1):69-72.

Khan AM, Maderdrut JL, Li M, Toliver HL, Coy DH, Simon EE, Batuman V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents contrast-induced nephropathy in a novel mouse model. *Physiol Rep.* 2013 Nov;1(6):e00163.

Kinaci MK, Erkasap N, Kucuk A, Koken T, Tosun M. Effects of quercetin on apoptosis, NF- $\kappa$ B and NOS gene expression in renal ischemia/reperfusion injury. *Exp Ther Med.* 2012 Feb;3(2):249-254.

Kirsztajn, GM. *Diagnóstico laboratorial em nefrologia*. São Paulo: Sarvier, 2010

Kongkham S, Sriwong S, Tasanarong A. Protective effect of alpha tocopherol on contrast-induced nephropathy in rats. *Nefrologia.* 2013 Jan 18;33(1):116-23.

konya, K; Vargas, ZS; Antus, S. Antioxidant properties of 8.O.4'-neolignans. *Phytomedicine.* 2001;8(6):454-459.

Ku, SK, Lee, HS, Lee, JH. An Immunohistochemical Study of the Gastrointestinal Endocrine Cells in the C57BL/6 Mice. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 2003;32:21–28.

Kwak KH, Jung H, Park JM, Yeo JS, Kim H, Lee HC, Byun SH, Kim JC, Park SS, Lim DG. A peroxyxynitrite decomposition catalyst prevents mechanical allodynia and NMDA receptor activation in the hind-paw ischemia reperfusion injury rats. *Exp Ther Med*. 2014 Feb;7(2):508-512.

Lassila M, Seah KK, Allen TJ, Thallas V, Thomas MC, Candido R, Burns WC, Forbes JM, Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein e-knockout mouse: role of advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Aug;15(8):2125-38.

Lee HT, Jan M, Bae SC, Joo JD, Goubaeva FR, Yang J, Kim M. A1 adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jun;290(6):F1367-75.

Li LP, Thacker J, Lu J, Franklin T, Zhou Y, Papadopoulou MV, Solomon R, Prasad PV. Efficacy of preventive interventions for iodinated contrast-induced acute kidney injury evaluated by intrarenal oxygenation as an early marker. *Invest Radiol*. 2014 Oct;49(10):647-52.

Lima, AAS; Figueiredo, MAZ; Krapf, SMR; Souza, FR. Salivary urea concentration in oral cancer and irradiated patients. *Rev. de Clín. Pesq. Odontol*. 2005 jan./mar;1(3):235-51.

Lima, GRM; Montenegro, CA; Almeida, CLF; Athayde-Filho, PF; Barbosa-Filho, JM; Batista, LM. Database survey of anti-inflammatory plants in South America: A review. *International Journal of Molecular Science*. 2011;12:2692-2749.

Lindholt, JS. Radiocontrast induced nephropathy. *European Journal of vascular and endovascular Surgery*. 2003; apr; 25(8):296-304.

Liu S, Jia Z, Zhou L, Liu Y, Ling H, Zhou SF, Zhang A, Du Y, Guan G, Yang T. Nitro-oleic acid protects against adriamycin-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Dec 1;305(11):F1533-41.

Lönn ME, Dennis JM, Stocker R. Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(4):863-84.

López-Novoa JM, Rodríguez-Peña AB, Ortiz A, Martínez-Salgado C, López Hernández, FJ: Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *J Transl Med* 2011;9:13.

Loscalzo J: Nitric oxide insufficiency, platelet activation and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001 Apr 27;88(8):756-62.

Machado, MC; Castagna, MTV.; Reis, G; Motta, MS; Oliveira JV; Oliveira AL; Campos Neto, MS. Nefropatia por radiocontraste: tendências atuais. *Rev Bras Cardiol Invas*. 2003;11(4):27-30.

Magro, MCS; Vattimo, MFF. Evaluation of renal function: creatinine and other biomarkers. *Rev. bras. ter. Intensive*. São Paulo 2007;19(2):182-185.

Matteucci, E; Biasci, E; Giampietro, O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta diabetologica*, 2001; 38(4):187-189.

McCullough PA, Akrawinthewong K. Ascorbic acid for the prevention of contrast-induced acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Dec 10;62(23):2176-7.

Michael A, Faga T, Pisani A, Riccio E, Bramanti P, Sabbatini M, Navarra M, Andreucci M. Molecular mechanisms of renal cellular nephrotoxicity due to radiocontrast media. *Biomed Res Int*. 2014;2014:249810.

Milaneze B, Keijok W, Oliveira J, Peruch B, Bartochevis J, Liqui L, Prado A, Endringer D, Pontes M, Ribeiro M, Nogueira B, Guimarães M. The green synthesis of gold nanoparticle using extract of *Virola oleifera*. *BMC Proceedings* 2014 8(Suppl 4):29.

Morais, SKR; Teixeira, AF; Torres, ZES; Nunomura, SM; Yamashiro-Kanashiro, EH; Lindosof, JAL; Yoshida, M. Biological activities of lignoids from Amazon Myristicaceae species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009;20(6):1110-1118.

Möcke, M; Radovic, M; Kühnle, Y; Combé, V; Waigand, J; Schröder, S; Dietz, R; Frei, U; Eckardt, KU. Acute renal haemodynamic effects of radiocontrast media in patients undergoing left ventricular and coronary angiography. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1588–1594.

Murphy, ME; Tublin, ME; Li, S. Influence of contrast media on the response of rat renal arteries to endothelin and nitric oxide: influence of contrast media. *Invest. Radiol*. 1998;33:356-365.

Neumayer, HH; Junge, W; Küfner, A; Wenning, A. Prevention of radiocontrast-media-induced nephrotoxicity by the calcium channel blocker nitrendipine: a prospective randomised clinical trial. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1989;4(12):1030-1036.

Nevitt T, Rodrigues, PC. The Stress Response in the Budding Yeast, *Res Signpost*. 2007;39-58.

Nicol CJ, Zielenski J, Tsui LC, Wells PG. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *FASEB J*. 2000 Jan;14(1):111-27.

Nogueira BV, Palomino Z, Porto ML, Balarini CM, Pereira TM, Baldo MP, Casarini DE, Meyrelles SS, Vasquez EC. Granulocyte colony stimulating factor prevents kidney infarction and attenuates renovascular hypertension. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29(1-2):143-52.

Noris, Marina et al. L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension*, 2004; 43(3):614-622.

Oga, S. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. São Paulo: Atheneu, p.37-54, 2003.

Oguzhan N, Cilan H, Sipahioglu M, Unal A, Kocyigit I, Kavuncuoglu F, Arikan T, Akpek M, Elcik D, Sahin O, Gulme E, Pala C, Tokgoz B, Utas C, Oguzhan A, Oymak O. The lack of benefit of a combination of an angiotensin receptor blocker and calcium channel blocker on contrast-induced nephropathy in patients with chronic kidney disease. *Ren Fail.* 2013;35(4):434-9.

Omenn GS. Contributions to behavior-genetic analysis. The mouse as a prototype. *American Journal of Human Genetics.* 1971;23(3):331-332.

Osthoff M, Trendelenburg M. Impact of mannose-binding lectin deficiency on radiocontrast-induced renal dysfunction. *Biomed Res Int.* 2013;2013:962695.

Packer, JEI; Slater, TOF; Willson, RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. 1979.

Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2010 Jan-Feb;3(1):2-12.

Papaharalambus, CA; Griending, KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends in cardiovascular medicine,* 2007;17(2):48-54.

Paravicini, T; Touyz, R. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008 Feb; 31(2):170-180.

Pashkow FJ. Oxidative Stress and Inflammation in Heart Disease: Do Antioxidants Have a Role in Treatment and/or Prevention? *Int J Inflam.* 2011;2011:514623.

Pattharanitima P, Tasanarong A. Pharmacological strategies to prevent contrast-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:236930.

Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int.* 2005 Jul;68(1):14-22.

Poljšak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:956792.

Prasad, P; Priatna, A; Spokes, K; Epstein, FH. Changes in intrarenal oxygenation as evaluated by BOLD MRI in a rat kidney model for radiocontrast nephropathy. *J Magn Reson Imagin.* 2001 May;13(5):744–747.

Quintavalle C, Donnarumma E, Fiore D, Briguori C, Condorelli G. Therapeutic strategies to prevent contrast-induced acute kidney injury. *Curr Opin Cardiol.* 2013 Nov;28(6):676-82

Ray, PD.; Huang, BW; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis

and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 2012;24(5):981-990.

Reuter, SB.; Harutyunyan, M; Mygind, ND; Jørgensen, E; Kastrup, J. The influence of contrast media on kidney function in patients with stable coronary artery. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. 2014;48:234–240.

Ribeiro, SMR et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal* 2006;21(3):133-149

Riella, MC. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos, Rio de Janeiro. ed. Guanabara Koogan, 2003.

Rodrigues, WA. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet*. (Myristicaceae) do Brasil. *Acta Amazonica* 1980;15(1):1-127.

Rodrigues, WA. Reabilitação nomenclatural e taxonômica de *Virola bicuiba* (Schott) Warb. (Myristicaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 1998;12:249-252.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.

Rua EA, Porto ML, Ramos JP, Nogueira BV, Meyrelles SS, Vasquez EC, Pereira TC. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J Biomed Sci*. 2014 Dec 30;21:105.

Santos, RO; Malvar, B; Silva, R; Ramalho, V; Pessegueiro, P; Amoedo, M; Aniceto, J; Pires, C. Nefropatia por contraste. *Acta Med Port*. 2011;24(5):809-820.

Sartonelli, P, Young, MCM, Kato, MJ. Antifungal lignans from the arils of *Virola oleifera*. *Phytochemistry* 1998;47(6):1003-1006.

Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem* 2009;112:654-658.

Schultes, RE. Evolution of the identification of the Myristicaceous hallucinogens of South America. *Journal of Ethnopharmacology*. 1979;1(3):211-239.

Scoditti E, Massaro M, Montinari MR. Endothelial safety of radiological contrast media: why being concerned. *Vascul Pharmacol*. 2013 Jan;58(1-2):48-53.

Seeliger E, Sendeski M, Rihal CS, Persson PB. Contrast-induced kidney injury: mechanisms, risk factors, and prevention. *Eur Heart J*. 2012 Aug;33(16):2007-15.

Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):3170-5.

Silva, RG; Silva, NG; Lucchesi, F; Burdmann, EA. Prevention of contrast-induced nephropathy by use of bicarbonate solution - preliminary results and literature review. *J Bras Nefrol.* 2010;32(3):292-302.

Solomon, R. Contrast-medium-induced acute renal failure. *Kidney International.* 1998;53:230–242.

Spargias K, Alexopoulos E, Kyrzopoulos S, Iokovis P, Greenwood DC, Manginas A, Voudris V, Pavlides G, Buller CE, Kremastinos D, Cokkinos DV. Ascorbic acid prevents contrast-mediated nephropathy in patients with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention. *Circulation.* 2004 Nov 2;110(18):2837-42.

Sun, Z; Fu, Q; Cao, L; Jin, W; Cheng, LL; Li, Z. Intravenous N-Acetylcysteine for Prevention of Contrast-Induced Nephropathy: A Meta-analysis of randomized controlled trials. *Plos One.* 2013 Jan;8(1):1-8.

Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F, Huber JC. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2001 Aug;16(8):1644-7.

Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med.* 2000 Jul 20;343(3):180-4.

Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LP, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Int J Mol Sci.* 2013 Feb 5;14(2):3325-42.

Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012 Jan;10(1):4-18.

Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980;191:421–427.

Turrens, JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports,* 1997;17(1):3-8.

Ultramari FT; Bueno, RRL; Cunha, CLP; Andrade, PMP; Nercolini, DC; Tarastchuk, JCE; Faidiga, AM; Melnik, G; Guérios, EE. Nefropatia induzida pelos meios de contraste radiológico após cateterismo cardíaco diagnóstico e terapêutico. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Sep; 87(3):378-390.

Vanommeslaeghe F, De Mulder E, Van de Bruaene C, Van de Bruaene L, Lameire N, Van Biesen W. Selecting a strategy for prevention of contrast-induced nephropathy in clinical practice: an evaluation of different clinical practice guidelines using the AGREE tool. *Nephrol Dial Transplant.* 2015 Jun 4; pii:gfv220.

Vasconcelos, SML et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*, 2007;30(5):1323-38.  
Walker, HK; Hall, WD; Husten, AO. BUN and Creatinine. (1990).

Watanabe M, Nakashima H, Mochizuki S, Abe Y, Ishimura A, Ito K, Fukushima T, Miyake K, Ogahara S, Saito T. Amelioration of diabetic nephropathy in OLETF rats by prostaglandin I(2) analog, beraprost sodium. *Am J Nephrol*. 2009;30(1):1-11.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996 May;49(5):1304-13.

Wu H, Wang YM, Wang Y, Hu M, Zhang GY, Knight JF, Harris DC, Alexander SI. Depletion of gammadelta T cells exacerbates murine adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Apr;18(4):1180-9.

Xing Y, Wei RB, Tang L, Yang Y, Zheng XY, Wang ZC, Gao YW. Protective effect of salidroside on contrast-induced nephropathy in comparison with N-acetylcysteine and its underlying mechanism. *Chin J Integr Med*. 2015 Apr;21(4):266-73.

Yang DW, Yang DP, Jia RH, Lin S. Effects of selective inhibition of reverse mode of Na(+)/Ca(2+) exchanger on rats with contrast-induced acute kidney injury. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2013 Jun 11;93(22):1750-4.

Yokomaku Y, Sugimoto T, Kume S, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Nitta N, Haneda M, Koya D, Uzu T, Kashiwagi A. Asialoerythropoietin prevents contrast-induced nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Feb;19(2):321-8.

Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Radiographic contrast media-induced tubular injury: evaluation of oxidant stress and plasma membrane integrity. *Kidney Int*. 2003 Jul;64(1):128-39.

Zeisberg M, Kalluri R. Physiology of the Renal Interstitium. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Mar 26.



## Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UVV)

### PARECER CONSUBSTANCIADO

#### Parecer Nº. 268/2013- Protocolo de Pesquisa

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Thiago de Melo Costa Pereira

#### **Atividade de extratos vegetais antioxidantes em modelo experimental de nefrologia induzida por contraste.**

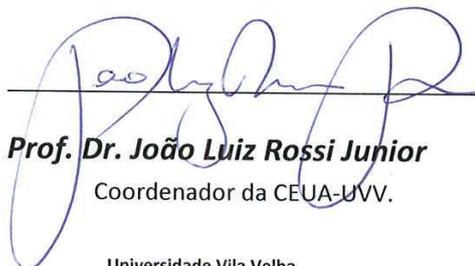
Situação: **APROVADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA- UVV) analisou na sessão do dia 03 de julho de 2013 o processo nº 268- 2013, referente a pesquisa: “**Atividade de extratos vegetais antioxidantes em modelo experimental de nefrologia induzida por contraste**”, tendo como responsável o **Dr. Thiago de Melo Costa Pereira**, sendo considerado adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais das Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Vila Velha.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a esta CEUA, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final enviado em PDF.

Vila Velha, 03 de julho de 2013.



**Prof. Dr. João Luiz Rossi Junior**  
Coordenador da CEUA-UVV.

Universidade Vila Velha  
Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29102-770  
E-mail joao.rossi@uvv.br