

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

**EFEITO NEFROPROTETOR DA SILIMARINA EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR CONTRASTE**

**VERÔNICA DE SOUZA SANTOS**

**VILA VELHA**  
**MAIO / 2018**

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

**EFEITO NEFROPROTETOR DA SILIMARINA EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR CONTRASTE**

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

**VERÔNICA DE SOUZA SANTOS**

**VILA VELHA**  
**MAIO / 2018**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

S231e

Santos, Verônica de Souza.

Efeito nefroprotetor da silimarina em camundongos submetidos à nefropatia por contraste / Verônica de Souza Santos. – 2018.

60 f.: il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Nefrologia. 3. Rins – Doença. I. Pereira, Thiago de Melo Costa. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

**VERÔNICA DE SOUZA SANTOS**

**EFEITO NEFROPROTETOR DA SILIMARINA EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR CONTRASTE**

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

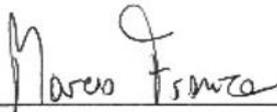
Aprovada em 30 de maio de 2018,

Banca Examinadora:



---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Gobbi Amorim – UFES**



---

**Prof. Dr. Marcio Fronza – UVV**



---

**Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira – UVV**

**Orientador**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua presença constante em minha vida, por ter me sustentado e guiado até aqui;

Aos meus pais, pelo amor, suporte incondicional e principalmente a minha mãe, grande incentivadora, que acreditou no meu sonho e me acalentou em todos os momentos.

Ao meu orientador, um pai, Professor Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, por ter me aceitado como sua aluna, me guiado e incentivado em todos os momentos e especialmente quando algo dava errado, sempre com uma mensagem afetuosa. É um privilégio e uma honra ser sua aluna.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro pelos ensinamentos, sugestões e apoio nos momentos necessários;

Ao Prof. Dr. Márcio Fronza, aos professores Dra. Marcella Porto (IFES) e Dr. Breno Valentim (UFES), por toda ajuda e contribuição;

A Gisele, uma irmã que ganhei no laboratório, por dividir os momentos de incertezas e as vitórias, obrigada pela disposição, auxílio, alegria e companheirismo, o mestrado jamais seria o mesmo sem você, minha amiga;

As alunas de iniciação científica responsáveis pelo lab 33: Beatriz Peters e Larissa Zambon, por todo carinho, dedicação, ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos;

A Ma. Layla Aparecida, por se fazer presente mesmo longe e também ter caminhado comigo até aqui;

A Rafaela, Ananda e Arícia, doutorandas da UFES e ao Flávio, técnico do LUCCAR;

A Roberta e Daniel, funcionários excepcionais do biotério da UVV, sempre solícitos e amigos;

Às agências de fomento, FAPES e CNPq;

À UVV e todos os professores e funcionários do PPGCF e Biopráticas;  
Enfim, a todos os amigos da Universidade, colegas do mestrado e da faculdade, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho;

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1. Animais.....	13
2.2 Grupos e Protocolo Experimental.....	13
2.3 Medida indireta da pressão arterial .....	14
2.4 Análises bioquímicas.....	16
2.5 Preparo das amostras para citometria de fluxo e cometa alcalino .....	16
2.5.1 Isolamento de células renais .....	16
2.5.2 Lise de hemácias.....	17
2.6 Determinação dos níveis citoplasmáticos de EROs no sangue e rim.....	17
2.7 Produtos Proteicos de Oxidação Avançada .....	18
2.8 Ensaio Cometa Alcalino .....	19
2.8.1 Preparo das lâminas.....	19
2.8.2 Lise, desenovelamento e eletroforese.....	19
2.8.3 Análise citológica.....	20
2.9 Determinação da viabilidade e apoptose.....	21
2.10 Análises histológicas .....	22
2.10.1 Microscopia Óptica .....	23
2.10.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	24
2.11 Análises estatísticas .....	25
3. RESULTADOS .....	26
3.1 Silimarina atenua a lesão renal aguda induzida pela nefropatia induzida por contraste (CIN) nos camundongos suíços.....	26
3.2 Silimarina previne o estresse oxidativo após indução da CIN nos camundongos suíços.....	29
3.3 Silimarina previne o dano ao DNA nas células sanguíneas no modelo CIN em camundongos suíços.....	31
3.4 Redução do estresse oxidativo em células renais pela silimarina após indução da CIN em camundongos suíços .....	32

3.5 Apoptose e viabilidade em células renais.....	33
3.6 Parâmetros Morfométricos .....	34
4. DISCUSSÃO .....	38
5. CONCLUSÃO.....	42
6. REFERÊNCIAS.....	43
7. ANEXO.....	53

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organograma cronológico dos experimentos. As letras D1-D7 correspondem aos dias do experimento. D1-D5: tratamento dos animais com solução estoque por gavagem, n-acetilcisteína por via intraperitoneal ou silimarina via gavagem. D5 e D6: representam os dias de indução da nefropatia por contraste; as caixas retangulares acima representam os tratamentos realizados para cada grupo durante os 5 primeiros dias e a caixa inferior a ordem cronológica ampliada sobre a indução da CIN até a eutanásia do animal (D7). **14**
- Figura 2.** Pletismógrafo de cauda (CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, KENT Scientific CO., Connecticut, USA) Fotos da própria autora. **16**
- Figura 3.** Etapas do ensaio cometa alcalino. Preparo das lâminas, análise das lâminas em microscópio de fluorescência e detalhe da interface do programa CASP com o cometa selecionado e a análise do seu perfil. Fotos da própria autora. **21**
- Figura 4.** Etapas da microscopia eletrônica de varredura. A) Capela onde as amostras são preparadas, B) Secagem das amostras em ponto crítico com CO<sub>2</sub> C) Metalização das amostras com ouro D) Rins já metalizados dispostos para serem analisados E) Microscópio eletrônico de varredura no qual as amostras são inseridas, à direita, interface no computador. Fotos da própria autora. **24**
- Figura 5.** Quantificação de uréia plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos como média ± EPM para n = 9-12 animais por grupo. \*p<0,05 vs. grupo CON, #p<0,05 vs. grupo NIC e &p<0,05 vs. grupo NAC (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey). **26**
- Figura 6.** Quantificação de creatinina plasmática nos grupos experimentais. **27**  
Gráfico de dispersão: os valores são expressos como média ± EPM para n = 6-12 animais por grupo. \*p<0,05 vs. grupo CON e #p<0,05 vs. grupo NIC. (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de

Tukey).

- Figura 7.** Quantificação de cistatina C plasmática nos grupos experimentais. **28**  
Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON, # $p < 0,05$  vs. grupo NIC e & $p < 0,05$  vs. grupo NAC. (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).
- Figura 8.** Efeitos renoprotetores da silimarina em modelo experimental de nefropatia induzida por radiocontraste. Gráfico de barras representando a média dos principais biomarcadores da função renal. O grupo NIC mostra um incremento notável na ureia sérica, creatinina e cistatina C. Ao contrário do grupo NAC, a silimarina diminuiu de forma dose-dependente esses biomarcadores (50, 200 ou 300 mg/Kg). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. grupo controle; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. grupo NIC; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. grupo NAC (ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey). **29**
- Figura 9.** A silimarina previne o estresse oxidativo sistêmico em modelo experimental de nefropatia induzida por radiocontraste. A) A produção de EROs no sangue foi avaliada por DHE, DCF e HPF medidos por citometria de fluxo. Gráficos de barras mostrando que, após a NIC, os glóbulos brancos superproduzem as EROs, enquanto que o NAC e todas as doses de silimarina estudadas previnem este efeito. B) Quantificação da oxidação proteica do soro (AOPP), que apenas a silimarina na dose mais alta mostra efeitos antioxidantes. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 7-9$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC (ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey). **30**
- Figura 10.** Altas dose de silimarina previne danos no DNA em modelo experimental de CIN. A) Cometass típicas mostrando maior fragmentação de DNA no grupo NIC em comparação ao controle **32**

o qual contrasta também com o grupo S300, quantificado e representado em gráfico no painel inferior. B) Gráficos de barras mostrando a média da porcentagem de dano ao DNA e momento da cauda (~ 2,5 vezes maior no grupo NIC). Apenas o S300 foi capaz de proteger o DNA das células do sangue. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para n = 5-6 animais por grupo. \*p <0,05 vs. grupo CON e #p <0,05 vs. grupo NIC (ANOVA de uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

**Figura 11.** A silimarina previne a formação de EROs nos rins. Gráficos de barras mostrando uma superprodução severa de EROs no NIC, sendo parcialmente revertida pelos grupos NAC, S50 e S200. Apenas silimarina a 300 mg/Kg apresenta redução de  $\bullet$  O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e  $\bullet$  OH-/ONOO-. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para n = 5-6 animais por grupo. \*p <0,05 vs. grupo controle e #p <0,05 vs. grupo NIC (ANOVA de uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey). **33**

**Figura 12.** A silimarina previne a apoptose e restaura a viabilidade das células renais. A) Gráficos "dot plots" mostrando o aumento da apoptose em animais do grupo NIC comparados com todos os grupos tratados, determinado através de iodeto de propídio (PI) e anexina V-FITC. B) Gráfico de barras mostrando no painel da esquerda: os índices apoptóticos (Q2 + Q4) de todos os grupos. No painel direito: a viabilidade das células renais, destacando o aumento em relação ao NIC e a prevenção com NAC e silimarina (50, 200 e 300 mg/Kg). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para n = 6-7 animais por grupo. \*p <0,05 vs. grupo controle e #p <0,05 vs. grupo NIC (ANOVA de uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey). **34**

**Figura 13.** Micrografias representativas mostrando histologia renal (coradas com HE) nos diferentes grupos de camundongos 24 horas após a indução da NIC. A-F: secção córtex-medula (100x); G-L: a região cortical (200x) e R-M: a região cortical (400x) evidenciando dano glomerular, perda de núcleos, congestão na luz dos túbulos com **35**

presença de debris celulares, dilatação tubular e lesões tubulointersticiais principalmente no grupo NIC e prevenidas de maneira dose-dependente com silimarina.

**Figura 14.** A silimarina atenua as lesões glomerulares e tubulointersticiais na nefropatia induzida por radiocontraste em camundongos. Os índices de lesão tubulointersticial (TILI index) de todos os grupos (n = 4). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM. #p <0,05 vs. grupo NIC. **36**

**Figura 15.** Fotografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de tecido renal dos diferentes grupos confirmando a diminuição das lesões glomerulares renais e tubulares. A primeira coluna (A-F, barra de escala = 10  $\mu$ m) mostra imagens de varredura de glomérulos inteiros, mostrando maior preservação estrutural dos tecidos superficiais nos grupos NAC (C) e S300 (F), semelhante ao grupo CON. Os grupos NIC (B), S50 (D) e S200 (E) exibiram perda de coesão estrutural. A segunda coluna (G-L, barra de escala = 1  $\mu$ m) mostra uma maior ampliação dos podócitos para exibir os processos primários e os processos secundários interdigitais. Os grupos NIC (B) e S50 (D) apresentaram podócitos atípicos. Apenas os grupos NAC (I), S200 (K) e S300 (L) foram semelhantes às estruturas de controle (G), com processos podocitários lisos que se contrapuseram firmemente (setas amarelas). A terceira coluna (RM, barra de escala = 10  $\mu$ m) mostra imagens de varredura dos túbulos proximais com estrutura normal (M), com vacuolização epitelial celular (setas vermelhas) após nefropatia por radiocontraste (N, O e P) e ausência de vacúolos citoplasmáticos no Grupos S200 (Q) e S300 (R). A última coluna (S-X, barra de escala = 5 ou 10  $\mu$ m) mostra mais detalhes da estrutura tubular, seguindo o padrão de resposta da terceira coluna, enfatizando um efeito protetor dependente da dose da silimarina. **37**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos proteicos de oxidação avançada
ASC	Área sob a curva
BHT	Hidroximetiltolueno butilato
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CIN	Nefropatia induzida por contraste
CON	Grupo controle tratado com veículo
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'- diacetato de diclorofluoresceína
DCV	Doenças cardiovasculares
DHE	Dihidroetídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamina tetra acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas do oxigênio
<i>et al.</i>	<i>et alli – e colaboradores</i>
ETFG	Estimativa da taxa de filtração glomerular
FS	Fosfatidilserina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
HPF	Hidroxifenilfluoresceína
i.p	Via intraperitoneal
KI	Iodeto de potássio
LMA	<i>Low Melting Point Agarose</i>
LRA	Lesão Renal Aguda
MDA	Malondialdeído
NAC	Grupo tratado com n-acetilcisteína 200mg/kg
NIC	Grupo controle positivo tratado com veículo

NMA	<i>Normal Melting Point Agarose</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO <sup>-</sup>	Radical peróxido nitrito
PBS	Solução salina tamponada
PI	Iodeto de propídio
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SIL 200	Grupo tratado com silimarina 200 mg/kg
SIL 300	Grupo tratado com silimarina 300mg/kg
SIL 50	Grupo tratado com silimarina 50 mg/kg
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UVV	Universidade Vila Velha
v.o	Via oral
v.s	<i>Versus</i>

## RESUMO

SANTOS, VERÔNICA DE SOUZA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, maio de 2018. **Efeito nefroprotetor da silimarina em camundongos submetidos à nefropatia por contraste.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

A nefropatia induzida por contraste (CIN) é uma iatrogenia que cursa com perda da função renal em pacientes submetidos a procedimentos angiográficos, para os quais ainda não há uma prevenção bem-sucedida. Evidências recentes mostram que esse evento está relacionado com lesão tubular/vascular ocasionada principalmente pelo estresse oxidativo. Neste estudo, objetivamos avaliar o possível papel protetor do antioxidante silimarina, um produto natural extraído das sementes e frutos de *Silybum marianum*, rico em flavonoides e polifenóis, em modelo experimental de CIN. Camundongos suíços machos adultos foram separados em 6 grupos e pré-tratados oralmente com silimarina (50, 200 e 300 mg/kg), N-acetilcisteína (200 mg/kg) via intraperitoneal ou veículo (NIC e controle) durante 5 dias antes da indução da CIN. A função renal foi quantificada pelos níveis plasmáticos de creatinina, ureia e cistatina C. Além disso, o dano oxidativo no sangue foi determinado usando citometria de fluxo (biodisponibilidade de EROs), análise bioquímica (oxidação de proteínas) e ensaio de cometa (dano ao DNA). O dano oxidativo renal foi avaliado por citometria de fluxo (apoptose/viabilidade celular) e análise histológica. Os resultados demonstraram que a silimarina, de forma dose-dependente, preserva a função renal (avaliada pela creatinina sérica, uréia e cistatina C) e diminui o dano oxidativo sistêmico e renal (com propriedades antígeno-tóxicas e antiapoptóticas, respectivamente), sendo superior ao convencional tratamento com N-acetilcisteína. O tratamento com silimarina também teve efeitos benéficos nas lesões glomerulares e tubulares renais na análise histológica. Portanto, este estudo demonstra que a profilaxia com silimarina pode ser uma ferramenta interessante na prevenção da CIN.

**Palavras-chave:** nefropatia induzida por contraste (CIN), lesão renal aguda, Toxicidade renal por contraste; Estresse oxidativo; Apoptose; Cistatina C.

## ABSTRACT

SANTOS, VERÔNICA DE SOUZA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, may, 2018. **Nephroprotective effect of silymarin against radiocontrast-induced nephropathy in mice.** Advisor: Thiago de Melo Costa Pereira.

Contrast-induced nephropathy (CIN) is a relevant iatrogenic impairment in renal function in patients subjected in angiographic procedures for which there is not yet a successful prevention. Recent evidences show that this event is related with tubular/vascular injury activated mainly by oxidative stress. In this study, we aimed to evaluate the possible protective role of antioxidant silymarin, In this study, we aimed to evaluate the possible protective role of the antioxidant silymarin, a natural product extracted from the seeds and fruits of *Silybum marianum*, rich in flavonoids and polyphenols, in an experimental model of CIN. Adult male Swiss mice were separated into 6 groups and pre-treated orally with silymarin (50, 200 and 300 mg/Kg), N-acetylcysteine (200 mg/kg) intraperitoneal or vehicle for 5 days before the CIN and Control group. Renal function was quantified by plasma creatinine, urea and cystatin C levels. Moreover, blood oxidative damage was determined using flow cytometry (ROS bioavailability), biochemical analysis (protein oxidation) and comet assay (DNA damage). The renal oxidative damage was evaluated using flow cytometry (apoptosis/cell viability) and histological analysis. Our results demonstrated that silymarin, in a dose dependent manner, preserving the renal function (assessed by serum creatinine, urea and cystatin C) and decreases the systemic and renal oxidative damage (with antigenotoxic and antiapoptotic properties, respectively), being superior to the conventional treatment with N-acetylcysteine. Histologically, the silymarin treatment also had beneficial effects on renal glomerular and tubular injuries. Therefore, this study demonstrates that silymarin prophylaxis may be an interesting tool in the prevention of CIN.

**Keywords:** Contrast-induced nephropathy (CIN); acute kidney injury ; Contrast renal toxicity; Oxidative stress; Apoptosis; Cystatin C; kidney protection from contrast.

# 1. INTRODUÇÃO

Embora nos últimos 50 anos a expectativa de vida nos países desenvolvidos e em desenvolvimento tenha aumentado, surgem novos desafios associados ao envelhecimento da população devido ao crescimento de morbidades (Schmidt *et al.*, 2013). Ainda que muitas dessas disfunções estejam relacionadas com os hábitos de vida da sociedade contemporânea, outras podem ser iatrogênicas afetando órgãos vitais como o rim (Kate *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2017). Sabe-se hoje, que nos países desenvolvidos, 20% dos pacientes hospitalizados e 45% dos internados em unidades de tratamento intensivo apresentam Insuficiência Renal Aguda (IRA) com alto risco de mortalidade, e esse aumento da prevalência provavelmente reflete um envelhecimento da população sobrecarregada por inúmeras doenças que são com frequência tratadas com drogas múltiplas e muitas vezes nefrotóxicas (Li *et al.*, 2013; Wonnacot *et al.*, 2014).

A IRA é causada pela diminuição súbita da função renal que inclui a queda da filtração glomerular (TFG) com consequente azotemia no sangue e perda do equilíbrio homeostático do organismo (de Almeida *et al.*, 2016). Também chamada de Lesão Renal Aguda, a IRA desenvolve-se principalmente em pacientes hospitalizados ou graves em cuidados intensivos. Apresenta inúmeras causas relacionadas a condições clínicas distintas que afetam tanto a estrutura quanto a função do rim, não estando limitada apenas à TFG. É uma síndrome clínica que engloba etiologias que incluem doenças renais específicas (nefrite intersticial, doenças renais glomerulares e vasculites agudas), condições não específicas (isquemia, antimicrobianos, sepse e meio de contraste iodado) e também causas extrarrenais (obstruções no trato urológico) (KDIGO, 2012; de Almeida 2016).

Uma das principais causas de lesão renal aguda intra-hospitalar evitável é a nefropatia induzida pelo contraste (CIN). O contraste é utilizado como uma ferramenta indispensável durante intervenções cardíacas percutâneas e procedimentos de diagnóstico por imagem (Seeliger *et al.*, 2012; Bôa *et al.*, 2015). Anualmente cerca de 2 milhões de cateterismos cardíacos são realizados e mais de 30 milhões de doses de contraste iodado são administradas sendo que os custos públicos associados a CIN tendem a crescer (Weisbord *et al.*, 2018).

A CIN é uma grave deterioração iatrogênica da função renal que surge de 2 a 5 dias após a administração intravascular de um agente de contraste iodado particularmente em subpopulações clínicas vulneráveis, entre eles pacientes idosos

com desidratação, disfunção renal/cardíaca e/ou diabéticos, que foram submetidos a procedimentos angiográficos (Bôa *et al.*, 2015; Kiss e Hamar, 2016; Mamoulakis *et al.*, 2017). A CIN caracteriza-se pelo aumento absoluto nos níveis de creatinina em pelo menos 0,5 mg/dL (44,2 µmol/L) ou por um aumento relativo em 25% do valor basal (KDIGO, 2012; Fu *et al.*, 2018), a qual usualmente tem seu pico em 48-72 horas após a exposição ao contraste e eleva o risco de mortalidade quando seus valores não retornam a normalidade (Aspelin, 2003).

A fisiopatologia exata da CIN ainda é pouco conhecida (Mamoulakis *et al.*, 2017; Hossain *et al.*, 2018) mas quando o contraste é injetado por via intravenosa ou intra-arterial, passa do compartimento vascular através de capilares para o espaço extracelular. É eliminado quase exclusivamente por filtração glomerular, e após reabsorção de água tubular concentra-se no lúmen tubular renal. Nesse contexto, a elevada demanda de oxigênio pelo aumento do mecanismo de reabsorção, provoca uma hipóxia tecidual renal, particularmente de ordem medular pois, nessa região o transporte de oxigênio é escasso mesmo em condições fisiológicas, normalmente mantido por uma viscosidade reduzida (redução do hematócrito) e resistência elevada dos vasos retos que são longos capilares distantes do córtex renal (Seelinger *et al.*, 2012; Andreucci *et al.*, 2014).

A lesão endotelial renal consequente à hipóxia medular resulta do desequilíbrio entre fatores vasoconstritores locais como aumento da endotelina e adenosina; e fatores vasodilatadores como a redução de prostaglandias e óxido nítrico (de Almeida *et al.*, 2016). Esse desbalanço associado a lesões renais pré-existentes (por exemplo, cardiopatias e nefropatia diabética) levam à isquemia renal (Hossain *et al.*, 2018). Além disso, o contraste pode contribuir para a toxicidade nas células epiteliais tubulares renais, conforme recentemente publicações (Bôa *et al.*, 2015; Guss *et al.*, 2017) e outros autores (Efstratiadis *et al.*, 2008; Billings *et al.*, 2008; Kiss *et al.*, 2016; Andreucci *et al.*, 2017). A combinação desses fatores diminui o fluxo sanguíneo renal e a TFG, culminando no aumento progressivo dos biomarcadores renais que caracterizam a perda da função renal (de Almeida *et al.*, 2016; Mamoulakis *et al.*, 2017; Andreucci *et al.*, 2017). Ademais, estudos recentes demonstram que a utilização do contraste iodado também desenvolve lesão renal por superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), culminando com o estresse oxidativo, agravamento da vasoconstrição renal e apoptose de células renais (Bôa *et al.*, 2015; de Almeida *et al.*, 2016; Mamoulakis *et al.*, 2017).

Embora seja a terceira principal causa de insuficiência renal com alta morbimortalidade adquirida no hospital, as estratégias para prevenir a CIN ainda são inadequadas, expondo os pacientes à lesão renal aguda e aumento das despesas médicas (Guss *et al.*, 2017; Sedighifard *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018; Weisbord *et al.*, 2018; Hossain *et al.*, 2018).

Inúmeras estratégias profiláticas foram estabelecidas para prevenir a CIN. O suplemento publicado pelas diretrizes do *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO, 2012) sugere o uso de n-acetilcisteína (NAC) associado a soluções isotônicas endovenosas em pacientes com risco elevado para desenvolvimento da CIN. Porém, o nível de evidência para a prática é baixo e o que a sustenta é o reduzido custo e poucos efeitos colaterais do medicamento. Outros tratamentos foram propostos na tentativa de evitar a CIN, por exemplo a hidratação, redução da dose de contraste, administração de bicarbonato de sódio e nebivolol (Altunoren *et al.*, 2015; Bôa *et al.*, 2015; Solomon *et al.*, 2015). No entanto, a hidratação intravenosa, a redução do uso de contraste com alto peso molecular entre outras medidas, não demonstraram uma redução suficiente no risco de CIN em grandes estudos e novas propostas terapêuticas necessitam ser investigadas (Weisbord *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a investigação de intervenções preventivas eficazes contra a nefropatia é fundamental para evitar danos aos rins, custos e sobrecarga associados a essa complicação (Bôa *et al.*, 2015; Mamoulakis *et al.*, 2017; Scharnweber *et al.*, 2017). As terapias atuais tentam minimizar os efeitos da cascata fisiopatológica da doença com uso de vasodilatadores e antioxidantes (atorvastatina, sildenafil), na tentativa de reduzir a produção de EROs e a vasoconstrição renal (de Almeida *et al.*, 2016; Khosravi *et al.*, 2016). Ao mesmo tempo existe uma busca por produtos naturais, como a *Virola Oleifera* e a *Achyrocline satureioides* (Macela), que demonstraram resultados promissores em modelos murinos (Bôa *et al.*, 2015; Guss *et al.*, 2017).

Nesse trabalho, será avaliada a aplicabilidade da silimarina, um produto natural, extraído das sementes e frutos da planta *Silybum marianum* (cardo de leite), sob registro 84604-20-6 no banco de dados do *Chemical Abstracts Service* (CAS), com estrutura química  $C_{25}H_{22}O_{10}$ . Esta planta é originária do sul da Europa, norte da África e Ásia Menor e se adaptou ao clima nas Américas do Sul e do Norte e Sul da Austrália, sendo há séculos utilizada para diversas morbidades (Voroneanu *et al.*, 2016 e Lovelace *et al.*, 2015).

É composta por 65% a 80% de flavonolignanas (silibina A e silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina e silidianina), com pequenas quantidades de flavonóides e polifenóis (Abenavoli *et al.*, 2010; Surai *et al.*, 2015; Bijak *et al.*, 2017). Dentre as substâncias minoritárias presentes no extrato estão também os flavonóides quercetina e taxifolina (Bijak, 2017). A silimarina é lipossolúvel, com biodisponibilidade de 30-50%, atingindo concentração plasmática máxima em 1-2 horas e sua meia-vida é estimada em 4-6 horas. Aproximadamente 20-40% é conjugada e excretada na bile e 8% é excretada na urina (Polyak *et al.*, 2013). É um dos 10 compostos naturais mais populares usados na prática clínica, aprovado pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento de doenças hepáticas (Polyak *et al.*, 2013; Surai *et al.*, 2015; Bijak, 2017; Federico *et al.*, 2017). Sua eficácia tem sido atribuída ao seu mecanismo antioxidante, anti-inflamatório e imunomodulador atuando nas diversas vias de sinalização celular (Shahbazi, 2012; Hou *et al.*, 2016; Lovelace *et al.*, 2016; Bijak *et al.*, 2017).

Estudos experimentais também apontam que a silimarina é capaz de reduzir a proteinúria e o dano do tecido renal em ratos diabéticos (Soto *et al.*, 2010; Vessal *et al.*, 2010). Além disso, a silibina, o principal componente ativo da silimarina, pode prevenir estresse oxidativo induzido por glicose e lesão podocitária *in vitro* e *in vivo* (Khazim *et al.*, 2013). Resultados promissores foram recentemente publicados por Bijak *et al.* (2017), sugerindo que esta mistura de flavolignanas e flavonóides, pode ser considerada uma promissora ferramenta nutracêutica, não somente para doenças hepáticas, mas também cardiovasculares e outras doenças inflamatórias. No entanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores da silimarina sobre a lesão renal ainda permanecem incertos (Feng *et al.*, 2017).

Com intuito de compreender esses mecanismos que envolvem a potencial nefroproteção da silimarina, explorando suas propriedades antioxidantes, anti-apoptóticas e considerando a importância desses mecanismos na progressão da CIN (Bôa *et al.*, 2015; de Almeida *et al.*, 2016; Guss *et al.*, 2017), a silimarina pode ser uma interessante estratégia farmacológica para a prevenção desta complicação. A confirmação dessa hipótese pode identificar uma nova abordagem para prevenir a nefropatia induzida por radiocontraste.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos, pesando entre 30-45g, provenientes do Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV. Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas com maravalhas, à temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade ( $60 \pm 10\%$ ), com ciclos claro/escuro de 12 horas, controlados automaticamente e em ambiente com exaustão de ar. Os camundongos foram alimentados com ração comercial padrão para roedores (Nutri Laboratório Roedores - Nutriave) *ad libitum* e tiveram livre acesso a água potável até o início do tratamento. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA - UVV, protocolo nº 403-2016).

### 2.2 Grupos e Protocolo Experimental

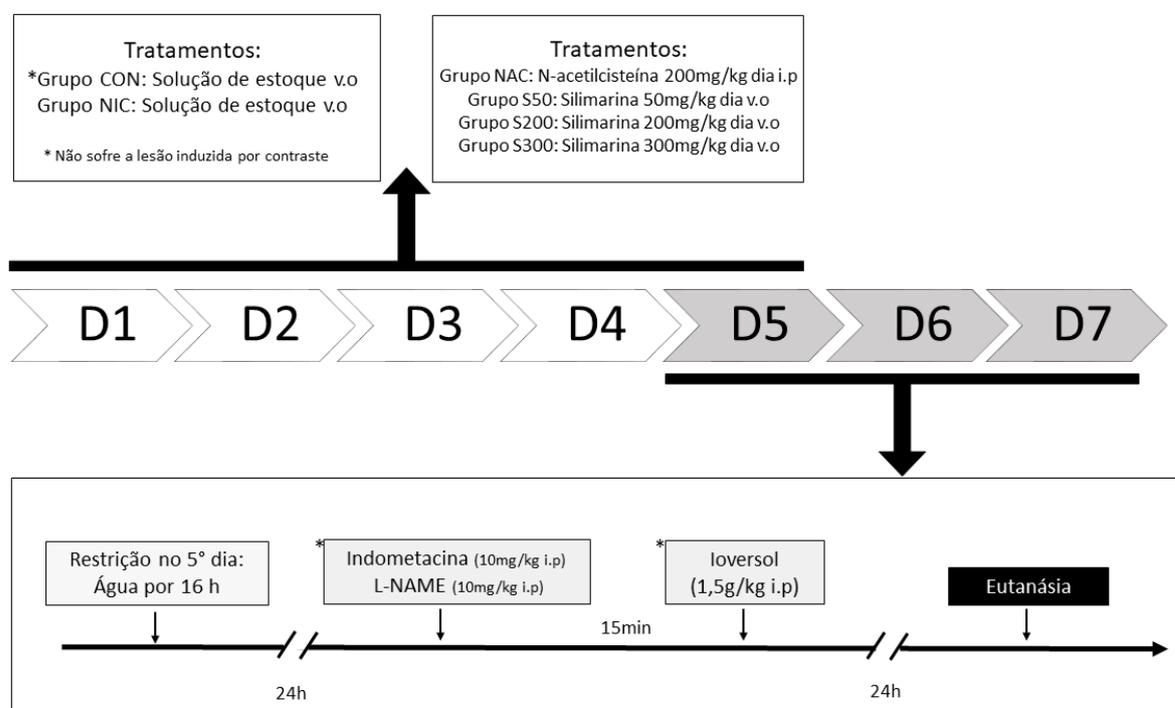
Para indução da CIN foi usado um modelo previamente validado em camundongos que produz de forma confiável nefropatia de acordo com Bôa *et al.* (2015). Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: Grupo Controle (CON; n=12), Grupo Nefropatia Induzida por Contraste (NIC; n=12), Grupo N-acetilcisteína 200 mg/kg (NAC; n=12), Grupo Silimarina 50 mg/Kg (SIL 50; n=12), Grupo Silimarina 200 mg/Kg (SIL 200 100; n=12) e Grupo Silimarina 300 mg/kg (SIL 300; n=12). Os camundongos dos grupos SIL 50, SIL 200 e SIL 300, receberam a silimarina através de gavagem por 5 dias consecutivos.

A silimarina utilizada nos tratamentos foi adquirida da empresa Sigma, (S0292, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e diluída na solução veículo (água e propilenoglicol na proporção 1:1) nas concentrações de 7,5 mg/ml, 30 mg/ml e 45 mg/ml, manipuladas ao abrigo da luz e descartadas a cada 48 horas.

Durante o mesmo período, os grupos controle e NIC receberam a solução veículo por gavagem em substituição à Silimarina. O grupo NAC recebeu por via intraperitoneal (i.p) N-acetilcisteína. Após o 5º dia, todos os grupos foram privados de água por 16h e a partir deste tempo foi induzida a nefropatia.

A CIN foi induzida conforme a figura abaixo (figura 1), com associação de 3 substâncias: 1) indometacina, um inibidor da cicloxigenase (10 mg/kg i.p., dissolvido em dimetilsufóxido), 2) L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster), um inibidor não

seletivo da óxido nítrico sintase, (10 mg/kg i.p., dissolvido em solução salina) e após 15 minutos, 3) o radiocontraste ioversol, monomérico e de baixa osmolaridade (Optry 320, 1,5 g de iodo/kg i.p.). Convém salientar que os camundongos do grupo controle receberam administrações intraperitoneais de salina em substituição a injeção de ioversol. Após 24 horas da indução da lesão os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil, 100 mg/Kg). A coleta de sangue se fez por punção cardíaca no ventrículo direito para dosagens bioquímicas, AOPP, citometria de fluxo e ensaio do cometa alcalino. A remoção do rim foi realizada para análises histológicas e dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo (citometria de fluxo).



**Figura 1.** Organograma cronológico dos experimentos. As letras D1-D7 correspondem aos dias do experimento. D1-D5: tratamento dos animais com solução estoque por gavagem, n-acetilcisteína por via intraperitoneal ou silimarina via gavagem. D5 e D6: representam os dias de indução da nefropatia por contraste; as caixas retangulares acima representam os tratamentos realizados para cada grupo durante os 5 primeiros dias e a caixa inferior a ordem cronológica ampliada sobre a indução da CIN até a eutanásia do animal (D7).

### 2.3 Medida indireta da pressão arterial

A aferição da pressão arterial sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca foi realizada durante o período experimental: antes da indução da

nefropatia, para avaliar se haveria variações pressóricas entre os animais como controle interno entre os grupos.

A avaliação foi realizada através de medida indireta por pletismografia de cauda (CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, KENT Scientific CO., Connecticut, USA), em todos os grupos. Os animais permaneciam acordados, em repouso, em ambiente livre de ruído e mantidos sob restrição de movimentos em uma câmara cilíndrica de acrílico colocada sobre uma manta de aquecimento para que as medidas fossem realizadas (Fernandes *et al.*, 2012). A temperatura do animal foi mantida entre 32°C a 36°C.

O pletismógrafo de cauda (figura 2) consiste em um manguito de borracha (cuff) que é adaptado à região proximal da cauda do animal e fica conectado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300 mmHg. Na região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de pressão arterial na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de dados.

Foram obtidas 35 medidas para cada animal no 5º dia de tratamento, sendo que as 5 primeiras medidas eram descartadas. Para evitar erros de medida e análise, os camundongos foram previamente submetidos à ambientação com a técnica de medida e aclimatação de 5 minutos antes de iniciar as medidas. A adaptação dos animais ao pletismógrafo foi realizada no 4º dia de tratamento. Foram utilizadas no mínimo 10 medidas para o cálculo da média dos parâmetros hemodinâmicos.



**Figura 2.** Pletismógrafo de cauda (CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, KENT Scientific CO., Connecticut, USA). Fotos da própria autora.

## **2.4 Análises bioquímicas**

O sangue coletado por meio de punção cardíaca foi imediatamente transferido para tubos de poliestireno contendo 30 uL de EDTA 0,33 mol/L e homogeneizados por inversão vagarosa. Posteriormente foi centrifugado por 10 minutos a 4.000 g e o plasma coletado e armazenado a -80°C até a análise. As concentrações séricas de creatinina, ureia e cistatina C foram dosadas com seus respectivos kits e todas as medidas foram realizadas por métodos laboratoriais padronizados em parceria com o laboratório de Análises Clínicas Tommasi.

## **2.5 Preparo das amostras para citometria de fluxo e cometa alcalino**

### **2.5.1 Isolamento de células renais**

As amostras de rim separadas para análise de citometria de fluxo foram preparadas com base em estudos anteriores e padronizados no laboratório da Universidade (Gomes *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2016). Resumidamente, os tecidos foram grosseiramente picados usando tesoura cirúrgica e incubados com 1 mL de solução de isolamento contendo tripsina (Sigma-Aldrich: 0,5% trypsin, 0,2% EDTA) para dissociar as células. Em seguida, a suspensão celular foi filtrada através de

uma tela de nylon (BD, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA, Falcon 70  $\mu\text{m}$ ) para remover os debris celulares. Por fim, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspendidas em solução de congelamento contendo soro fetal bovino (95%) e DMSO (5%) e então congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  ate análise posterior.

### *2.5.2 Lise de hemácias*

Para as células sanguíneas utilizadas para os ensaios de citometria de fluxo e cometa alcalino houve a necessidade de congelamento das amostras a  $-80^{\circ}\text{C}$  e para armazenlas, foi necessário realizar a lise de hemácias após a coleta de sangue dos animais. O sangue foi coletado conforme descrito no item 2.4 e segundo o protocolo, foi realizada em laboratório a lise, que consistiu em adicionar em um de tubo de poliestireno: 50  $\mu\text{L}$  de sangue total de cada amostra e 50  $\mu\text{L}$  de solução livre de magnésio. Em seguida os tubos foram homogeneizados com uso do vortex e centrifugados a 4.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado dos tubos cuidadosamente e adicionado ao tubo 1 mL de solução de lise com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (8,9 g/L) a temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas e após, foram incubadas durante 10 minutos em banho-maria com controle de temperatura ( $37^{\circ}\text{C}$ ) e abrigadas da luz. Após a incubaco a solução de lise foi retirada e a amostra ressuspendida em solução de congelamento (95% de SFB e 5% DMSO) e congelada para análise posterior.

## **2.6 Determinaco dos níveis citoplasmáticos de EROs no sangue e rim**

As espécies reativas de oxignio (EROs), ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxinitrito/hidroxila ( $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$ ) foram medidas por citometria de fluxo de células renais e sanguíneas após isoladas como descrito anteriormente.

Por meio da mediana de intensidade de fluorescência emitida pelos marcadores dihidroetdeo (DHE), 2',7' - diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e hidroxifenilfluorescena (HPF), respectivamente os níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  foram medidos através da fluorescência emitida pelo etídeo, um produto da oxidao do dihidroetídio ou hidroetidina. O DHE, que é a forma reduzida do brometo de etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o  $\bullet\text{O}_2^-$  formando etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420 nm), entretanto quando oxidado  etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificaco da fluorescência vermelha (518 - 605 nm). A produo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi estimada por meio da fluorescência emitida pela

diclorofluoresceína (DCF) que é um produto da oxidação do 2',7' - diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) um éster, não fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. No interior da célula sofre ação das esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que por sua vez pode ser oxidado pelo  $H_2O_2$  formando um composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que pelo fato de ser uma molécula apolar fica aprisionado no interior da célula (Campagnaro, 2012; Tonini et al., 2013).

As células foram ressuspensas em 1mL de PBS na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. As amostras foram incubadas, no escuro, com 20  $\mu$ L de solução de DCF-DA (10  $\mu$ M) e 20  $\mu$ L de DHE (160  $\mu$ M), por 30 minutos à 37°C. Para a determinação das espécies altamente reativas ( $\bullet ONOO^- / \bullet OH^-$ ) as amostras foram incubadas com o corante HPF 5  $\mu$ M. Para o controle positivo, foi utilizado  $H_2O_2$  50  $\mu$ M por 5 minutos e para controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em PBS. Após a marcação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas com PBS e mantidas ao abrigo da luz até a aquisição dos dados no citômetro.

A aquisição dos dados foi realizada com citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com laser de 488 nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 585/42 nm para DHE e 530/30 nm para DCF e HPF.

## **2.7 Produtos Proteicos de Oxidação Avançada**

Os Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP) foram descritos primeiramente por Witko-Sarsat *et al.* (1996) e reconhecidos como marcadores de estresse oxidativo que contribuem para inúmeras complicações no organismo (Witko-Sarsat *et al.*, 1998 e Yu *et al.*, 2017). Os AOPP são gerados por meio da ação do estresse oxidativo por uma família de proteínas e aminoácidos que contém di-tirosina, formados pela interação de oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas com o plasma e carregados pela albumina nos seres vivos (Coutinho *et al.*, 2017). Para a determinação dos níveis dos produtos de oxidação proteica foi necessária a diluição do plasma 1:10 em PBS sem necessidade de preparo prévio. 40  $\mu$ L das amostras foram acrescentados a 160  $\mu$ L de PBS, 10  $\mu$ L de iodeto de potássio (KI) e 20  $\mu$ L de ácido acético glacial em uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 340nm, em um leitor de microplacas (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) após agitação por seis minutos, contra o branco contendo 200  $\mu$ L de PBS, 20  $\mu$ L de

ácido acético e 10 µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados foram expressos em µM de cloramina T/mg proteína. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

## **2.8 Ensaio Cometa Alcalino**

O Ensaio do Cometa Alcalino é uma técnica para quantificar a fragmentação do DNA das células em organismos eucariotos, sendo aplicada em testes para monitorar a genotoxicidade de compostos químicos, contaminação ambiental por toxinas e para biomonitoramento (Collins, 2004). A técnica é validada para avaliar o dano do DNA em células individuais (Rodrigues *et al.*, 2013), foi desenvolvida em 1984 por Ostling e Johanson usando um pH neutro que limitava seus experimentos (Ostling e Johanson, 1984). Porém Singh em 1988 aprimorou a técnica utilizando o pH básico (pH >13) que aumenta a velocidade de migração do DNA (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). O ensaio cometa foi realizado em amostras de células sanguíneas, após coleta de sangue por punção cardíaca, realizada a lise de hemácias para então serem congeladas à -80°C.

### **2.8.1 Preparo das lâminas**

Foram utilizadas lâminas de vidro com extremidade fosca que receberam, previamente, um filme de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point Agarose* - NMA) 1,5% a 65°C, secaram a temperatura ambiente por 24 horas e foram armazenadas à 4°C. O preparo das lâminas com o material biológico foi realizado com 30 µL de amostra -  $2 \times 10^4$  células que foram misturadas a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose* - LMA) a 1% dissolvida em PBS e mantida a 37°C em banho-maria. O material contendo LMA e a suspensão celular foi espalhado sobre as lâminas previamente gelatinizadas, essas lâminas foram então cobertas com lamínulas e resfriadas à 4°C por cerca de 20 minutos até a polimerização da agarose (Campagnaro, 2008).

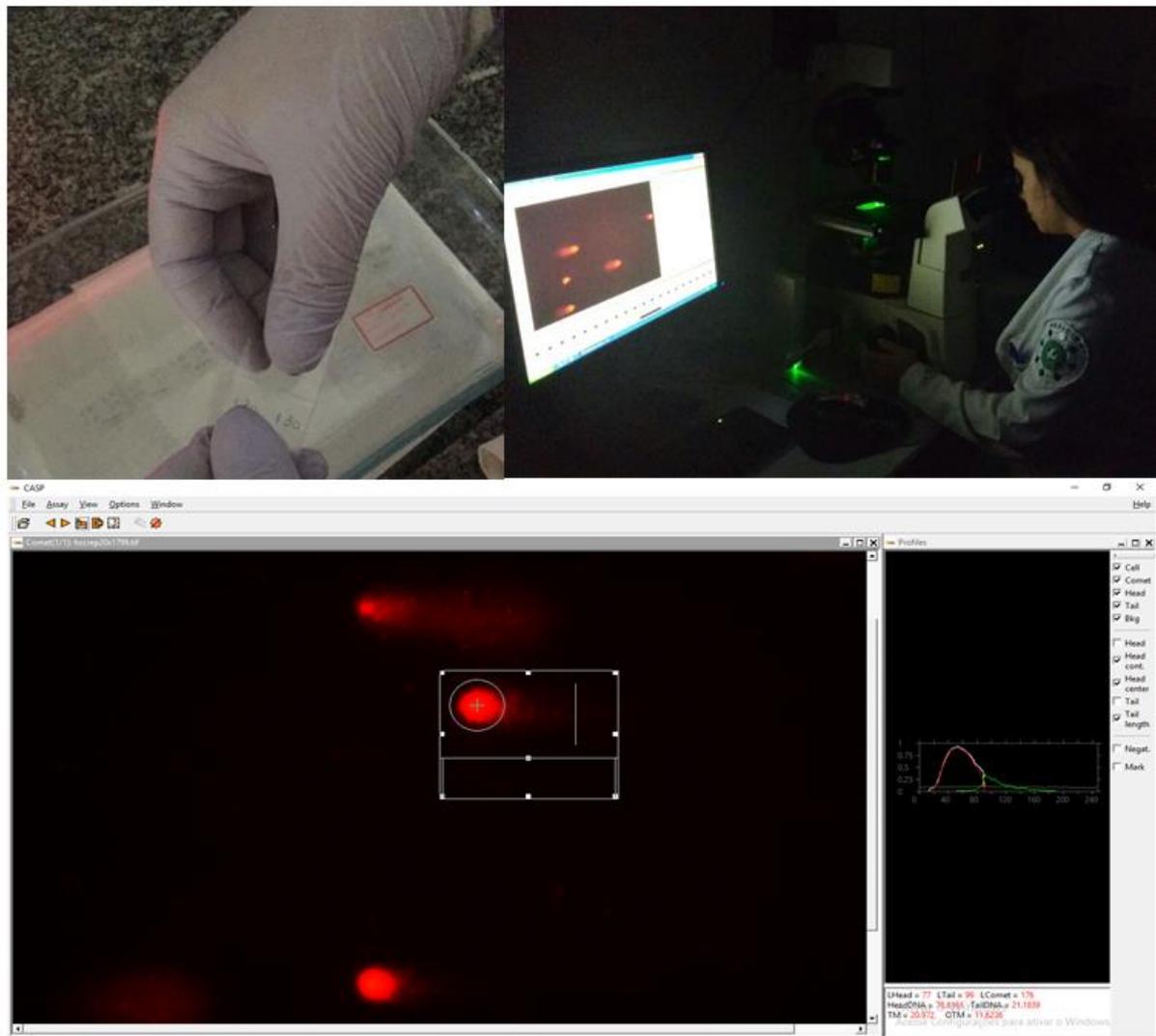
### **2.8.2 Lise, desenovelamento e eletroforese**

Após a gelatinização, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram submersas em solução de lise contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, gelada e recém preparada. O tempo de lise foi de 1 hora, à temperatura de 4°C e protegida da luz, com a finalidade de

rompimento das membranas celulares. Com objetivo de inibir as enzimas reparadoras do DNA, as lâminas após a lise foram lavadas com água gelada e posteriormente com PBS e levadas para a cuba eletroforética (Biorad), embebidas com solução tampão de eletroforese alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH >13), gelado (4°C), onde permaneceram em repouso, na ausência de luz, por 40 minutos para a desnaturação das proteínas histonas, o que permitiu o desenovelamento do DNA. A eletroforese foi realizada à 4°C por 20 minutos, à 32 V (1 V/cm) e 300 mA. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (Tris-HCl 0,4 M), lavadas em três ciclos de 5 minutos cada, secadas ao ar e fixadas em álcool metílico 100% por 2 minutos (Campagnaro, 2008).

### 2.8.3 Análise citológica

As análises citológicas foram realizadas no laboratório de Fisiologia Translacional, do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Espírito Santo. As lâminas foram coradas no momento da análise com 30 µL de brometo de etídio (20 µg/mL) e cobertas com lamínulas. As células foram analisadas no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TI, Melville, NY, USA) em objetiva de 20X, com filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm. As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD (Nikon) e salvas em alta qualidade (tiff). As lâminas em duplicata de cada animal, forneceram imagens que foram analisadas com o programa CASP 98 beta2 de domínio público (Konca *et al.*, 2003), entre essas imagens, foram selecionadas 50 células aleatoriamente para cada amostra. Durante a análise das imagens (figura 3), foram excluídos cometas sem cabeças claramente identificáveis, que mostrassem sobreposição ou artefatos, como forma de controle de qualidade. Dentre os vários parâmetros fornecidos pelo programa CASP, utilizamos a porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda para análise do dano ao DNA.



**Figura 3.** Etapas do ensaio cometa alcalino. Preparo das lâminas, análise das lâminas em microscópio de fluorescência e detalhe da interface do programa CASP com o cometa selecionado e a análise do seu perfil. Fotos da própria autora.

### **2.9 Determinação da viabilidade e apoptose**

Para determinar a viabilidade e apoptose de células renais as amostras foram marcadas com o reagente Annexin V-FITC *Apoptosis Detection Kit* (BP Pharmingem, San Diego, CA, USA), que é composto pela proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante intracitoplasmático iodeto de propídio (PI), seguida de análise em citômetro de fluxo. As análises foram realizadas no laboratório de Fisiologia Translacional, do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Espírito Santo.

Esse ensaio baseia-se na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípídio fosfatidilserina (FS). Esses resíduos são predominantemente observados na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol, quando a célula é viável. No entanto, ao iniciar o processo de morte celular

programada (apoptose), esses resíduos são translocados para a face externa da membrana, o que permite a sua ligação com a anexina V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é utilizado para distinguir células viáveis de não viáveis, pois células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis (Campagnaro, 2012). Além disso, segundo Campagnaro (2012) a exposição simultânea à anexina V e ao PI permite quantificar a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose, as quais expõem a FS na face externa na membrana plasmática com conseqüente marcação com anexina V (anexina V+/PI-). Células em estágio tardio de apoptose ou necrose, que além da exposição da FS, devido ao colapso da membrana plasmática apresentam permeabilidade ao PI, culminando com adupla marcação celular (anexina V+/PI+); e células danificadas, em necrose (anexina V-/PI+).

Para tal protocolo, foram retiradas alíquotas de 200 µL de células renais que foram centrifugadas por 10 minutos a 150 g Em seguida, ressuspensas em 400 µL de tampão *Binding Buffer* 10% (10 mmol HEPES, NaOH, pH 7,4, 140 mmol NaCl, 2,5 mmol CaCl<sub>2</sub>) na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/mL. A seguir, 100 µL desta solução (1x10<sup>5</sup> células) foram transferidas para um novo tubo, onde receberam 2 µL de anexina V-FITC e 2 µL 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 150 g e por fim, 400 µL de PBS com 10% soro fetal bovino (SFB) foram adicionados a cada tubo e as amostras avaliadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA). Os dados foram analisados com auxílio do software FACSDiva (BD) e os histogramas de sobreposição foram analisados por meio do FCS Express software trial pela determinação da porcentagem de células encontradas em cada quadrante do gráfico *dot plot*, sendo, Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Apoptose (positiva para anexina e PI); Q3: células viáveis (negativa para anexina e PI); Q4: apoptose inicial (Positiva para anexina e negativa para PI). Para cálculo da taxa de apoptose total foram somados quadrantes Q2+Q4 (Campagnaro, 2012; Tonini *et al.*, 2013).

### **2.10 Análises histológicas**

Para avaliar a lesão tecidual aos rins – desorganização celular, atrofia glomerular, dilatação, vacuolização e presença de debris nos túbulos renais (Lee *et*

*al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013) os mesmos foram retirados após a perfusão com solução tampão PBS seguida da perfusão com solução de paraformaldeído a 4%.

As amostras de rins dos diferentes grupos após a fixação em paraformaldeído, foram refrigeradas até a análise. Os rins foram seccionados em duas partes longitudinalmente, utilizando-se lâmina de barbear para que fosse possível realizar a histologia e microscopia eletrônica de varredura.

### 2.10.1 Microscopia Óptica

As amostras de tecido renal, após seccionadas foram desidratadas em série de etanóis e, concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão na parafina. Em seguida, os blocos foram seccionados no micrótomo (Leica, German) com seções de 3,5µm de espessura, aderidas as lâminas, as quais foram corados com hematoxilina eosina (HE) padrão.

A HE cora em azul-arroxeadado as estruturas basófilas e em roseo-avermelhado as estruturas acidófilas. As imagens das seções coradas foram obtidas utilizando-se o microscópio óptico (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA) usando objetivas de 10x, 20X e 40x, e câmera digital (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Germany), acoplada a um sistema computadorizado. As análises foram realizadas em parceria com o laboratório de Ultraestrutura celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR).

A lesão tubulointersticial (TILI), que se caracteriza por atrofia tubular, espessamento da membrana basal, dilatação, vacuolização e presença de debris protéicos nos túbulos renais, foi avaliada por análise semiquantitativa de acordo com Bôa *et al.* (2015). Primeiramente, vinte campos da lâmina de cada animal foram examinados com aumento de 400x e graduados de acordo com uma escala de 0 a 4: Grau 0, sem lesão túbulointersticial; Grau 1, <25% de lesão foi encontrada nos túbulos; Grau 2, 25 a 50% do tubulointerstício lesionado; Grau 3, 51-75% do tubulointerstício lesionado; e grau 4, 76-100% dos túbulos apresentavam lesões.

O índice de TILI foi calculado para cada animal multiplicando-se o número de campos com grau I pelo numeral um, com grau II por dois, III por três e IV por quatro. Por fim, esses valores foram somados e divididos pelo número de 20 campos avaliados, incluindo aqueles com escore de grau zero. Todas as seções foram examinadas por pesquisadores cegos para os grupos experimentais das amostras.

### 2.10.2 Microscopia eletrônica de varredura

Para o preparo, cada amostra foi lavada 3 vezes com tampão cacodilato (0,1 M; pH 7,2) durante 30 minutos, pós-fixada em solução de 1% de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) e 1,25% de ferrocianeto de potássio por 1 hora à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas, 1 vez em tampão cacodilato por 30 minutos cada lavagem e 2 vezes em água ultrapura também por 30 minutos. Após, foram desidratados em gradiente ascendente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e PA) por 30 minutos cada, submetidos a secagem por ponto crítico em CO<sub>2</sub> (Autosandri-815, Tousimis), revestidos com 10 nm de ouro puro num dispositivo de revestimento por aspensão sob vácuo (Desk V, Denton Vacuum) e estudados utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV) de modo direto (figura 4).



**Figura 4.** Etapas da microscopia eletrônica de varredura. A) Capela onde as amostras são preparadas, B) Secagem das amostras em ponto crítico com CO<sub>2</sub> C) Metalização das amostras com ouro D) Rins já metalizados dispostos para serem analisados E) Microscópio eletrônico de varredura no qual as amostras são inseridas, à direita, interface no computador. Fotos da própria autora.

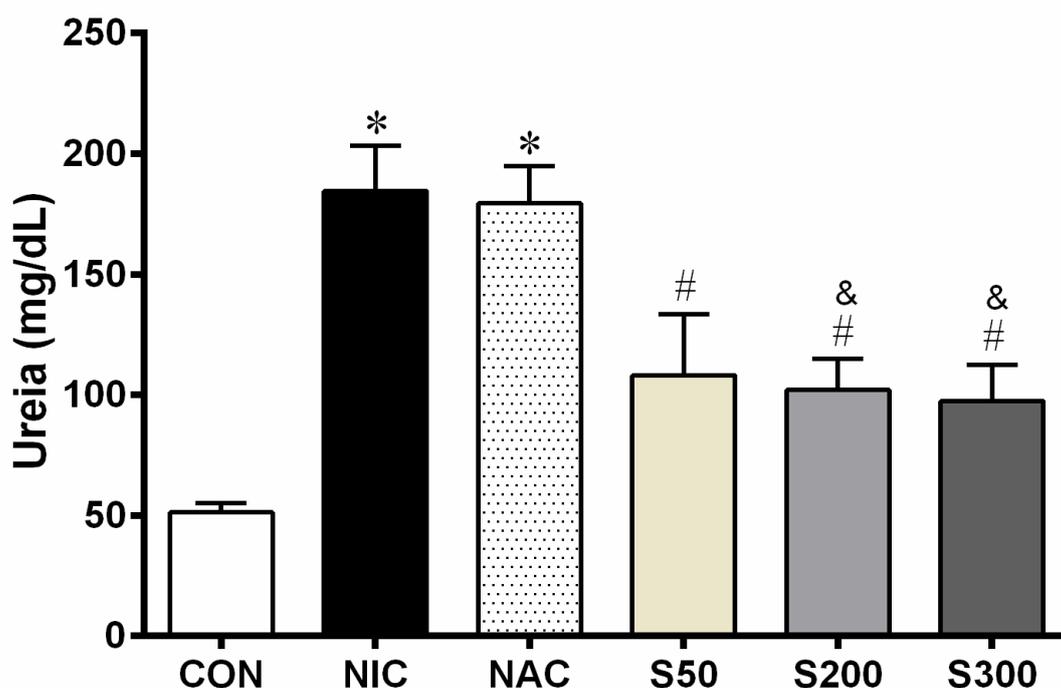
### **2.11 Análises estatísticas**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey, usando o *software* Prisma (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Silimarina atenua a lesão renal aguda induzida pela nefropatia induzida por contraste (CIN) nos camundongos suíços

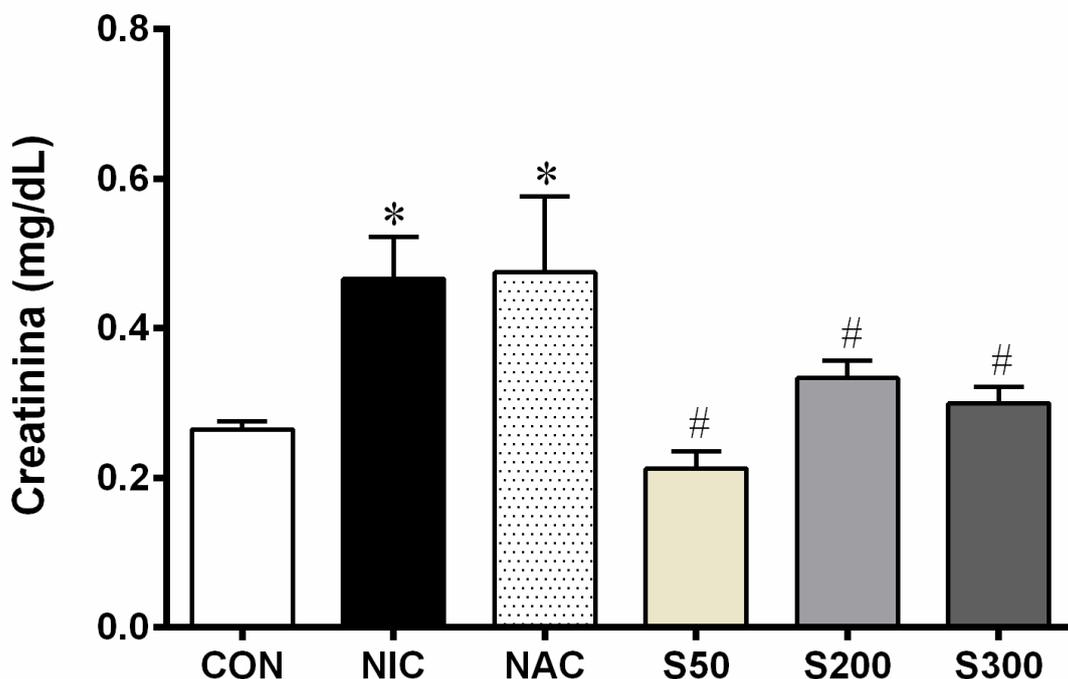
Conforme esperado, a nefropatia induzida pelo contraste promoveu aumento nos valores da ureia plasmática no grupo NIC ( $184,4 \pm 18$  mg/dL,  $p < 0,05$ ). Além disso, os resultados obtidos indicam que de uma forma dose-dependente, o tratamento preventivo com a silimarina no modelo de CIN foi capaz de diminuir a lesão renal mediada por contraste, observada pela redução dos níveis séricos de ureia (S50:  $108 \pm 26$ ; S200:  $102 \pm 13$  e S300:  $98 \pm 15$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) evidente na figura 5. O tratamento com silimarina nas maiores doses também foram significantes em relação ao grupo NAC ( $180 \pm 15$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) evidenciando melhor resposta à CIN.



**Figura 5.** Quantificação de uréia plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 9-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON, # $p < 0,05$  vs. grupo NIC e & $p < 0,05$  vs. grupo NAC (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

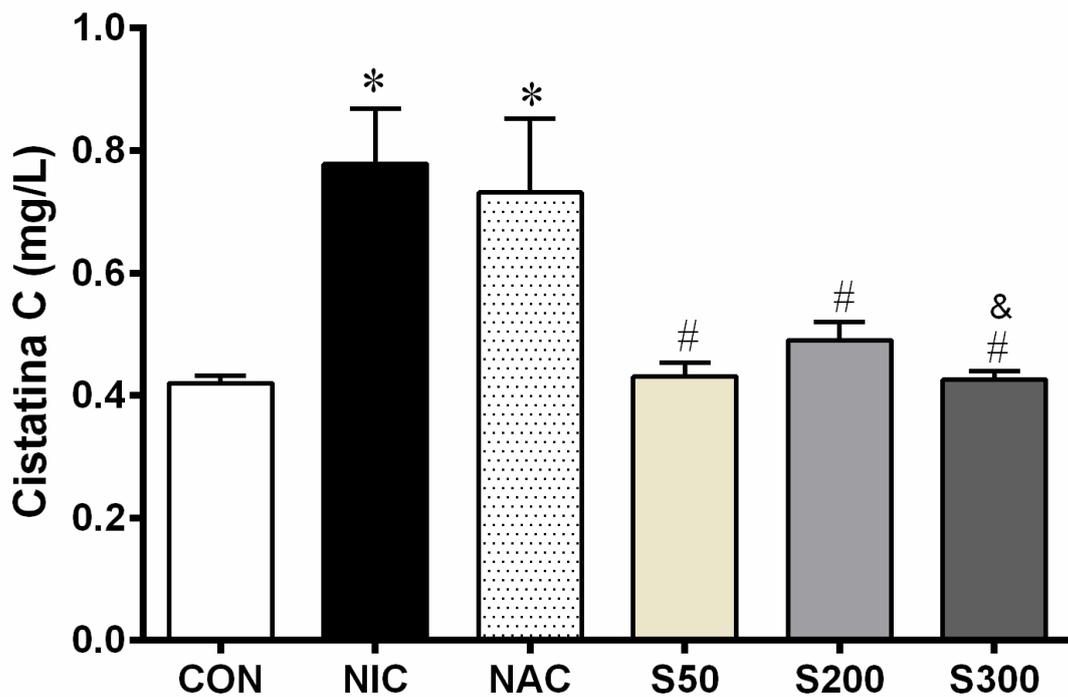
Quanto ao outro biomarcador clássico de função renal, a figura 6 exhibe os valores de creatinina sérica. Os grupos NIC e NAC apresentaram valores aproximadamente 2 vezes maiores quando comparados ao controle ( $0,47 \pm 0,1$  e  $0,46 \pm 0,05$  mg/dL,  $p < 0,05$  respectivamente). Entretanto, o tratamento com

silimarina impediu o aumento da creatinina mesmo com a menor dose (S50:  $0,21 \pm 0,02$ ; S200:  $0,33 \pm 0,02$  e S300:  $0,3 \pm 0,02$  mg/dL,  $p < 0,05$ ).



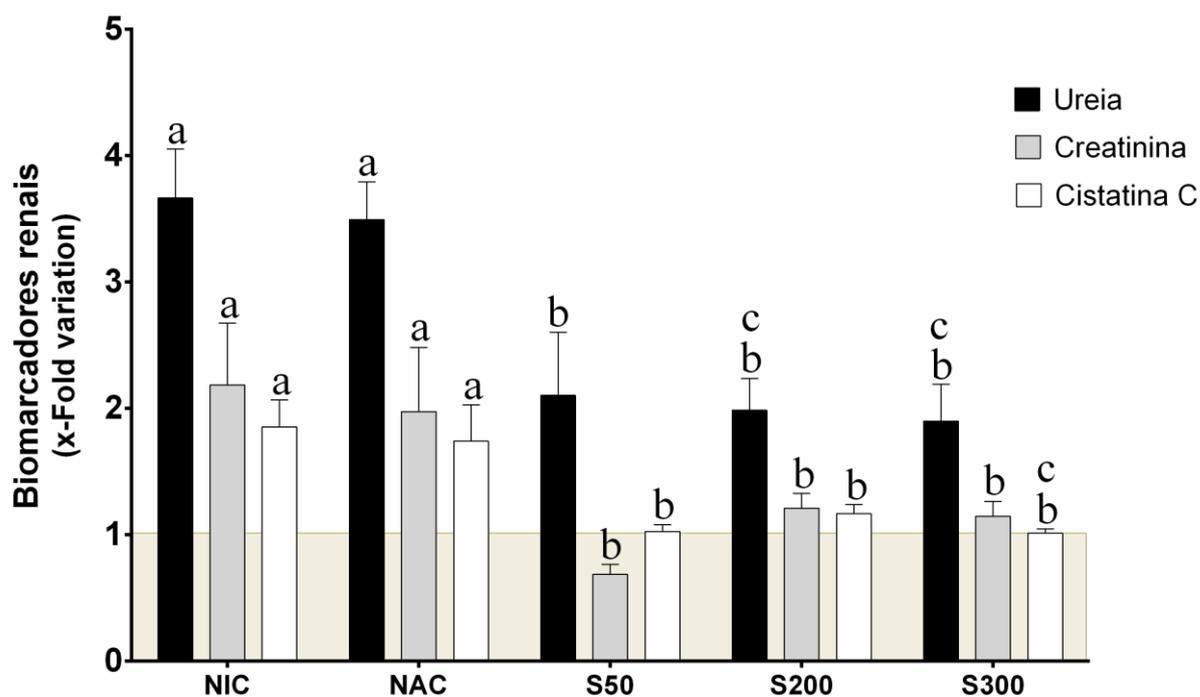
**Figura 6.** Quantificação de creatinina plasmática nos grupos experimentais. Gráfico de dispersão: os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

A análise da cistatina C (figura 7), mostrou redução dos seus valores nos grupos tratados com silimarina em relação ao NIC (CON:  $0,42 \pm 0,01$ , NIC:  $0,77 \pm 0,2$ , S50:  $0,43 \pm 0,02$ , S200:  $0,49 \pm 0,03$  e S300:  $0,42 \pm 0,01$  mg/L,  $p < 0,05$ ), mas apenas o grupo S300 apresentou redução significativa da cistatina C, em comparação ao grupo NAC (NAC:  $0,73 \pm 0,1$  mg/L,  $p < 0,05$ ), se aproximando aos valores basais do grupo controle.



**Figura 7.** Quantificação de cistatina C plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC e & $p < 0,05$  vs. grupo NAC (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

A figura 8 resume os valores médios dos principais parâmetros séricos para estimar a função renal. Como esperado, o grupo NIC exibiu um aumento significativo de uréia (3,7 vezes), creatinina (2,1 vezes) e cistatina C (1,8 vezes). A silimarina foi capaz de prevenir a lesão renal mediada por contraste ( $p < 0,05$ ), observada pela redução dos níveis séricos de ureia (S50:  $108 \pm 26$ ; S200:  $102 \pm 13$  e S300:  $98 \pm 15$  mg/dL,  $p < 0,05$ ), creatinina (S50:  $0,21 \pm 0,02$ ; S200:  $0,33 \pm 0,02$  e S300:  $0,3 \pm 0,02$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) e cistatina C (S50:  $0,43 \pm 0,02$ ; S200:  $0,49 \pm 0,03$  e S300:  $0,43 \pm 0,01$  mg/L,  $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo NIC. Especificamente, apenas o grupo S300 apresentou redução significativa de uréia e cistatina C em comparação ao grupo NAC ( $p < 0,05$ ).

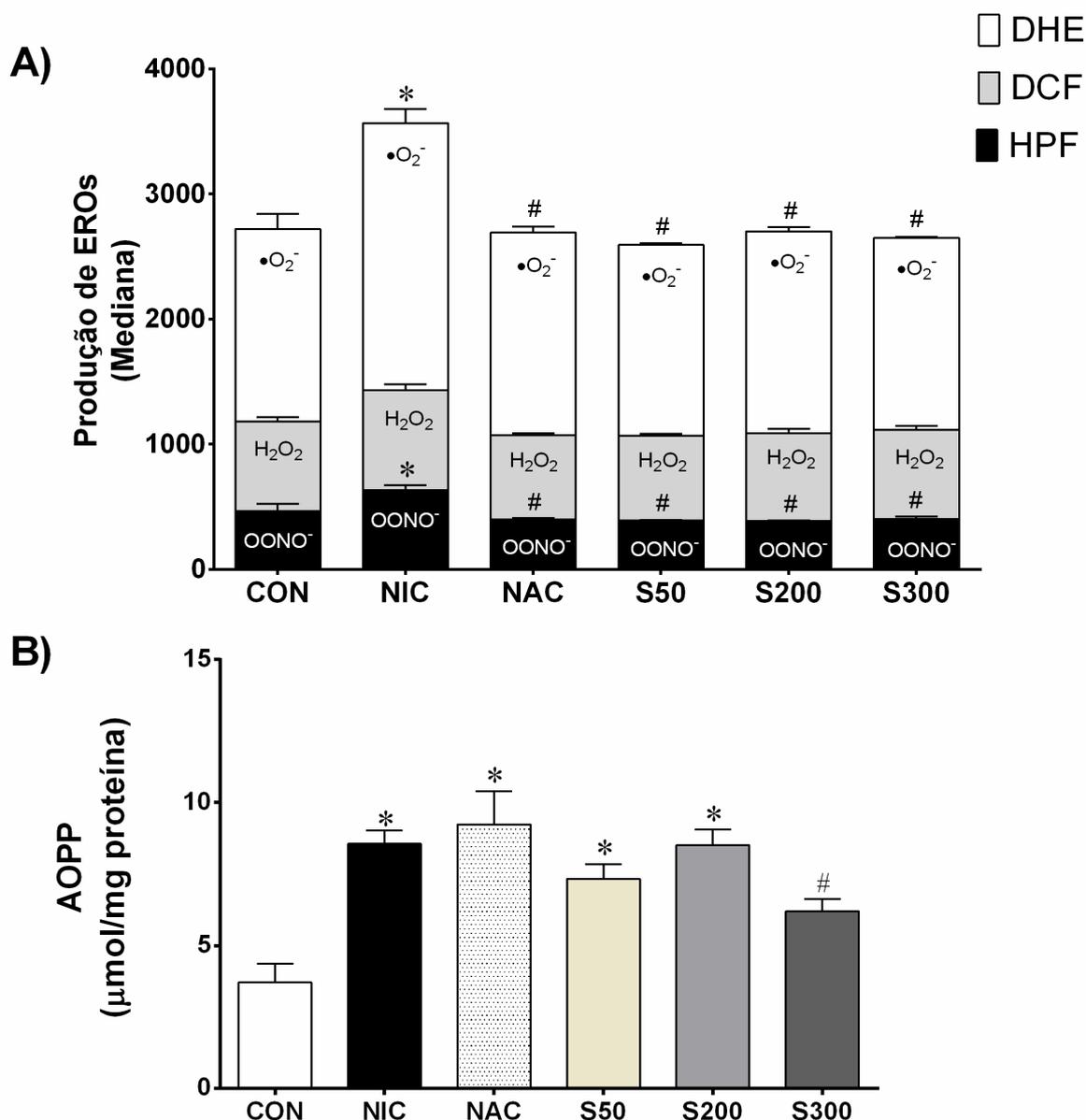


**Figura 8.** Efeitos renoprotetores da silimarina contra a nefropatia induzida por radiocontraste. Gráfico de barras representando a média dos principais biomarcadores da função renal. O grupo NIC mostra um incremento notável na ureia sérica, creatinina e cistatina C. Ao contrário do grupo NAC, a silimarina diminuiu de forma dose-dependente esses biomarcadores (50, 200 ou 300 mg/Kg). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. grupo CON; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. grupo NIC; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. grupo NAC (ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey).

### 3.2 Silimarina previne o estresse oxidativo após indução da CIN nos camundongos suíços

Para quantificar a produção de radicais livres  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $\cdot OH-/ONOO^-$ , em glóbulos brancos do sangue, foi utilizada a citometria de fluxo com indicadores DHE, DCF e HPF (respectivamente) em todos os grupos estudados. Conforme resumido no gráfico de barras da Figura 9A, observou-se um aumento na produção de EROs sanguíneas no grupo NIC (DHE: 39%, DCF: 21%, HPF: 36%) em comparação com camundongos controle (DHE:  $1540 \pm 120$ , DCF:  $691 \pm 38$ , HPF:  $465 \pm 60$  au,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, todos os tratamentos (NAC e todas as doses de silimarina administradas) impediram o aumento da biodisponibilidade sérica de  $\cdot O_2^-$  (NAC:  $1619 \pm 47$ ; S50:  $1523 \pm 15$ ; S200:  $1614 \pm 32$ ; S300:  $1535 \pm 10$  au,  $p < 0,05$ ),  $H_2O_2$  (NAC:  $672 \pm 17$ ; S50:  $677 \pm 15$ ; S200:  $701 \pm 34$ ; S300:  $709 \pm 27$  au,  $p < 0,05$ ) e  $\cdot OH-/ONOO^-$ , (NAC:  $401 \pm 13$ ; S50:  $393 \pm 4$ ; S200:  $386 \pm 5$ ; S300:  $405 \pm 17$  au,  $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo NIC.

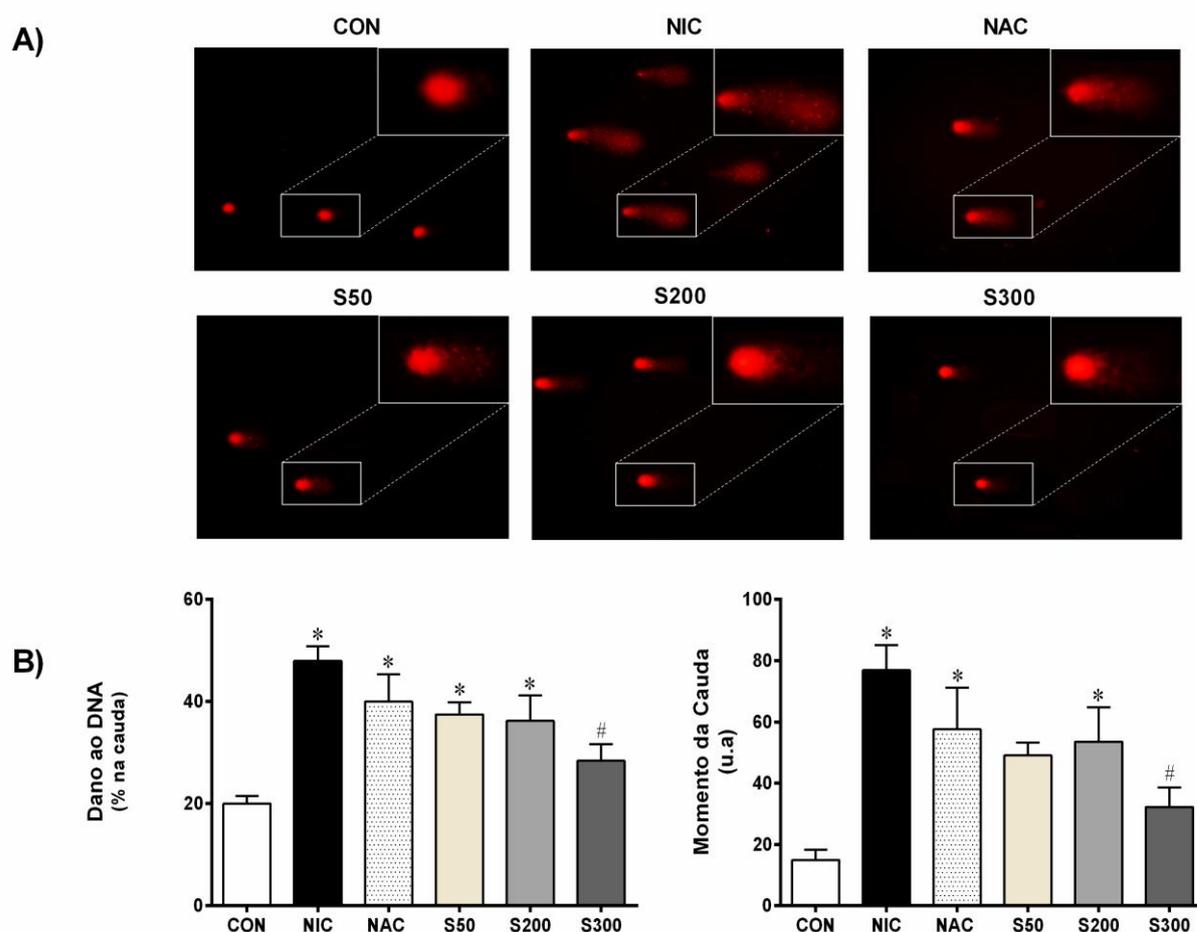
De acordo com a Figura 9B, o grupo NIC apresentou incremento de proteínas oxidadas séricas em comparação ao grupo controle (NIC:  $8,6 \pm 0,5$  vs. CON:  $3,7 \pm 0,74$   $\mu\text{mol/mg}$  proteína,  $p < 0,05$ ). No entanto, o tratamento padrão com NAC não reduziu os níveis séricos de AOPP ( $9,2 \pm 1,1$   $\mu\text{mol/mg}$  de proteína,  $p > 0,05$ ). Em relação à estratégia preventiva da silimarina, apenas a dose mais alta foi mais efetiva que a NAC (S300:  $6,2 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/mg}$  proteína,  $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** A silimarina previne o estresse oxidativo sistêmico em modelo experimental de nefropatia induzida por radiocontraste. A) A produção de EROs no sangue foi avaliada por DHE, DCF e HPF medidos por citometria de fluxo. Gráficos de barras mostrando que, após a NIC, os glóbulos brancos superproduzem as EROs, enquanto que o NAC e todas as doses de silimarina estudadas previnem este efeito. B) Quantificação da oxidação proteica do soro (AOPP), que apenas a silimarina na dose mais alta mostra efeitos antioxidantes. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 7-9$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC (ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey).

### **3.3 Silimarina previne o dano ao DNA nas células sanguíneas no modelo CIN em camundongos suíços**

Como pode ser observado nas figuras 10A e 10B, o dano ao DNA avaliado pelo ensaio cometa, indicou maior dano ao DNA das células sanguíneas no grupo NIC (~ 2,5 vezes) em comparação com camundongos CON ( $20 \pm 2\%$ ,  $p < 0,05$ ). Dentre as estratégias preventivas, o tratamento convencional com NAC e doses menores de silimarina foram semelhantes ao grupo NIC (NAC:  $40 \pm 5\%$  S50:  $37 \pm 2\%$  e S200:  $36 \pm 5\%$ ,  $p > 0,05$ ). Curiosamente, apenas o S300 foi capaz de prevenir o dano ao DNA ( $28 \pm 3\%$ ) em comparação com o grupo NIC ( $48 \pm 3\%$ ,  $p < 0,05$ ). Em relação ao momento da cauda do cometa, um produto do comprimento da cauda e da porção do DNA total na cauda (Rodrigues *et al.*, 2013; Porto *et al.*, 2015), houve um perfil semelhante da primeira análise (Figura 10A): aumento da fragmentação do DNA no grupo NIC ( $77 \pm 8$  a.u.) comparado ao grupo CON ( $15 \pm 3$  a.u.,  $p < 0,05$ ). Apenas a maior dose de silimarina reduziu esse parâmetro ( $32 \pm 6$  a.u.,  $p < 0,05$ ) em comparação com outros grupos (NAC:  $58 \pm 14$ ; S50:  $49 \pm 4$  e S200:  $54 \pm 11$ ,  $p > 0,05$ ).

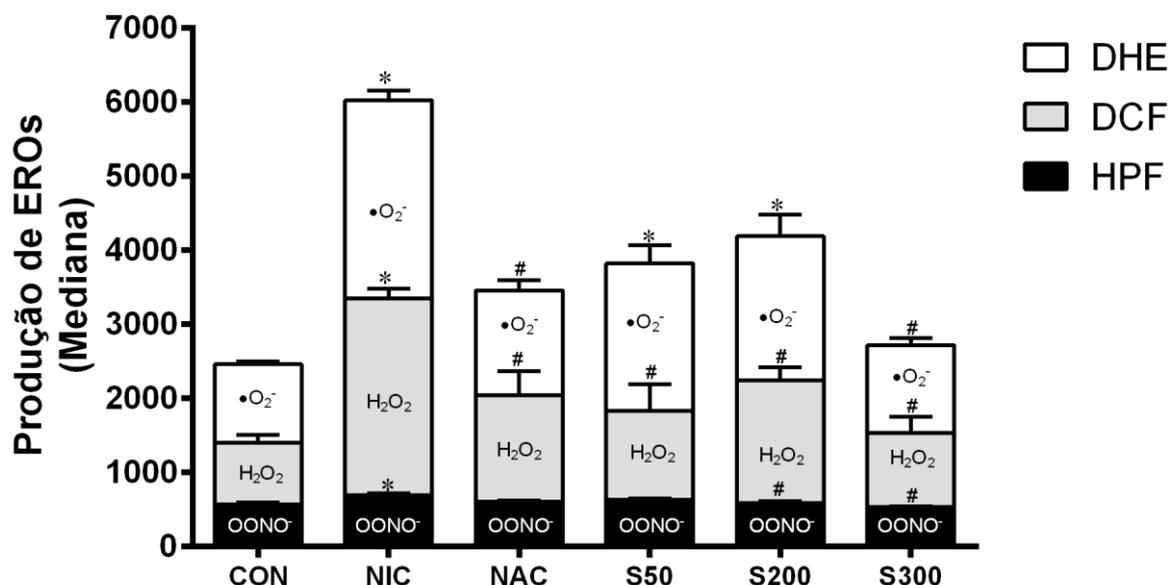


**Figura 10.** Altas dose de silimarina previne danos no DNA em modelo experimental de CIN. A) Cometas típicos mostrando maior fragmentação de DNA no grupo NIC em comparação ao controle o qual contrasta também com o grupo S300, quantificado e representado em gráfico no painel inferior. B) Gráficos de barras mostrando a média da porcentagem de dano ao DNA e momento da cauda (~ 2,5 vezes maior no grupo NIC). Apenas o S300 foi capaz de proteger o DNA das células do sangue. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC (ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tuckey).

### 3.4 Redução do estresse oxidativo em células renais pela silimarina após indução da CIN em camundongos suíços

Também foi investigado o impacto da nefropatia induzida pelo contraste sobre o dano oxidativo em tecidos renais de todos os grupos usando os mesmos indicadores de EROs observados no sangue. A Figura 11 evidencia uma superprodução de EROs no tecido renal do grupo NIC (DHE: 151%, DCF: 220%, HPF: 21%), em comparação com os camundongos do grupo controle (DHE:  $1064 \pm 33$ , DCF:  $830 \pm 107$ , HPF:  $571 \pm 23$  au,  $p < 0,05$ ). No entanto, a prevenção convencional com NAC impediu o aumento dos níveis renais apenas de  $\cdot O_2^-$  e  $H_2O_2$  ( $1417 \pm 136$  e  $1435 \pm 328$  a.u., respectivamente,  $p < 0,05$ ) em comparação com o

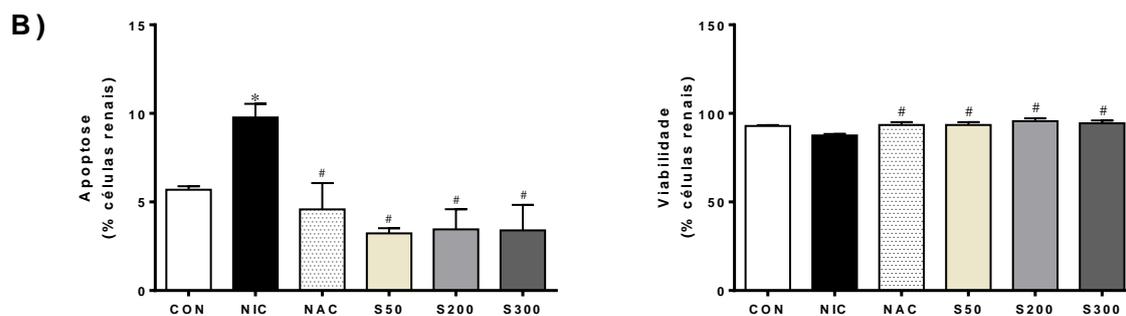
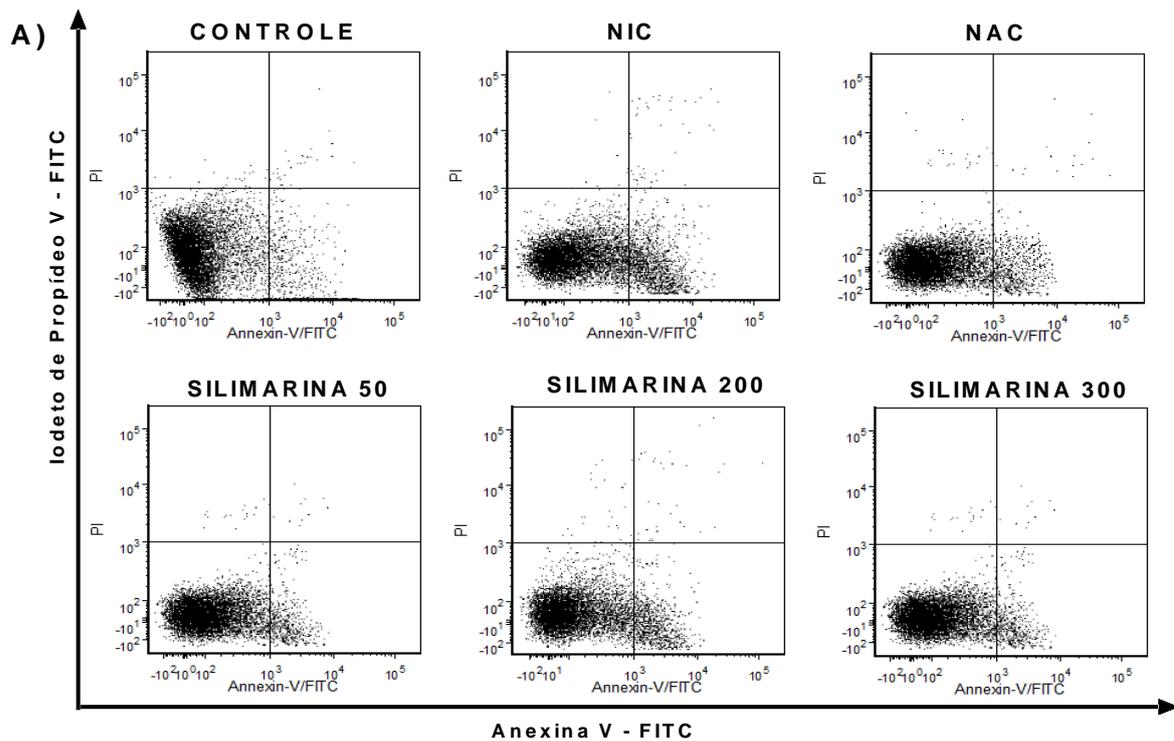
NIC. É interessante ressaltar que a silimarina mostrou uma diminuição dependente da dose no estresse oxidativo, reduzindo significativamente os três biomarcadores de EROs na dose mais elevada (DHE: 1187 ± 92, DCF: 998 ± 221, HPF: 535 ± 6 au,  $p < 0,05$ ) em comparação com grupo NIC.



**Figura 11.** A silimarina previne a formação de EROs nos rins. Gráficos de barras mostrando uma superprodução severa de EROs no NIC, sendo parcialmente revertida pelos grupos NAC, S50 e S200. Apenas silimarina a 300 mg/Kg apresenta redução de  $\bullet O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $\bullet OH^-/ONOO^-$ . Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC (ANOVA de uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

### 3.5 Apoptose e viabilidade em células renais

A apoptose celular foi investigada nas células renais por citometria de fluxo utilizando a coloração com anexina V. A Figura 12A mostra imagens típicas de *dot plots* para cada grupo. Os resultados, na Figura 12B indicam que a silimarina em todas as doses foi capaz de atenuar o número de células apoptóticas (Q2 + Q4) assim como a n-acetilcisteína (grupo NAC) em comparação com o grupo NIC. Quanto à viabilidade celular (Figura 10B), o grupo NIC apresentou viabilidade celular prejudicada em comparação com outros grupos. Observa-se diminuição notável do número de células apoptóticas (Q2+Q4) nos grupos tratados.

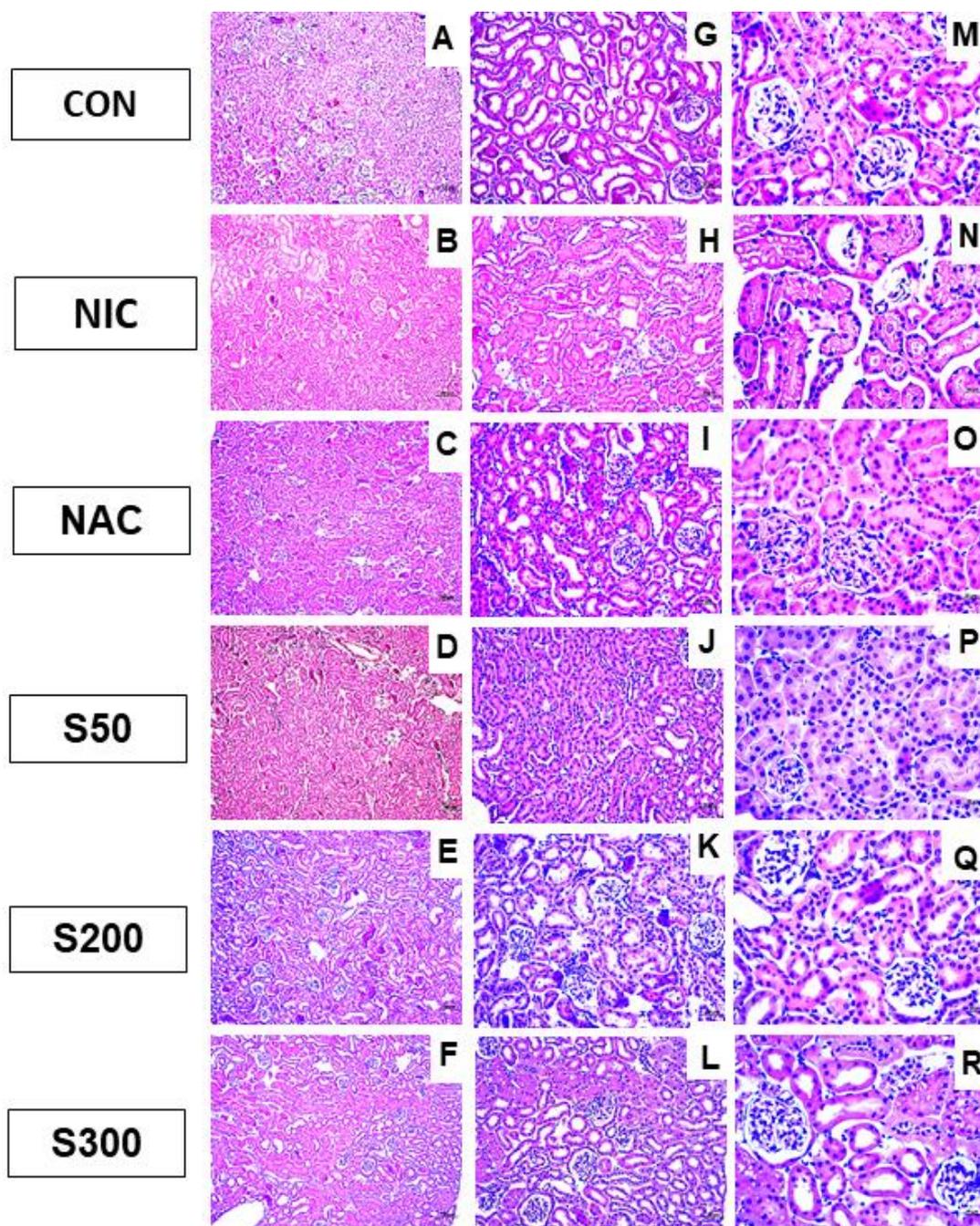


**Figura 12.** A silimarina previne a apoptose e restaura a viabilidade das células renais. A silimarina previne a apoptose e restaura a viabilidade das células renais após NIC em camundongos suíços. A) Gráficos de “dot plots” mostrando o aumento da apoptose em animais do grupo NIC comparados com todos os grupos tratados, determinado através de iodeto de propídio (PI) e anexina V-FITC. B) Gráfico de barras mostrando no painel da esquerda: os índices apoptóticos (Q2 + Q4) de todos os grupos. No painel direito: a viabilidade das células renais, destacando o aumento em relação ao NIC e a prevenção com NAC e silimarina (50, 200 e 300 mg/Kg). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-7$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC (ANOVA de uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

### 3.6 Parâmetros Morfométricos

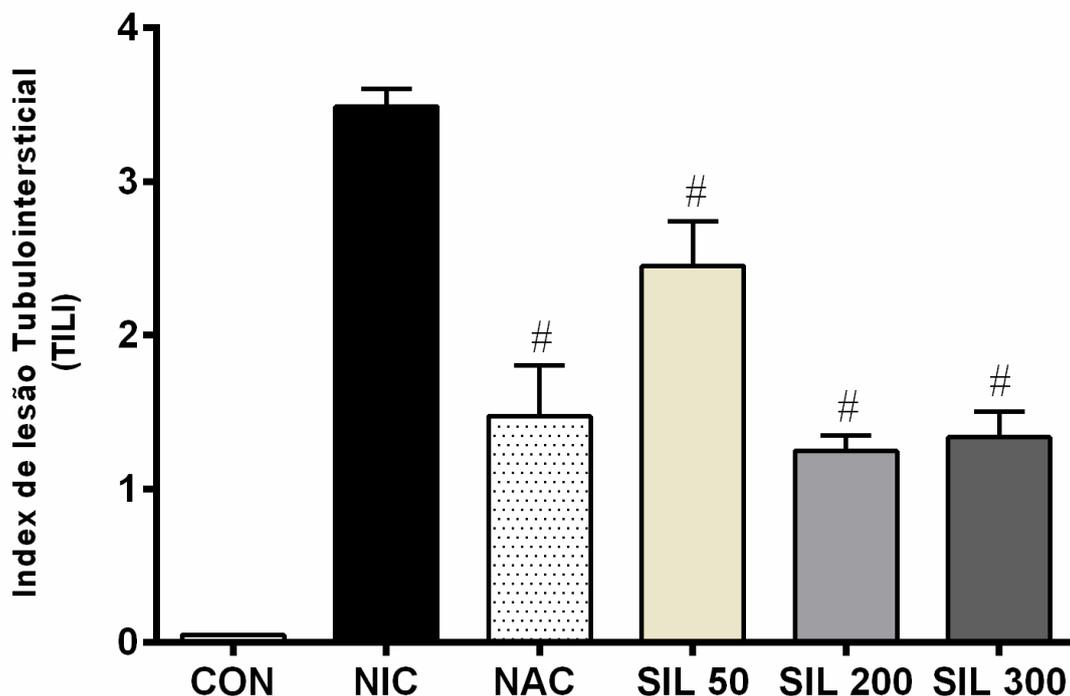
Conforme demonstrado na figura 13, a análise histológica evidenciou que o grupo NIC exibiu danos notáveis na microarquitetura renal. O grupo NIC apresentou aumento do dano glomerular, perda de núcleos, dilatação tubular com congestão luminal, vacuolização de células epiteliais tubulares, presença de debris protéicos na luz tubular e mais lesões tubulointersticiais quando comparados com camundongos

do grupo controle (NIC:  $3,49 \pm 0,11$  vs. CON:  $0,05 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 14). O tratamento convencional com NAC e todas as doses de silimarina usadas reduziram essas lesões (NAC: 57%; S50: 30%; S200: 64% e S300: 62%,  $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo NIC. Entre esses tratamentos preventivos, apenas a menor dose de silimarina S50 foi menos eficaz que os demais NAC, S200 e S300,  $p < 0,05$ ).



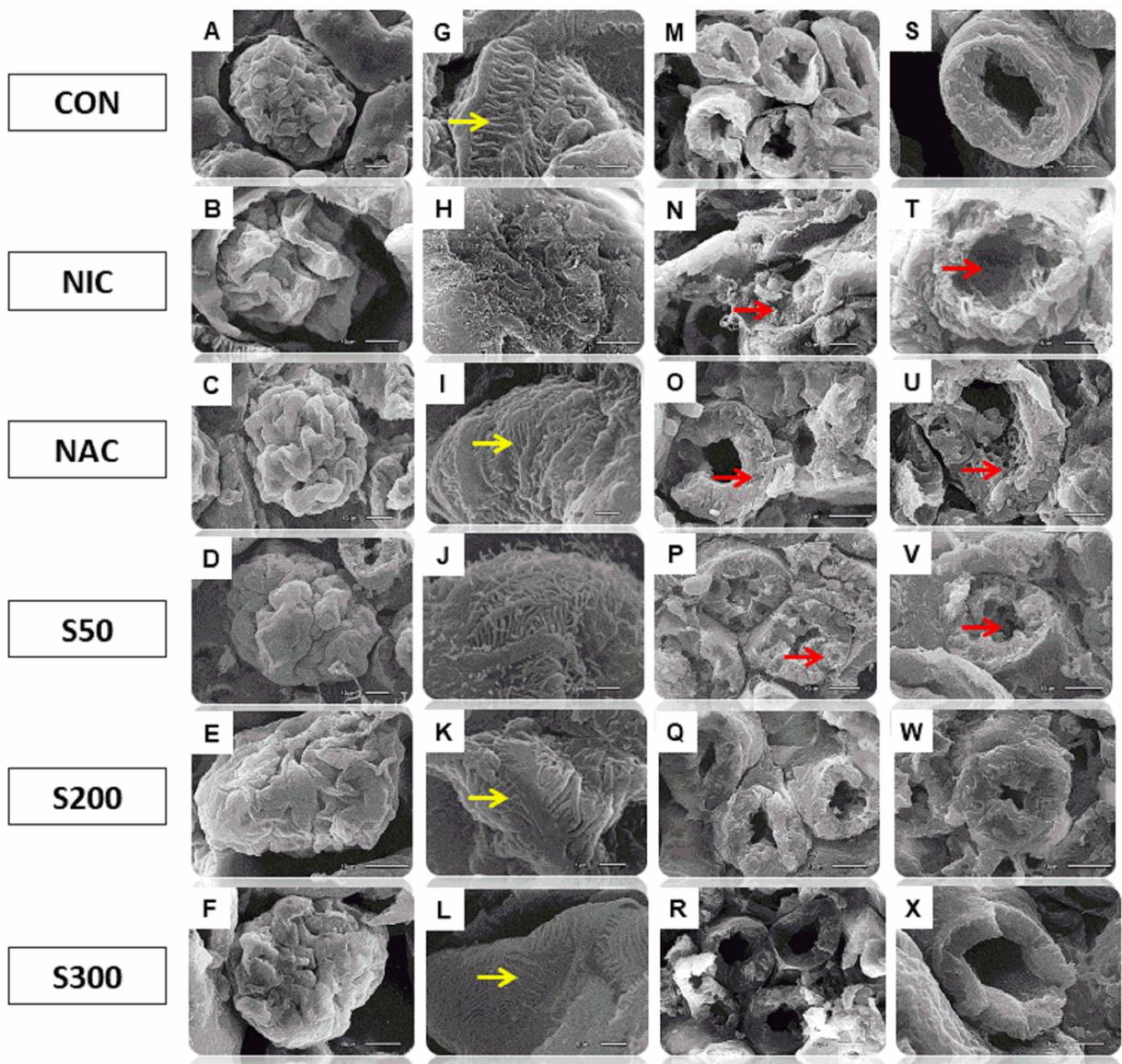
**Figura 13.** Micrografias representativas mostrando histologia renal (coradas com HE) nos diferentes grupos de camundongos 24 horas após a indução da NIC. A-F: secção córtex-medula (100x); G-L: a região cortical (200x) e R-M: a região cortical (400x) evidenciando dano glomerular, perda de núcleos, congestão na luz dos túbulos com presença de debris celulares, dilatação tubular e lesões

tubulointersticiais principalmente no grupo NIC e prevenidas de maneira dose-dependente com silimarina.



**Figura 14.** A silimarina atenua as lesões glomerulares e tubulointersticiais na nefropatia induzida por radiocontraste em camundongos. Os índices de lesão tubulointersticial (TILI index) de todos os grupos ( $n = 4$ ). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  SEM. # $p < 0,05$  vs. grupo NIC.

A Figura 15 evidencia fotomicrografias típicas de MEV confirmando os resultados obtidos em trabalhos anteriores com modelo de CIN. No grupo NIC, observamos um tufo glomerular atrofiado (Figura 15B), perda de coesão estrutural com podócitos atípicos (Figura 15H), congestão luminal e vacuolização de células epiteliais tubulares (Figura 15, imagens N e T) quando comparado ao grupo controle. Os grupos NAC (Fig. 15, imagens C, I, O e U), S200 (Fig. 15, imagens E, K, Q, W) e S300 (Fig. 15, imagens F, L, R e X) preveniram as lesões induzidas por contraste em ambos os podócitos glomerulares e células tubulares.



**Figura 15.** Fotografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de tecido renal dos diferentes grupos confirmando a diminuição das lesões glomerulares renais e tubulares. A primeira coluna (A-F, barra de escala = 10  $\mu$ m) mostra imagens de varredura de glomérulos inteiros, mostrando maior preservação estrutural dos tecidos superficiais nos grupos NAC (C) e S300 (F), semelhante ao grupo CON. Os grupos NIC (B), S50 (D) e S200 (E) exibiram perda de coesão estrutural. A segunda coluna (G-L, barra de escala = 1  $\mu$ m) mostra uma maior ampliação dos podócitos para exibir os processos primários e os processos secundários interdigitais. Os grupos NIC (B) e S50 (D) apresentaram podócitos atípicos. Apenas os grupos NAC (I), S200 (K) e S300 (L) foram semelhantes às estruturas de controle (G), com processos podocitários lisos que se contrapuseram firmemente (setas amarelas). A terceira coluna (M-R, barra de escala = 10  $\mu$ m) mostra imagens de varredura dos túbulos proximais com estrutura normal (M), com vacuolização epitelial celular (setas vermelhas) após nefropatia por radiocontraste (N, O e P) e ausência de vacúolos citoplasmáticos no Grupos S200 (Q) e S300 (R). A última coluna (S-X, barra de escala = 5 ou 10  $\mu$ m) mostra mais detalhes da estrutura tubular, seguindo o padrão de resposta da terceira coluna, enfatizando um efeito protetor dependente da dose da silimarina.

## 4. DISCUSSÃO

Embora estudos recentes tenham sugerido a eficácia da silimarina para algumas doenças renais, como a nefropatia diabética (Fallahzadeh *et al.*, 2012; Rafieian-Kopaie *et al.*, 2012) ou nefrotoxicidade iatrogênica induzida por drogas terapêuticas (Ninsontia *et al.*, 2011; Dashti-Khavidaki *et al.*, 2012), a eficácia da silimarina na prevenção da disfunção renal induzida pelo contraste ainda é inconclusiva (Sedighifard *et al.*, 2016). Este estudo é o primeiro a demonstrar resultados experimentais que a silimarina (incluindo a dose baixa de 50 mg/Kg) é capaz de prevenir o desenvolvimento de CIN, preservando a função renal, reduzindo o estresse oxidativo e apoptose, aumentando a viabilidade celular e atenuando as incidências de lesões renais glomerulares e tubulares, como demonstrado pela investigação histológica.

Enquanto o primeiro caso clínico de lesão renal com contraste foi relatado desde 1942 (Pendergrass e Chamberlain, 1942; Kiss e Hamar, 2016), o primeiro modelo experimental apareceu apenas na década de 1980 em coelhos e ratos (Golman e Holtås, 1980), apresentando algumas variações ao longo do tempo (por exemplo, modelo animal, tipo de contraste, desidratação e/ou diferentes combinações de lesão por drogas). Em 2015, o laboratório de fisiologia translacional da UVV, desenvolveu com sucesso um novo modelo experimental de CIN simples e reprodutível em camundongos suíços por via intraperitoneal (Bôa *et al.*, 2015), diferindo da maioria dos estudos prévios de camundongos no uso de contraste por via intravascular (Agmon *et al.* 1994; Billings *et al.*, 2008). Além disso, como a injeção de contraste por si só não causa lesão renal aguda evidente em roedores (nem em pacientes saudáveis), foi mantido o uso de prostaglandina e inibidores de NO como aplicado por outros autores (Lee *et al.*, 2006; Billings *et al.*, 2008; Kiss e Hamar, 2016; Mamoulakis *et al.*, 2017). Portanto, essa estratégia farmacológica adjuvante também permite mimetizar as condições clínicas que geralmente predisõem um paciente aterosclerótico à CIN (idosos, hipertensos/diabéticos), resultando em um declínio da função renal (Bôa *et al.*, 2015; Kiss e Hamar, 2016).

Nos últimos anos, alguns pesquisadores argumentaram que o futuro "padrão ouro" no diagnóstico da CIN deve ser determinado em uma abordagem sinérgica que inclua diferentes biomarcadores e técnicas de imagem funcional (Molitoris, 2015; Kiss e Hamar, 2016; Föhling *et al.*, 2017). Assim, a fim de aumentar a confiabilidade do comprometimento renal no presente estudo, foram incorporadas

algumas análises, a começar pela dosagem de cistatina C sérica. Como este peptídeo aumenta proporcionalmente em resposta a diminuição da taxa de filtração glomerular e apresenta pequeno volume de distribuição, foi recentemente considerado um importante biomarcador endógeno da lesão renal aguda (Leelahavanichkul *et al.*, 2014; Andreucci *et al.*, 2016; Dalcomune *et al.*, 2016; Föhling *et al.*, 2017). A hipótese do estudo, o aumento nos três biomarcadores renais (uréia, creatinina e cistatina C), no grupo NIC confirmou o sucesso da nefropatia aguda, que por outro lado, não aumentaram nos grupos que sofreram a CIN e foram tratados preventivamente com silimarina em todas as doses estudadas, sugerindo seu potencial efeito renoprotetor. Além disso, notou-se que os dados negativos no grupo NAC corroboraram estudos recentes que questionam a utilidade deste antioxidante seguro e de baixo custo para prevenir a CIN na prática clínica (Subramaniam *et al.*, 2016; Föhling *et al.*, 2017; Hossain *et al.*, 2018; Weisbord *et al.*, 2018). Também se observou que a diminuição da uremia e da cistatina C no S300 foi significativa em comparação com o grupo NAC ( $p < 0,05$ ), demonstrando um importante papel potencial para a silimarina na proteção contra a lesão renal induzida pelo contraste.

Considerando que o dano oxidativo é um dos principais mecanismos patogênicos envolvidos na CIN (Bôa *et al.*, 2015; Subramaniam *et al.*, 2016; Andreucci *et al.*, 2016; Hossain *et al.*, 2018) e que a silimarina apresenta propriedades antioxidantes elevadas (Polyak *et al.*, 2013; Surai *et al.*, 2015; Federico *et al.*, 2017), a investigação foi estendida para parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no sangue e nos rins de todos os grupos, como discutido abaixo.

Entre os estudos envolvendo a CIN, a investigação incomum de efeitos adversos extrarenais sistêmicos foi evidenciada apenas por métodos indiretos de estresse oxidativo (Toprak *et al.*, 2008; Ari *et al.*, 2012). Pela primeira vez, os resultados demonstraram tanto para métodos diretos (detecção de EROs) como indiretos (AOPP e ensaio cometa) que o contraste iodado aumenta o estresse oxidativo (sistêmico) no sangue nos mesmos animais e que a prevenção convencional por NAC e silimarina foram capazes de reverter o excesso de produção de EROs sistêmica. Em relação à oxidação de proteínas e danos no DNA, a melhor prevenção pode ser alcançada com a maior dose de silimarina (mas não por NAC), como observado através de biomarcadores da função renal. Essa diferença aparente entre os métodos pode ser parcialmente explicada por uma depuração completa de EROs mais rápida em comparação com macromoléculas

cumulativamente oxidadas analisadas (Bôa *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, enfatiza-se a importância de analisar diferentes testes de danos oxidativos, uma vez que eles podem fornecer dados extras de estresse oxidativo. Por exemplo, uma vez que o biomarcador de AOPP no plasma pode estar relacionado com a progressão da insuficiência renal (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2017), ele foi incluído no estudo. A hipótese é que a redução da uremia e a melhora do status de EROs no rim podem estar relacionadas com a redução sérica de AOPP, como observado por outros autores (Witko-Sarsat *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2014).

Em relação à toxicidade renal, é provável que a silimarina inibe a superprodução de EROs de maneira dose-dependente. É sabido que o dano oxidativo apresenta consequências importantes tais como aumento da apoptose e diminuição da viabilidade celular através de vias estabelecidas (por exemplo, ativação de caspases, encurtamento de telômeros e/ou clivagens cromossômicas) (Tonini *et al.*, 2013; Bôa *et al.*, 2015; Porto *et al.*, 2015; Koliada 2015), e, portanto, foi investigado se a silimarina também diminuiria esses parâmetros sob exposição ao contraste iodado. Os presentes dados sugerem que a ligeira modificação da menor dose de silimarina já apresenta efeito antiapoptótico e melhora a viabilidade celular renal, assim como o tratamento convencional com NAC. Estes processos anti-EROs e que conferem proteção as células, observados para a silimarina, podem ser apoiados por alguns mecanismos inter-relacionados recentemente descritos em outros modelos de nefropatia: com atividade antioxidante (Ninsontia *et al.*, 2011), quelante de metais (Hamed *et al.*, 2012; Surai *et al.* 2015), aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Soto *et al.*, 2010), reparo e remoção de moléculas danificadas (Surai *et al.*, 2015) e/ou proteção mitocondrial (Bin *et al.*, 2017). Corroborando os dados encontrados, Tan *et al.* (2015) mostraram que a silimarina aumenta a proteína Bcl-2, que regula negativamente a Bax e inibe a clivagem da caspase-3 no tecido renal contribuindo diretamente para a redução da apoptose renal.

Além da análise bioquímica e de citometria de fluxo, o ensaio histológico e microscopia eletrônica de varredura mostraram uma ruptura pronunciada da ultraestrutura renal no grupo NIC em comparação aos do grupo controle, consistente com relatos anteriores da Universidade Vila Velha (Bôa *et al.*, 2015; Guss *et al.*, 2017) e de outros grupos (Billings *et al.*, 2008; Colbay *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013). Em relação à intervenção com silimarina, outra novidade deste estudo é o

efeito nefroprotetor, com melhora dos glomérulos e das estruturas tubulares de maneira dose-dependente.

Com relação às doses estabelecidas de silimarina (aparentemente altas), é importante observar que a dose animal não deve ser extrapolada para uma dose equivalente humana por uma conversão simples baseada no peso corporal, como tem sido freqüentemente relatado por alguns autores (Levy *et al.*, 2007; Erdogan e Vang, 2016). Na tentativa de otimizar esta conversão de doses de drogas de estudos experimentais em animais para futuros ensaios clínicos, alguns autores sugeriram um método simples usando o método de normalização da área de superfície corporal (Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Nair e Jacob, 2016). Após a aplicação desses cálculos, identificou-se que todas as doses escolhidas neste estudo (50, 200 e 300 mg/Kg) podem ser compatíveis aos seres humanos: 4 mg/Kg, 16 mg/Kg e 24 mg/Kg, respectivamente. Como um exemplo extremo, para um humano pesando 85 kg, uma administração oral de 2040 mg/dia seria segura e bem tolerada, como observado por outros (Hawke *et al.*, 2010; Polyak *et al.*, 2013). Portanto, a dose de silimarina usada no presente estudo seria compatível em outros ensaios clínicos. Além disso, como em estudos prévios em animais e humanos, que utilizaram essa mistura de flavonóides, demonstra-se segurança e eficácia no perfil de utilização, logo, espera-se que outros ensaios com grande tamanho amostral, doses e duração distintas sejam estendidos em relação à CIN.

Uma limitação do estudo é que não foram analisados outros parâmetros renais, como a proteinúria, que é um potencial biomarcador para danos tubulares e função renal prejudicada. Em estudos futuros, pretende-se investigar os efeitos da silimarina sobre os parâmetros hemodinâmicos renais neste modelo de CIN experimental em camundongos (desenvolvido no laboratório). Estes dados podem ser realizados medindo a depuração de inulina e para-aminohipurato de sódio para estimar a taxa de filtração glomerular e o fluxo plasmático renal, respectivamente (de Almeida *et al.*, 2016).

## **5. CONCLUSÃO**

Em resumo, este estudo demonstra pela primeira vez que a silimarina diminui o dano oxidativo sistêmico e renal preservando a função renal e a arquitetura morfológica sob exposição a radiocontraste em camundongos. Mais especificamente, esse papel renoprotetor é acompanhado por atividades antigenotóxicas e antiapoptóticas. Portanto, a silimarina pode ter aplicações clínicas promissoras contra a CIN.

### **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores revelam não haver conflitos de interesses.

## 6. REFERÊNCIAS

Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F., 2010. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy research: PTR* 24, 1423–32. <https://doi.org/10.1002/ptr.3207>

Agarwal, S.K., Mohareb, S., Patel, A., Yacoub, R., DiNicolantonio, J.J., Konstantinidis, I., Pathak, A., Fnu, S., Annapureddy, N., Simoes, P.K., Kamat, S., El-Hayek, G., Prasad, R., Kumbala, D., Nascimento, R.M., Reilly, J.P., Nadkarni, G.N., Benjo, A.M., 2015. Systematic oral hydration with water is similar to parenteral hydration for prevention of contrast-induced nephropathy: an updated meta-analysis of randomised clinical data. *Open Heart* 2, e000317. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000317>

Agmon, Y., Peleg, H., Greenfeld, Z., Rosen, S., Brezis, M., 1994. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *The Journal of clinical investigation* 94, 1069–75. <https://doi.org/10.1172/JCI117421>

Altunoren, O., Balli, M., Eren, N., Tasolar, H., Arpaci, A., Caglayan, C.E., Yavuz, Y.C., Gungor, O., 2015. Is Nebivolol Really Effective in Preventing Contrast Induced Nephropathy? *Kidney and Blood Pressure Research* 40, 533–541. <https://doi.org/10.1159/000368529>

Andreucci, M., Faga, T., Pisani, A., Sabbatini, M., Michael, A., 2014. Acute kidney injury by radiographic contrast media: Pathogenesis and prevention. *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/362725>

Andreucci, M., Faga, T., Riccio, E., Sabbatini, M., Pisani, A., Michael, A., 2016. The potential use of biomarkers in predicting contrast-induced acute kidney injury. *International journal of nephrology and renovascular disease* 9, 205–21. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S105124>

Andreucci, M., Faga, T., Serra, R., De Sarro, G., Michael, A., 2017. Update on the renal toxicity of iodinated contrast drugs used in clinical medicine. *Drug, healthcare and patient safety* 9, 25–37. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S122207>

Ari, E., Kedrah, A.E., Alahdab, Y., Bulut, G., Eren, Z., Baytekin, O., Odabasi, D., 2012. Antioxidant and renoprotective effects of paricalcitol on experimental contrast-induced nephropathy model. *The British journal of radiology* 85, 1038–43. <https://doi.org/10.1259/bjr/16327485>

Aspelin, P., Aubry, P., Fransson, S.-G., Strasser, R., Willenbrock, R., Berg, K.J., Nephrotoxicity in High-Risk Patients Study of Iso-Osmolar and Low-Osmolar Non-Ionic Contrast Media Study Investigators, 2003. Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *The New England journal of medicine* 348, 491–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021833>

Bijak, M., 2017. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules* 22, 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22111942>

Bijak, M., Synowiec, E., Sitarek, P., Sliwiński, T., Saluk-Bijak, J., 2017. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of flavonolignans in different cellular models. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9121356>

Billings, F.T., Chen, S.W.C., Kim, M., Park, S.W., Song, J.H., Wang, S., Herman, J., D'Agati, V., Lee, H.T., 2008.  $\alpha$  2 -Adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 295, F741–F748. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90244.2008>

Feng, B., Meng, R., Huang, B., Bi, Y., Shen, S., Zhu, D., 2017. Silymarin protects against renal injury through normalization of lipid metabolism and mitochondrial biogenesis in high fat-fed mice. *Free Radical Biology and Medicine* 110, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.009>

Bôa, I.S.F., Porto, M.L., Pereira, A.C.H., Ramos, J.P.L., Scherer, R., Oliveira, J.P., Nogueira, B.V., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Endringer, D.C., Pereira, T.M.C., 2015. Resin from *Virola oleifera* protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *PLoS ONE* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144329>

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–54.

Burgess, W.P., Walker, P.J., 2014. Mechanisms of contrast-induced nephropathy reduction for saline (NaCl) and sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>). *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/510385>.

Campagnaro, B.P. 2008. Efeito da hipertensão renovascular 2r1c sobre as células tronco da medula óssea de camundongos. Vitória, ES: UFES.140p. Dissertação (Mestrado em ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, 2008.

Campagnaro, B.P. 2012. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2r1c sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos. Vitória, ES: UFES.159p. Tese (Doutorado em ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

Campagnaro, B.P., Tonini, C.L., Doche, L.M., Nogueira, B. V, Vasquez, E.C., Meyrelles, S.S., 2013. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA and cell biology* 32, 458–66. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2065>

Cao, W., Hou, F.F., Nie, J., 2014. AOPPs and the progression of kidney disease. *Kidney international supplements* 4, 102–106. <https://doi.org/10.1038/kisup.2014.19>

Chang, C.-F., Lin, C.-C., 2013. Current concepts of contrast-induced nephropathy: a brief review. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA* 76, 673–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2013.08.011>

Colbay, M., Yuksel, S., Uslan, I., Acarturk, G., Karaman, O., Bas, O., Mollaoglu, H., Yagmurca, M., Ozen, O.A., 2010. Novel approach for the prevention of contrast nephropathy. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 62, 81–9. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.02.119>

Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

Coutinho, P.N., Pereira, B.P., Hertel Pereira, A.C., Porto, M.L., Monteiro de Assis, A.L.E., Cogo Destefani, A., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Nogueira, B.V., de Andrade, T.U., Endringer, D.C., Fronza, M., Costa Pereira, T.M., 2017. Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Journal of ethnopharmacology* 206, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.015>

Dalcomune, D.M., Terrão, J., Porto, M.L., Vasquez, E.C., Baldo, M.P., Pereira, T.M.C., 2016. Predictive value of cystatin C for the identification of illness severity in adult patients in a mixed intensive care unit. *Clinical biochemistry* 49, 762–7. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.04.004>

de Almeida, L.S., Barboza, J.R., Freitas, F.P.S., Porto, M.L., Vasquez, E.C., Meyrelles, S.S., Gava, A.L., Pereira, T.M.C., 2016. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. *Human & experimental toxicology*. <https://doi.org/10.1177/0960327115626582>

de Avelar, C.R., Pereira, E.M., de Farias Costa, P.R., de Jesus, R.P., de Oliveira, L.P.M., 2017. Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology* 23, 5004. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.5004>

Dias, A.T., Rodrigues, B.P., Porto, M.L., Gava, A.L., Balarini, C.M., Freitas, F.P.S., Palomino, Z., Casarini, D.E., Campagnaro, B.P., Pereira, T.M.C., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., 2014. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *Journal of translational medicine* 12, 35. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-35>

Efstratiadis, G., Pateinakis, P., Tambakoudis, G., Pantzaki, A., Economidou, D., Memmos, D., 2008. Contrast media-induced nephropathy: case report and review of the literature focusing on pathogenesis. *Hippokratia* 12, 87–93.

Erdogan, C., Vang, O., 2016. Challenges in Analyzing the Biological Effects of Resveratrol. *Nutrients* 8, 353. <https://doi.org/10.3390/nu8060353>

Erturk, M., Uslu, N., Gorgulu, S., Akbay, E., Kurtulus, G., Akturk, I.F., Akgul, O., Surgit, O., Uzun, F., Gul, M., Isiksacan, N., Yildirim, A., 2014. Does intravenous or oral high-dose N-acetylcysteine in addition to saline prevent contrast-induced nephropathy assessed by cystatin C? *Coronary artery disease* 25, 111–7. <https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000073>

Fähling, M., Seeliger, E., Patzak, A., Persson, P.B., 2017. Understanding and preventing contrast-induced acute kidney injury. *Nature reviews. Nephrology* 13, 169–180. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.196>

Fallahzadeh, M.K., Dormanesh, B., Sagheb, M.M., Roozbeh, J., Vessal, G., Pakfetrat, M., Daneshbod, Y., Kamali-Sarvestani, E., Lankarani, K.B., 2012. Effect of addition of silymarin to renin-angiotensin system inhibitors on proteinuria in type 2 diabetic patients with overt nephropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 60, 896–903. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.06.005>

Fawcett JK, Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol.* 1960 Mar;13:156-9. PubMed PMID: 13821779; PubMed Central PMCID: PMC480024.

Federico, A., Dallio, M., Loguercio, C., 2017. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>

Fu, N., Liang, M., Yang, S., 2018. High Loading Dose of Atorvastatin for the Prevention of Serum Creatinine and Cystatin C-Based Contrast-Induced Nephropathy Following Percutaneous Coronary Intervention. *Angiology* 3319717750903. <https://doi.org/10.1177/0003319717750903>

Golman K, Holtås S. Proteinuria produced by urographic contrast media. *Invest Radiol.* 1980 Nov-Dec;15(6 Suppl):S61-5. PubMed PMID: 7203951.

Gomes, I.B.S., Porto, M.L., Santos, M.C.L.F.S., Campagnaro, B.P., Pereira, T.M.C., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., 2014. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids in health and disease* 13, 184. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-184>

Guss, K.L., Pavanni, S., Prati, B., Dazzi, L., de Oliveira, J.P., Nogueira, B. V., Pereira, T.M.C., Fronza, M., Endringer, D.C., Scherer, R., 2017. Ultrasound-assisted extraction of *Achyrocline satureioides* prevents contrast-induced nephropathy in mice. *Ultrasonics Sonochemistry* 37, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.035>

Hamed, M.A., Ali, S.A., El-Rigal, N.S., 2012. Therapeutic potential of ginger against renal injury induced by carbon tetrachloride in rats. *TheScientificWorldJournal* 2012, 840421. <https://doi.org/10.1100/2012/840421>

Hawke, R.L., Schrieber, S.J., Soule, T.A., Wen, Z., Smith, P.C., Reddy, K.R., Wahed, A.S., Belle, S.H., Afdhal, N.H., Navarro, V.J., Berman, J., Liu, Q.-Y., Doo, E., Fried, M.W., SyNCH Trial Group, 2010. Silymarin ascending multiple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Journal of clinical pharmacology* 50, 434–49. <https://doi.org/10.1177/0091270009347475>

Heise, D., Rentsch, K., Braeuer, A., Friedrich, M., Quintel, M., 2011. Comparison of urinary neutrophil glucosaminidase-associated lipocalin, cystatin C, and  $\alpha$ 1-microglobulin for early detection of acute renal injury after cardiac surgery. *European*

journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery 39, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2010.05.044>

Hervey, G.R., 1953. Determination of creatinine by the Jaffé reaction. *Nature* 171, 1125.

Hossain, M.A., Costanzo, E., Cosentino, J., Patel, C., Qaisar, H., Singh, V., Khan, T., Cheng, J.S., Asif, A., Vachharajani, T.J., 2018. Contrast-induced nephropathy: Pathophysiology, risk factors, and prevention. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 29, 1–9. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.225199>

Hou, Y.-C., Liou, K.-T., Chern, C.-M., Wang, Y.-H., Liao, J.-F., Chang, S., Chou, Y.-H., Shen, Y.-C., 2010. Preventive effect of silymarin in cerebral ischemia-reperfusion-induced brain injury in rats possibly through impairing NF- $\kappa$ B and STAT-1 activation. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17, 963–73. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.03.012>

Kate, R. J., Perez, R. M., Mazumdar, D., Pasupathy, K. S., & Nilakantan, V. 2016. Prediction and detection models for acute kidney injury in hospitalized older adults. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 16, 39. <http://doi.org/10.1186/s12911-016-0277-4>

Khazim, K., Gorin, Y., Cavaglieri, R.C., Abboud, H.E., Fanti, P., 2013. The antioxidant silybin prevents high glucose-induced oxidative stress and podocyte injury in vitro and in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 305, F691–F700. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00028.2013>

Khosravi, A., Dolatkah, M., Hashemi, H.S., Rostami, Z., 2016. Preventive Effect of Atorvastatin (80 mg) on Contrast-Induced Nephropathy After Angiography in High-Risk Patients: Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Nephro-Urology Monthly* 8. <https://doi.org/10.5812/numonthly.29574>

Kiss, N., Hamar, P., 2016. Histopathological Evaluation of Contrast-Induced Acute Kidney Injury Rodent Models. *BioMed research international* 2016, 3763250. <https://doi.org/10.1155/2016/3763250>

Koliada, A.K., Krasnenkov, D.S., Vaiserman, A.M., 2015. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? *Frontiers in genetics* 6, 82. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00082>

Końca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., Koza, Z., Wojcik, A., 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation research* 534, 15–20.

Lee, H.T., Jan, M., Bae, S.C., Joo, J.D., Goubaeva, F.R., Yang, J., Kim, M., 2006. A1 adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. *American journal of physiology. Renal physiology* 290, F1367-75. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00347.2005>

Leelahavanichkul, A., Souza, A.C.P., Street, J.M., Hsu, V., Tsuji, T., Doi, K., Li, L., Hu, X., Zhou, H., Kumar, P., Schnermann, J., Star, R.A., Yuen, P.S.T., 2014.

Comparison of serum creatinine and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice. *American journal of physiology. Renal physiology* 307, F939-48. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00025.2013>

Leem, A.Y., Park, M.S., Park, B.H., Jung, W.J., Chung, K.S., Kim, S.Y., Kim, E.Y., Jung, J.Y., Kang, Y.A., Kim, Y.S., Kim, S.K., Chang, J., Song, J.H., 2017. Value of Serum Cystatin C Measurement in the Diagnosis of Sepsis-Induced Kidney Injury and Prediction of Renal Function Recovery. *Yonsei medical journal* 58, 604–612. <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.3.604>

Levy, A., Cohen, G., Gilat, E., Kapon, J., Dachir, S., Abraham, S., Herskovitz, M., Teitelbaum, Z., Raveh, L., 2007. Extrapolating from animal studies to the efficacy in humans of a pretreatment combination against organophosphate poisoning. *Archives of toxicology* 81, 353–9. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0153-6>

Li, P.K.T., Burdman, E.A., Mehta, R.L., 2013. Acute Kidney Injury: a global alert. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 35, 1–5. <https://doi.org/10.5935/01012800.20130001>

Lovelace, E.S., Polyak, S.J., 2015. Natural products as tools for defining how cellular metabolism influences cellular immune and inflammatory function during chronic infection. *Viruses* 7, 6218–6232. <https://doi.org/10.3390/v7122933>

Luo M., Yang Y., Xu J., Cheng W., Li X.W., Tang M.M., Liu H., Liu F.Y., Duan S.B., 2017. A new scoring model for the prediction of mortality in patients with acute kidney injury. *Sci Rep* 2017; 7: 7862. <https://doi:10.1038/s41598-017-08440-w>

Ma, W.-Q., Zhao, Y., Wang, Y., Han, X.-Q., Zhu, Y., Liu, N.-F., 2018. Comparative efficacy of pharmacological interventions for contrast-induced nephropathy prevention after coronary angiography: a network meta-analysis from randomized trials. *International urology and nephrology*. <https://doi.org/10.1007/s11255-018-1814-0>

Mamoulakis, C., Tsarouhas, K., Fragkiadoulaki, I., Heretis, I., Wilks, M.F., Spandidos, D.A., Tsitsimpikou, C., Tsatsakis, A., 2017. Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies. *Pharmacology & Therapeutics* 180, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.009>

Merten, G.J., Burgess, W.P., Gray, L. V, Holleman, J.H., Roush, T.S., Kowalchuk, G.J., Bersin, R.M., III, C.A.S., Rittase, R.A., Norton, H.J., Kennedy, T.P., 2004. Prevention of Contrast-Induced Nephropathy. *Baseline* 291, E63-8. <https://doi.org/10.1002/clc.20576>

Molitoris, B.A., 2015. Urinary Biomarkers: Alone Are They Enough? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26, 1485–8. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111145>

Momeni, A., Hajigholami, A., Geshnizjani, S., Kheiri, S., 2015. Effect of silymarin in the prevention of Cisplatin nephrotoxicity, a clinical trial study. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 9, OC11-3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12776.5789>

Nair, A.B., Jacob, S., 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy* 7, 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>

Ninsontia, C., Pongjit, K., Chaotham, C., Chanvorachote, P., 2011. Silymarin selectively protects human renal cells from cisplatin-induced cell death. *Pharmaceutical biology* 49, 1082–90. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.568506>

Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123, 291–8.

Pendergrass E.P., Chamberlain G.W. A survey of death and unfavorable sequelae following the administration of contrastmedia, *American College of Radiology*, vol.48, pp.741–762, 1942.

Pérez-H, J., Carrillo-S, C., García, E., Ruiz-Mar, G., Pérez-Tamayo, R., Chavarría, A., 2014. Neuroprotective effect of silymarin in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology* 319, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.02.009>

Polyak, S.J., Ferenci, P., Pawlotsky, J.M., 2013. Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 57, 1262–1271. <https://doi.org/10.1002/hep.26179>

Porto, M.L., Rodrigues, B.P., Menezes, T.N., Ceschim, S.L., Casarini, D.E., Gava, A.L., Pereira, T.M.C., Vasquez, E.C., Campagnaro, B.P., Meyrelles, S.S., 2015. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *Journal of biomedical science* 22, 97. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0201-8>

Rafieian-Kopaie, M., Nasri, H., 2012. Silymarin and diabetic nephropathy. *Journal of renal injury prevention* 1, 3–5. <https://doi.org/10.12861/jrip.2012.02>

Razavi, B.M., Karimi, G., 2016. Protective effect of silymarin against chemical-induced cardiotoxicity. *Iranian journal of basic medical sciences* 19, 916–923.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 659–61. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>

Rodrigues, B.P., Campagnaro, B.P., Balarini, C.M., Pereira, T.M.C., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., 2013. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. *Lipids in health and disease* 12, 128. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-128>

Rua, E. de A.O., Porto, M.L., Ramos, J.P.L., Nogueira, B.V., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Pereira, T.C., 2014. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *Journal of biomedical science* 21, 105. <https://doi.org/10.1186/s12929-014-0105-z>

Scharnweber, T., Alhilali, L., Fakhran, S., 2017. Contrast-Induced Acute Kidney Injury. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America* 25, 743–753. <https://doi.org/10.1016/j.mric.2017.06.012>

Schmidt M.I., Duncan B.B., Azevedo e Silva G, Menezes A.M., Monteiro C.A., Barreto S.M., Chor D., Menezes P.R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011 Jun 4;377(9781):1949-61. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60135-9.

Kidney Disease Improving Global Outcomes: KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Section 4: Contrast-induced AKI, 2012. *Kidney International Supplements* 2, 69–88. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.34>

Sedighifard, Z., Roghani, F., Bidram, P., Harandi, S.A., Molavi, S., 2016. Silymarin for the prevention of contrast-induced nephropathy: A placebo-controlled clinical trial. *International Journal of Preventive Medicine* January-20. <https://doi.org/10.4103/2008-7802.174762>

Seeliger, E., Sendeski, M., Rihal, C.S., Persson, P.B., 2012. Contrast-induced kidney injury: Mechanisms, risk factors, and prevention. *European Heart Journal* 33, 2007–2015. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr494>

Sendeski, M.M., 2011. Pathophysiology of renal tissue damage by iodinated contrast media. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 38, 292–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05503.x>

Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J., Nagano, T., 2003. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *The Journal of biological chemistry* 278, 3170–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209264200>

Shahbazi, F., Dashti-Khavidaki, S., Khalili, H., Lessan-Pezeshki, M., 2012. Potential renoprotective effects of silymarin against nephrotoxic drugs: A review of literature. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 15, 112–123. <https://doi.org/10.18433/J3F88S>

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* 175, 184–91.

Solomon, R., Gordon, P., Manoukian, S. V., Abbott, J.D., Kereiakes, D.J., Jeremias, A., Kim, M., Dauerman, H.L., 2015. Randomized trial of bicarbonate or saline study for the prevention of contrast-induced nephropathy in patients with CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 10, 1519–1524. <https://doi.org/10.2215/CJN.05370514>

Soto, C., Pérez, J., García, V., Uría, E., Vadillo, M., Raya, L., 2010. Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17, 1090–4. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.04.011>

Subramaniam, R.M., Suarez-Cuervo, C., Wilson, R.F., Turban, S., Zhang, A., Sherrod, C., Aboagye, J., Eng, J., Choi, M.J., Hutfless, S., Bass, E.B., 2016. Effectiveness of Prevention Strategies for Contrast-Induced Nephropathy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of internal medicine* 164, 406–16. <https://doi.org/10.7326/M15-1456>

Surai, P., 2015. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants* 4, 204–247. <https://doi.org/10.3390/antiox4010204>

Tan, J., Hu, J., He, Y., Cui, F., 2015. Protective role of silymarin in a mouse model of renal Ischemia-Reperfusion injury. *Diagnostic Pathology* 10, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0436-4>

Tepel, M., van der Giet, M., Schwarzfeld, C., Laufer, U., Liermann, D., Zidek, W., 2000. Prevention of Radiographic-Contrast-Agent–Induced Reductions in Renal Function by Acetylcysteine. *New England Journal of Medicine* 343, 180–184. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007203430304>

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35, 206–21.

Tonini, C.L., Campagnaro, B.P., Louro, L.P.S., Pereira, T.M.C., Vasquez, E.C., Meyrelles, S.S., 2013. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. *International journal of molecular sciences* 14, 3325–42. <https://doi.org/10.3390/ijms14023325>

Toprak, O., Cirit, M., Tanrisev, M., Yazici, C., Canoz, O., Sipahioglu, M., Uzum, A., Ersoy, R., Sozmen, E.Y., 2008. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23, 853–9. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm691>

Vessal, G., Akmal, M., Najafi, P., Moein, M.R., Sagheb, M.M., 2010. Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal Failure* 32, 733–739. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2010.486488>

Voroneanu, L., Nistor, I., Dumea, R., Apetrii, M., Covic, A., 2016. Silymarin in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Diabetes Research* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5147468>

Wallin, B., Rosengren, B., Shertzer, H.G., Camejo, G., 1993. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical biochemistry* 208, 10–5. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1002>

Waybill, M.M., Waybill, P.N., 2001. Contrast media-induced nephrotoxicity: identification of patients at risk and algorithms for prevention. *Journal of vascular and interventional radiology* : JVIR 12, 3–9.

Weisbord, S.D., Gallagher, M., Jneid, H., Garcia, S., Cass, A., Thwin, S.-S., Conner, T.A., Chertow, G.M., Bhatt, D.L., Shunk, K., Parikh, C.R., McFalls, E.O., Brophy, M., Ferguson, R., Wu, H., Androsenko, M., Myles, J., Kaufman, J., Palevsky, P.M., PRESERVE Trial Group, 2018. Outcomes after Angiography with Sodium Bicarbonate and Acetylcysteine. *The New England journal of medicine* 378, 603–614. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710933>

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international* 49, 1304–13.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B., 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161, 2524–32.

Witko-Sarsat, V., Gausson, V., Descamps-Latscha, B., 2003. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney international. Supplement* S11-4. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s84.47.x>

Wonnacott, A., Meran, S., Amphlett, B., Talabani, B., Phillips, A., 2014. Epidemiology and outcomes in community-acquired versus hospital-acquired aki. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 9, 1007–1014. <https://doi.org/10.2215/CJN.07920713>

Yu, C., Huang, D., Wang, K., Lin, B., Liu, Y., Liu, S., Wu, W., Zhang, H. 2017. Advanced oxidation protein products induce apoptosis, and upregulate sclerostin and RANKL expression, in osteocytic MLO-Y4 cells via JNK/p38 MAPK activation. *Molecular Medicine Reports* 15.2, 543-550.

## 7. ANEXO



UNIVERSIDADE  
**VILA VELHA**  
ESPIRITO SANTO

### Universidade Vila Velha

#### Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEUA-UVV)

#### PARECER DO RELATOR

#### Parecer Nº403/2016

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

Tipo de Pesquisa: Avaliação do efeito nefroprotetor da silimarina em camundongos submetidos à nefropatia por contraste.

Instituição onde será desenvolvido: Laboratório do NUPECFARMA da UVV.

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “Avaliação do efeito nefroprotetor da silimarina em camundongos submetidos à nefropatia por contraste”, tendo como pesquisador(a) responsável Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, que irá utilizar a(s) seguinte (s) espécie (s) animal (s) camundongo heterogênico, linhagem albino/suíço, proveniente do Biotério da UVV, totalizando 48 (quarenta e oito animais), esta CEUA-UVV considera que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta Comissão e ao CONCEA. Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como APROVADO, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão na Universidade Vila Velha.

Vila Velha, **07 de dezembro de 2016.**

Prof. João Luiz Rossi Junior

Relator da CEUA-UVV.

---

Universidade Vila Velha

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