

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

LAÍS SALLES DE ALMEIDA

**SILDENAFIL PREVINE A NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE
EM RATOS WISTAR**

VITÓRIA

2015

LAÍS SALLES DE ALMEIDA

**SILDENAFIL PREVINE A NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE
EM RATOS WISTAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava.

VITÓRIA

2015

LAÍS SALLES DE ALMEIDA

**SILDENAFIL PREVINE A NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE
EM RATOS WISTAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em _ de ____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Ágata Lages Gava
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Orientador

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira
UNIVERSIDADE VILA VELHA
Co-orientador

Prof.
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Examinador

Prof.
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Examinador

AGRADECIMENTOS

Devo toda honra, toda glória, todo o merecimento e todo o louvor, única e exclusivamente, ao meu Deus. Toda a capacidade, paciência, força de vontade, prática manual, inteligência... tudo foi me dado por Ele. Senhor, sou grata por todas as coisas que fizestes em minha vida e por ser um Deus tão Amigo, Companheiro, Maravilhoso, Misericordioso, Paciente... “Eu tenho um Deus de amor, um refúgio onde me abrigo, estou segura em suas mãos...” (*Renascer Praise*).

Um obrigada mais que especial aos meus pais. Aqueles que tudo fizeram, fazem e farão por mim. As pessoas que me educaram, me deram todo amor do mundo, me apoiaram e torceram muito por mim. Não poderia existir no mundo pais melhores ou iguais aos meus!!!! Pai e mãe, vocês são a minha inspiração, meus exemplos de vida, meus super-heróis. Se tenho um motivo pra agradecer muito a Deus é pelo presente dado a mim de poder ser filha de vocês. Amo vocês incondicionalmente... Obrigada por tudo!

Ao amor da minha vida, só desejo que permaneça ao meu lado como sempre fez. Se tenho uma certeza nessa vida é a de que eu escolhi o cara certo pra ter ao meu lado pro resto da vida. Meu noivinho é aquele cara que me apóia em tudo, que é o “carinho” em pessoa, que me dá força na hora da fraqueza, que me dá alegria na hora da tristeza, que fica comigo até de madrugada fazendo experimento, que me mima, que me acha a menina mais linda e mais inteligente desse mundo... ele é “O cara”!!!! Lucas, te agradeço por tudo, principalmente por ser presente em minha vida. “Eu gosto de você e gosto de ficar com você. Meu riso é tão feliz contigo, o meu melhor amigo é o meu amor” (*Tribalistas*).

“Se és capaz de aceitar teus alunos como são, com suas diferentes realidades sociais, humanas e culturais; se os levas a superar as dificuldades, limitações ou fracassos, sem humilhações, sem inúteis frustrações; se os levas a refletir mais do que decorar; se te emocionas com a visão de tantas criaturas que de ti dependem para desabrochar em consciência, criatividade, liberdade e responsabilidade, então podes dizer: sou mestre!” (*Rui Barbosa*). Um muitíssimo obrigada aos grandes mestres Prof. Vasquez e Prof^a. Silvana que me deram a oportunidade de fazer parte

da história do LFT. Vasquez, que com seu jeito encantador de ministrar as melhores aulas de fisiologia da graduação, me ensinou a amar fisiologia, e Prof^a. Silvana, que foi mais que uma professora, foi uma conselheira (muito obrigada pela paciência e pelas palavras edificantes). Vocês são 10!

Prof^a. Ágata e Prof. Thiago, minha orientadora e meu co-orientador, um muitíssimo obrigada. Passamos por períodos longos, intermináveis, árduos mas proveitosos. Devo a vocês o amplo conhecimento que trago em minha bagagem. Não se trata somente de conhecimentos técnicos, e, sim, também de sabedorias humanas. Trabalhar com vocês me ensinou muito sobre a vida, transformando-me numa profissional digna e capaz de enfrentar qualquer dificuldade profissional honestamente.

Meus queridos Laila, Laissa, Markin, obrigada por fazerem parte da minha vida e por me aturarem e apoiarem em tudo. Levo vocês comigo sempre! Tia Marta, obrigada por sempre acreditar em mim, a sua presença em minha vida é fundamental! Aos meus avós, tios, primos e cunhadinhos, amo vocês. Obrigada, minha família.

Ah, meus amigos são como anjos que Deus me enviou. Eles sempre estão comigo me protegendo e me apoiando em tudo, mesmo sem “saber” o que estou passando. Me dão bronca quando preciso e até choram comigo, mas nunca me deixam sozinha. Sim, meus amigos são daqueles: “amigos mais chegados que irmãos”. Muito obrigada Caio, Carla, Carmen, Eliza, George, Kety, Letícia, Lore e demais, amo vocês.

Agradeço também aos amigos que me ensinaram e me moldaram desde a iniciação científica até o mestrado: Flávia, Fred e Gilberto. Vocês foram realmente os melhores mestrados de todos os tempos. E aos meus amigos (Alan, Brunela, Camilla, Fran, Geyse, Jamila, João, Marcos, Rossana, S1 e S2, Sonila, Thais, Victor e Vinícios) que perderam horas me ouvindo, que fizeram dessa difícil jornada uma festa sem fim, que choraram comigo, se alegraram comigo e se preocuparam comigo, muito obrigada mesmo, os levarei pra toda a minha vida. E aos demais amigos do LFT (Ananda, Andréia, Bianca, Eduardo, Isabela, Marcella, Silvia, Thiago,

Vivi...), Muito obrigada por fazerem parte dessa história! Deus, muito obrigada por ter me dado amigos tão queridos.

RESUMO

Palavras-Chave: Sildenafil; Nefropatia induzida por contraste (NIC); Estresse oxidativo;

Apesar de ser uma das causas mais comuns de insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados, a nefropatia induzida por contraste (NIC) é um problema comum mas mal compreendido e não possui um tratamento adequado. Estudos têm demonstrado a ação antioxidante dos inibidores da fosfodiesterase-5. Portanto, nós investigamos se o sildenafil pode prevenir a disfunção renal de ratos submetidos ao meio de contraste.

Ratos Wistar machos (250-350g) foram tratados, durante 7 dias, por gavagem, com sildenafil (50 mg/Kg/dia) ou veículo (2mL/Kg/dia). A NIC foi induzida através da restrição hídrica (24h), injeção i.p. (10mg/Kg) de L-NAME e indometacina, além da injeção i.v. (3mg/Kg) de meio de contraste (Iohexol) ou salina, resultando nos seguintes grupos experimentais: Controle, NIC e NIC + Sildenafil. Em seguida foi feita a análise hemodinâmica renal por padrões-ouro (*clearance* de inulina e para-aminohipurato) aliando alterações funcionais acrescidas de investigações a nível molecular (citometria de fluxo). Dados expressos como Média \pm EPM; ANOVA 1 via; post-hoc de Tukey; * $p < 0,05$ vs. controle e # $p < 0,05$ vs. NIC.

A administração do contraste resultou em queda da taxa de filtração glomerular (controle: $8,53 \pm 0,55$; NIC: $3,77 \pm 0,26^*$; NIC + S: $6,77 \pm 0,39^{*\#}$ mL/min/Kg), do fluxo plasmático renal (controle: $20,04 \pm 0,9$; NIC: $9,59 \pm 0,38^*$; NIC + S: $13,18 \pm 0,26^{*\#}$ mL/min/Kg) e do fluxo sanguíneo renal (controle: $35,01 \pm 2,02$; NIC: $20,36 \pm 0,67^*$; NIC + S: $22,46 \pm 0,8^{*\#}$ mL/min/Kg) e aumento da resistência vascular renal (controle: $3,59 \pm 0,46$; NIC: $7,72 \pm 0,31^*$; NIC + S: $4,86 \pm 0,17^{\#}$ u.a), os quais foram prevenidos pelo tratamento com sildenafil. Portanto, o sildenafil pode ser um promissor agente terapêutico para a prevenção e / ou tratamento de disfunção renal induzida por contraste.

ABSTRACT

Keywords: Sildenafil; Contrast-induced nephropathy (CIN); Oxidative stress;

Despite being one of the most common causes of acute renal failure in hospitalized patients, the contrast-induced nephropathy (CIN) is a common but poorly understood problem and does not have an appropriate treatment. Studies report on the antioxidant action of phosphodiesterase 5 inhibitors. Therefore, we investigated if sildenafil can prevent or ameliorate kidney dysfunction in an experimental model of CIN in rats.

Male Wistar rats (290-390 g) were treated for 7 days by gavage with sildenafil (50 mg/kg/day) or vehicle (2ml/kg/day). The acute nephropathy was induced by water restriction (24 hr), L-NAME and indomethacin injection (10mg / kg i.p.) and contrast medium injection (iohexol 3mg/Kg i.v.) or saline, resulting in the following experimental groups: control, CIN, CIN + sildenafil. After, was made the analysis of renal function including assessment of the glomerular filtration rate (GFR), renal blood flow (RBF), renal plasma flow (RPF) and renal vascular resistance (RVR) by determining the clearance of inulin and para-aminohippurate, and investigation of oxidative stress at the molecular level (flow cytometry). Values are expressed as means \pm S.E.M. one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. A value of $p < 0.05$ was regarded as statistically significant.

Contrast administration has resulted in decline in GFR (control: 8.53 ± 0.55 ; CIN: $3.77 \pm 0.26^*$; CIN + S: $6.77 \pm 0.39^{*\#}$ mL/min/Kg), RPF(control: 20.04 ± 0.9 ; CIN: $9.59 \pm 0.38^*$; CIN + S: $13.18 \pm 0.26^{*\#}$ mL/min/Kg) and RBF(control: 35.01 ± 2.02 , $\pm 0.67^*$; CIN: $20,36$; NIC + S: $22.46 \pm 0.8^{*\#}$ mL/min/Kg) and increased RVR (control: 3.59 ± 0.46 ; CIN: $7.72 \pm 0.31^*$; CIN + S: $4.86 \pm 0.17^{\#}$ a.u), which was prevented by treatment with sildenafil. Therefore, sildenafil may be a promising therapeutic agent for the prevention and / or treatment of renal dysfunction induced by contrast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de filtração.....	11
Figura 2 – Fluxograma mostrando mecanismos complexos pelo qual a utilização do contraste resulta na diminuição da taxa de filtração glomerular (GRF).	19
Figura 3 – Organograma esquematizando toda ordem cronológica experimental..	27
Figura 4 – Esquema experimental das etapas do procedimento de análise da função renal.....	29
Figura 5 – Valores da TFG através do clearance de inulina, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste.	35
Figura 6 – Valores do FPR através do clearance de PAH, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste.	36
Figura 7 – Valores referentes ao FSR, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste.....	37
Figura 8 – Valores referentes à FF, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste.....	38
Figura 9 – Valores referentes à RVR, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste.....	38
Figura 10 – Valores percentuais dos níveis de uréia plasmática.	39
Figura 11 – Valores percentuais dos níveis de creatinina plasmática.....	40
Figura 12 – Valores percentuais dos níveis de proteína na urina.	41
Figura 13 – Medida citológica renal por citometria de fluxo.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Análises antropométricas (massa corporal, massa renal e massa cardíaca) 1 dia após a indução da nefropatia por contraste.</i>	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C: 2 Rins 1 Clipe

ANGII: angiotensina II

C: Clearance

Ca²⁺: Calcio

CAT: catalase

CEUA Comitê De Ética No Uso De Animais

CT Grupo Controle

DAF: Expressa NO na citometria

DCF: Expressa H₂O₂ na citometria

DHE: Expressa O₂⁻ na citometria

DMSO: Dimetiosulfóxido

FF: Fração De Filtração

FPR: Fluxo Plasmático Renal

FSR: Fluxo Sanguíneo Renal

GMPc: Monofosfato Cíclico De Guanosina

GSH-ST: Glutathiona S-transferase

GTP: Guanosina Trifosfato

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HPF: Expressa NO₃⁻ na citometria

IRA: Insuficiência Renal Aguda

K⁺: Potássio

L-NAME: Inibidor Da Óxido Nítrico Sintase

MDA: malondialdeído

MFI: Mediana Da Intensidade De Fluorescência

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NIC: Nefropatia Induzida Por Contraste

NO: Óxido Nítrico

NO₃⁻: Peroxinitrito

OH⁻: Íon Hidroxila

PAH Para-Aminohipurato

PAM Pressão Arterial Média

PDE5: Fosfodiesterase-5

PDEs: Fosfodiesterases

PG: Prostaglandina

PGE2: Prostaglandina E₂

PGI2: Prostaglandina I₂

ROS: Espécies Reativas De Oxigênio

RVR Resistência Vascular Renal

S: Sildenafil

SOD: Superóxido Dismutase

TFG: Taxa De Filtração Glomerular

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VSCM: Células Do Musculo Liso Vascular

LISTA DE ABREVIATURAS EM INGLÊS

CIN: Contrast Induced Nephropathy

GFR: Glomerular Filtration Rate

RBF: Renal Blood Flow

RPF: Renal Plasma Flow

RVR: Renal Vascular Resistance

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA RENAL	10
1.2 INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA.....	13
1.3 NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE	15
1.4 INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE-5.....	19
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	25
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	25
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	25
3.3.1 Tratamento	25
3.3.2 Nefropatia Por Contraste	26
3.3.3 Preparação da Cirurgia dos Animais	27
3.3.4 Protocolo Experimental	28
3.4 PARÂMETROS RENAIIS ANALISADOS	29
3.4.1 Avaliação da Hemodinâmica Renal	29
3.4.2 Avaliação Dos Parâmetros Bioquímicos	30
3.4.3 Preparação Das Amostras	31
3.4.4 Medidas Biométricas Do Rim E Coração	32
3.4.5 Avaliação Do Stress Oxidativo	32
4. RESULTADOS	33
4.1 MASSA CORPORAL (RIM / CORAÇÃO).....	33
4.2 HEMODINÂMICA RENAL.....	34
4.2.1 Taxa De Filtração Glomerular (TFG)	34
4.2.2 Fluxo Plasmático Renal (FPR)	35
4.2.3 Fluxo Sanguíneo Renal (FSR)	36
4.2.4 Fração de Filtração (FF)	37

4.2.5 Resistência Vascular Renal (RVR)	38
4.3 URÉIA PLASMÁTICA	39
4.4 CREATININA PLASMÁTICA	40
4.5 PROTEINÚRIA	40
4.6 AVALIAÇÃO DO STRESS OXIDATIVO	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA RENAL

Os rins desempenham papel importante na manutenção da homeostase corporal, na medida em que são responsáveis pela manutenção da osmolaridade e volume dos fluidos corporais, regulação do balanço hidroeletrolítico, e do equilíbrio ácido-base, além de realizarem funções de remoção de substâncias indesejadas e produção de hormônios (Guyton, 2006).

Constituem-se de um par de órgãos localizados na parede posterior do abdômen, lateralmente à coluna vertebral, na cavidade retro-peritoneal. Apresentam cor marrom- avermelhada e são revestidos por uma camada de tecido fibroso denominada cápsula renal. Em sua face medial encontra-se a região denominada hilo, aonde chegam aos rins as artérias e nervos renais e de onde partem as veias renais e a pelve. Cada rim humano pesa aproximadamente 150g e recebe cerca de 25% do débito cardíaco, perfazendo um fluxo sanguíneo renal de 1250 mL/min (Guyton, 2006). Sob a perspectiva da demanda metabólica, pode-se dizer que o fluxo sanguíneo renal é excessivo. Tal fluxo, contudo, serve não somente à perfusão necessária para a nutrição do órgão, mas também à formação do ultrafiltrado plasmático e formação de urina.

O rim humano possui de um milhão a um milhão e meio de néfrons. Cada néfron é formado pelo corpúsculo renal e por estruturas tubulares, que incluem: túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor. O corpúsculo renal é constituído pelo glomérulo capilar envolto pela capsula de Bowman. O glomérulo apresenta estrutura perfeitamente adaptada para a realização das funções de filtração. Consiste de uma rede de capilares fenestrados, membrana basal glomerular e os podócitos glomerulares (Figura 1) (Eyre et. al., 2007; Aires et. al., 2008).

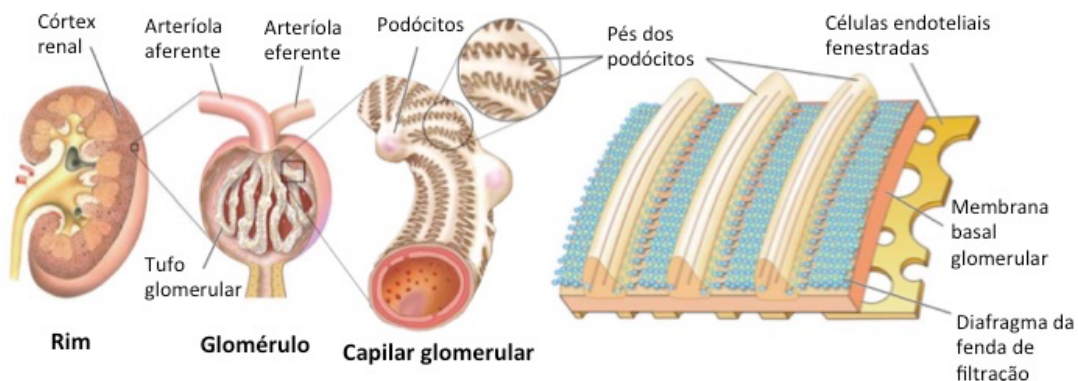


Figura 1 – Processo de filtração. Glomérulo; capilar glomerular (podócitos e seus prolongamentos, células endoteliais fenestradas e membrana basal glomerular). (KARL et al., 2005).

A formação de urina inicia-se no glomérulo, onde o plasma que entra no rim através da artéria renal é filtrado graças à pressão hidrostática do sangue nos capilares glomerulares. O filtrado é um fluido de composição semelhante à do plasma, porém com poucas proteínas e macromoléculas (Eyre et. al., 2007; Aires et. al., 2008).

Após sua formação, o filtrado glomerular caminha pelos túbulos renais, e sua composição e volume são então modificados através dos mecanismos de reabsorção e secreção tubular existentes ao longo do néfron.

Reabsorção tubular renal é o processo de transporte de uma substância do interior tubular para o sangue que envolve o túbulo; o mecanismo no sentido inverso é denominado secreção tubular. O termo excreção renal refere-se à eliminação da urina final pela uretra (Aires et. al., 2008).

Portanto, o processo de depuração renal, além de se dar através da filtração glomerular, pode também ser feito por meio da secreção tubular, uma vez que o sangue que passou pelo glomérulo e não foi filtrado vai atravessar uma segunda rede capilar, peritubular, formada a partir das arteríolas eferentes. Por outro lado, graças à reabsorção tubular, muitas substâncias, depois de filtradas, voltam ao sangue que percorre os capilares peritubulares, entrando na circulação sistêmica pela veia renal que sai do órgão (Aires et. al., 2008).

A reabsorção de água, devida ao gradiente osmótico estabelecido pela reabsorção de sódio e cloreto, aumenta a concentração de solutos existentes no líquido

remanescente na luz tubular, modificando, portanto, o gradiente químico responsável pelo transporte passivo dos solutos através do epitélio. Alguns desses solutos vão variar sua concentração apenas em função desse processo, não sendo reabsorvidos e nem secretados. Neste caso, a quantidade de soluto filtrado é igual a excretada na urina final, e, como exemplo, podemos citar o polissacarídeo inulina. A maior parte dos constituintes naturais do filtrado é reabsorvida ao longo da parede tubular e volta ao sangue, sendo sua quantidade filtrada sempre maior que a excretada; porém, sua concentração na urina final pode ser maior ou menos que aquela no filtrado glomerular, dependendo da quantidade de água que é reabsorvida nos túbulos. Algumas substâncias, como o paraamino-hipurato de sódio, além de filtradas são também secretadas; suas quantidades e concentrações são sempre maiores que as filtradas (Aires et. al., 2008).

Por outro lado, os rins são responsáveis pela manutenção do volume e composição do fluido extracelular, por meio do controle preciso da reabsorção e secreção de água e eletrólitos, a partir do ultrafiltrado formado pelos glomérulos. Para tanto, os diferentes segmentos das estruturas tubulares do néfron são adaptados para a realização de funções de transporte específicas, que são ativadas na medida das necessidades do organismo. À medida em que o ultrafiltrado flui da cápsula de Bowman pelos diferentes segmentos tubulares, ele sofre processo de reabsorção e secreção seletivas de substâncias, de acordo com as necessidades do organismo para a manutenção da homeostase. O mecanismo de contra-corrente e o ciclo renal de transporte de uréia permitem a manutenção da hipertonicidade da medula renal, que favorece a eliminação de uma urina mais concentrada, poupando água para o organismo (Aires et. al., 2008).

Os rins desempenham também um importante papel endócrino, ao secretarem hormônios responsáveis pela síntese e amadurecimento de eritrócitos (eritropoietina), formação da angiotensina (renina) e absorção de cálcio (calcitriol). Participam, ainda, da regulação do equilíbrio ácido- básico, por meio do controle preciso da excreção de íons hidrogênio e reabsorção de bicarbonato (Aires et. al., 2008).

Por fim, fica claro a importância dos rins na manutenção da homeostase corporal. Sendo assim, qualquer doença ou alteração do estado fisiológico normal renal implicam no comprometimento de diversos outros órgãos e sistemas.

1.2 INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA

A insuficiência renal aguda (IRA) apresenta a característica de ser produzida num período breve de tempo, não dando possibilidade no começo à intervenção dos mecanismos adaptativos integrantes da reserva renal. Esta síndrome é caracterizada por uma diminuição súbita da função renal (taxa da filtração glomerular) e, conseqüentemente, um aumento de produtos nitrogenados no sangue (uréia e creatinina), com uma conseqüente perda do equilíbrio hemostático do meio interno, falha na manutenção de líquidos, eletrólitos e homeostase ácido-base. É associado à oligúria em cerca de dois terços dos casos.(Fernando et. al., 1999; Carlos, 2001).

A IRA não é uma doença única, mas uma síndrome que compreende várias condições clínicas. Ela representa uma doença muito importante e potencialmente devastadora na nefrologia clínica sendo um dos problemas mais comuns encontrados em pacientes graves hospitalizados. Ela surge em uma variedade de situações clínicas e é um problema crítico de saúde pública em todo o mundo. Ocorre prevalentemente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e está associada com morbidade e mortalidade severa. É comum em pacientes hospitalizados afetando cerca de 7% -10% dos pacientes. Está associada com uma taxa de mortalidade de 45% em série geral e perto de 70% em unidades de terapia intensiva (UTI). Embora seja lamentável que essas taxas de mortalidade permaneceram relativamente constantes ao longo das últimas décadas, deve-se notar que os pacientes de hoje são, geralmente, muito mais velhos e mostram uma condição geralmente muito mais grave do que era no passado (Fernando et. al., 1999; Unis, 2014; Hui-Ling et. al., 2014; Li et. al., 2013).

Dependendo da localização ou da natureza da injúria renal, a insuficiência renal aguda é classificada como pré-renal, parenquimatosa (intrarrenal), ou obstrutiva (pós-renal), ambas relacionadas com diminuição da taxa de filtração glomerular.

As causas da IRA pré-renal sobrevêm quando a taxa de filtração glomerular cai por consequência da diminuição da irrigação sanguínea renal efetiva. A condição é reversível se a doença subjacente é resolvida. Alguns exemplos são: hemorragia, vômitos, diarreia, queimaduras, diuréticos, diminuição do débito cardíaco, enfarte, arritmia, insuficiência cardíaca congestiva, embolia pulmonar, hipotensão, sepses, hipoxemia, choque anafilático, inibição da síntese de prostaglandina, dentre outras (Fernando et. al., 1999).

Por outro lado, a IRA intrarrenal, se dá quando há uma súbita diminuição na taxa de filtração glomerular secundária à lesão renal intrínseca afetando principalmente túbulos, interstício, glomérulos e / ou vasos. Como principais causas de indução da insuficiência renal aguda intrarrenal temos: meio de contraste iodado, cirurgias cardiovasculares, sepse, causas pré-renal, antimicrobianos, anestésicos, imunossupressores ou agentes antineoplásicos (Fernando et. al., 1999).

Por fim, a IRA pós-renal ocorre devido a obstrução em qualquer nível do aparelho urinário. Portanto, são estas as causas mais frequentes: bexiga neurogênica, hipertrofia prostática benigna, doenças malignas na bexiga, na próstata e na uretra, dentre outras (Fernando et. al., 1999).

Os resultados da insuficiência renal aguda vão depender da doença subjacente, da severidade e duração da insuficiência renal, e das condições renais básicas do paciente (Kai et al., 2012)

A maioria das etiologias da IRA podem ser evitadas por meio de intervenções a nível individual, comunitário, regional, e intra-hospitalares. Ainda existem poucas intervenções preventivas ou terapêuticas, e a mortalidade associada a ela ainda é inaceitavelmente elevada (Ftouh et. al., 2014; Li et. al., 2013).

Pacientes com IRA têm um risco aumentado para o desenvolvimento de nefropatia induzida por contraste (Taylor et. al. 2007; Ukaigwe et. al., 2014).

1.3 NEFROPATIA INDUZIDA POR CONTRASTE

Os meios de contraste são usados na medicina em uma ampla gama de diagnósticos por imagens, incluindo ressonância magnética, angiografia, e estudos relacionados, para melhorar a visualização de uma variedade de estruturas anatômicas. Eles podem ser administrados por via intravenosa, por via intra-arterial, por via retal, por via oral e por inalação.

A maioria dos agentes de contraste intravasculares contem o elemento iodo. O iodo é um isótopo de ocorrência natural e, por causa do seu grande peso molecular, é relativamente radiopaco. Portanto, a composição química do iodo permite-lhe absorver radiação eletromagnética, tornando o produto químico visível nas imagens obtidas com diversos métodos radiológicos. A porcentagem de iodo em um determinado agente de contraste está relacionada com a eficácia do agente para reforçar a estrutura anatômica de interesse (Weisbord, 2008; Stephen, 2012).

Os meios de contraste disponíveis são moléculas derivadas do benzeno, tri-iodadas, e são classificados de acordo com a sua ionização, osmolaridade e estrutura. Os contrastes iônicos dissociam-se na água, enquanto os não-iônicos não, apesar de serem hidrossolúveis (Ricardo et. al., 2011). O teor de iodo e a estrutura e os tipos de ligações que compõem o meio de contraste também contribuem para a osmolalidade (osmoles de soluto por quilograma de solução) do agente de contraste (Seeley, 1989).

A farmacocinética de todos os meios de radiocontraste é semelhante, com baixa lipofilicidade, baixa ligação às proteínas plasmáticas e mínima biotransformação. Quase todo o contraste injetado é depurado pelos rins e excretado não modificado na urina, nos indivíduos com função renal normal. Contudo, o metabolismo hepático, a circulação entero-hepática e a eliminação biliar estão aumentadas nos doentes com insuficiência renal (Wong et. al., 2007).

Há três tipos de meios de radiocontraste. Os de primeira geração ou de alta osmolaridade (1400 a 1800 mOsm/Kg), são monômeros iônicos, como por exemplo o Diatrizoato. Os de segunda geração ou de baixa osmolaridade (500 a 850

mOsm/Kg), que, apesar do nome, só o são em relação aos de primeira geração, têm na verdade uma osmolaridade superior à do plasma. Um total de oito monômeros não-iônicos estão aprovados para uso intravascular : Iohexol (Omnipaque[®]), o Iopamidol (Isovue[®]), o Ioxilan (Oxilan[®]), a Iopramida (Ultravist[®]), o Ioversol (Optiray[®]), o Iomeprol, o Iopentol e o Iobiditrol e um dímero iônico (Ioxagato - Hexabrix[®]). Por fim, os contrastes mais recentes são iso-osmolares (290 mOsm/Kg). Estes sim, possuem a mesma osmolaridade do plasma. O único atualmente disponível no mercado é um dímero não-iônico, o Iodixanol (Visipaque[®]) (Thomsen et. al., 2008; Rudnick et. al., 2009).

A via de administração do contraste é importante. Parece que o meio de contraste é menos nefrotóxico quando administrado por via intravenosa do que por via intra-arterial, ao nível das artérias renais ou na aorta proximal até à origem dos vasos renais. Quando o meio de contraste é administrado por via arterial, a concentração renal é muito mais elevada. Além disso, essas injeções tendem a ser repetidas durante o procedimento, daí a maior nefrotoxicidade dessa via de administração (Katzberg et. al., 2007).

Nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma doença iatrogênica causada pela administração de contraste iodado em determinados pacientes, principalmente quando em situação de risco. As características clínicas incluem insuficiência renal, com oligúria, anúria, e distúrbios eletrolíticos (Stephen, 2012).

Apesar de ser uma das causas mais comuns de insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados, a nefropatia induzida por contraste é um problema comum, mas pouco compreendido. A grande quantidade de literatura dedicada ao assunto é repleto de contradições e relatos conflitantes. Pacientes que já oferecem algum risco, como exemplo, insuficiência renal, diabetes mellitus e insuficiência cardíaca, têm um risco aumentado para o desenvolvimento de nefropatia induzida por contraste (Taylor et. al. 2007; Ukaigwe et. al., 2014).

A patogênese da NIC ainda não é perfeitamente clara . Vários mecanismos foram implicados, mas a maioria dos autores defende que o agravamento da função renal após o meio de contraste é resultado da citotoxicidade direta do contraste e da vasoconstrição prolongada com consequentes fatores parácrinos (adenosina, endotelina e espécies reativas de oxigênio) que perturbam a autorregulação da vascularização renal, que predispõe à hipóxia medular e isquemia renal. Todos estes mecanismos podem agir em conjunto (Person et. al., 2005; Tumlin et. al., 2006; Pucelikova et. al., 2008).

A microcirculação renal é regulada por um conjunto de várias influências que medeiam a vasoconstrição e a vasodilatação. Como um dos principais papéis do rim é a manutenção do volume, o equilíbrio da vascularização tende para um estado de constrição na presença de hipovolemia. Essa hipovolemia ocorre frequentemente em pacientes que possuem algum fator de risco e que são submetidos ao meio de contraste(Ricardo et. al., 2011).

De acordo com alguns autores, o contraste leva a vasoconstrição renal através de um efeito direto no tecido muscular liso vascular, alterações na fisiologia do cálcio ou de um aumento local da adenosina e da produção aumentada de endotelina, contribuindo para uma diminuição do filtrado glomerular e isquemia medular, uma área com requisitos metabólicos elevados. Isto, juntamente com uma vasoconstrição renal pré-existente, pode ser responsável pelo desenvolvimento de disfunção renal na NIC (Ricardo et. al., 2011; Wong et. al., 2007).

Uma das particularidades do leito vascular renal é o comprimento dos vasos que abastecem de sangue a medula renal. Este vasos são denominados vasos retos, e têm o mesmo diâmetro que os capilares normais, porém são mais longos, logo, possuem resistência mais alta que os outros capilares. Nesse caso, o fluxo somente é mantido pela redução da viscosidade do sangue neste seguimento, uma vez que o hematócrito reduzido permitirá uma velocidade de escoamento mais elevada. Os efeitos adversos da viscosidade do fluido aumentada através da utilização de meios de contraste dimérico pode ser mais nítido nos túbulos renais do que nos capilares (Person et. al., 2005).

Portanto, é fundamental para a fisiopatologia da NIC a hipóxia medular renal. Dentre os mecanismos propostos, os autores também incluem hipóxia medular resultante da vasoconstrição, que pode ser remediada por óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas (envolvidos em atividades de vasodilatação e sequestrantes de radicais livres). Além disso, a viscosidade dentro do leito vascular medular pode aumentar, o que contribui para a diminuição do fluxo tubular, aumento do tempo de contato do contraste com as células tubulares contribuindo para um efeito tóxico direto do meio de contraste, hipóxia medular e lesão renal resultante (Ricardo et. al., 2011; Stephen et. al., 2012; Wong et. al., 2007).

A inibição da síntese de óxido nítrico e diminuição da sensibilidade aos receptores de endotelina envolvidos na vasodilatação são bem estudados nas ocorrências da fisiopatologia por contraste. A produção de radicais livres, pode contribuir para NIC, e uma ampla variedade de sequestrantes de radicais livres têm sido estudados. Em condições fisiológicas normais temos a produção de ROS sendo contrabalanceada pela ação dos mecanismos antioxidantes do próprio organismo. Entretanto em algumas situações patológicas, ocorre um desequilíbrio na produção/consumo dessas substâncias acentuando e agravando o processo fisiopatológico. Assim, a proteção endotelial contra a injúria de radicais livres é de muita importância. (Stephen et. al., 2012; Vallon et. al., 2006; Erley et. al., 1997).

Além de danos endoteliais (células endoteliais são as primeiras a entrarem em contato com agentes de contraste injetado por via intravenosa), os meios de contraste causam danos também às células epiteliais tubulares. De fato, os meios de contraste são filtrados por glomérulo e estão concentrados no interior dos túbulos renais, expondo as células tubulares renais para um dano direto pior ainda (Caiazza et. al., 2014; Sendeski et. al., 2011; Andreucci et. al., 2014; Hardiek et. al., 2001; Heinrich et. al., 2005).

Por fim, além das alterações hemodinâmicas referidas, foi relatada citotoxicidade direta do contraste, bem como alterações na viscosidade sanguínea, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e a nível das células tubulares renais estão descritas alterações na homeostasia da energia celular, disrupção no

metabolismo do cálcio, distúrbios na polaridade da célula tubular e apoptose (Ricardo et. al., 2011).

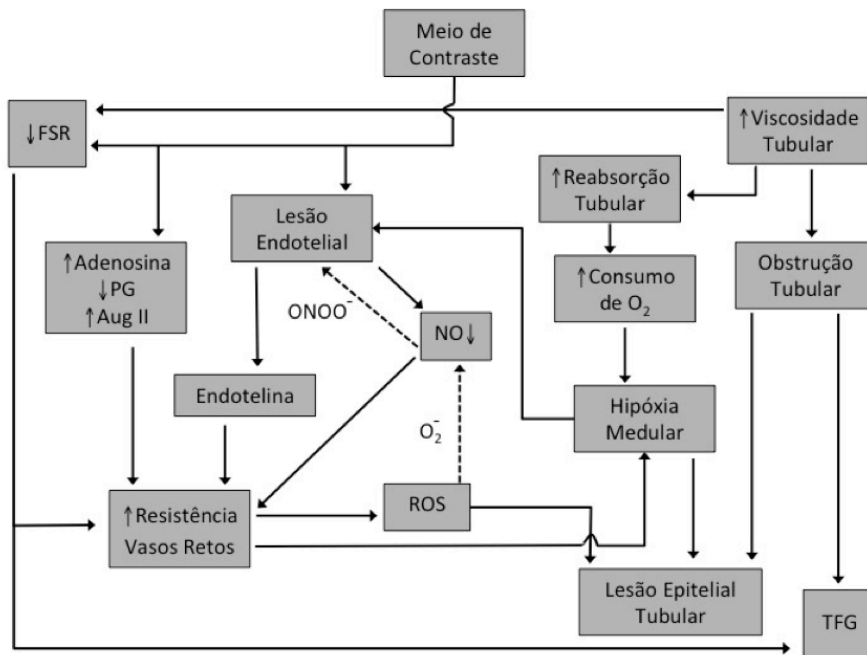


Figura 2 – Fluxograma mostrando mecanismos complexos pelo qual a utilização do contraste resulta na diminuição da taxa de filtração glomerular (GRF). As setas tracejadas indicam a reação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (superóxido O₂⁻) com óxido nítrico (NO), que não só provoca uma redução nos níveis de NO, mas também leva à formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um oxidante poderoso que provoca lesão celular.

1.4 INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE-5

Muitos protocolos para prevenir a NIC foram estabelecidos com variados graus de sucesso. Mas ainda não existe um tratamento específico para a indução da nefropatia por contraste.

Atualmente, alguns tratamentos, como, administração oral ou intravenosa de fluidos antes, durante e depois da exposição ao meio de contraste, tornaram-se "padrões de cuidado" que são quase universalmente utilizados, inclusive, são os únicos incluídos nas diretrizes do American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Intervention e European Society of Urogenital Radiology. A razão pela qual a administração de fluidos

protege os rins é complexa, e inclui a redução da concentração urinária causada pelo contraste, diminuição de fatores vasoconstritores renais e diminuição no consumo renal de oxigênio (Levine et. al., 2011; Stacul et. al., 2011; Franchini et. al., 1997; Franchini et. al., 2006).

Embora a hidratação com solução salina isotônica, antes, durante e após a exposição a agentes de contraste, seja a prática habitual, uma proporção substancial de pacientes em risco, no entanto, continua a sofrer com a nefropatia induzida por contraste (Wong et. al., 2007; Stacul et. al., 2006).

Outros agentes, tais como a dopamina, captopril, teofilina, peptídeo natriurético atrial e bloqueadores dos canais de cálcio também são ineficazes (Pannu et. al., 2006).

Outro método muito utilizado como meio de prevenção é baseado na atividade antioxidante, que pode explicar o aparente benefício de algumas drogas utilizadas na prevenção da nefropatia induzida por contraste, como por exemplo a N-acetilcisteína. Infelizmente, vários estudos mais recentes têm levantado dúvidas sobre os relatórios publicados inicialmente a respeito da N-acetilcisteína. Em alguns modelos animais sugerem que a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes pode explicar o maior risco de hipovolemia (Taylor et. al., 2007; Nallamothu et. al., 2014; Tepel et. al., 2000).

Já vimos que em situações patológicas, há um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes no sistema renal, resultando no stress oxidativo, e conseqüentemente vasoconstrição. Portanto, é importante entender o mecanismo endotelial de relaxamento via NO. O NO produzido nas células endoteliais se difunde através das células do músculo liso vascular (VSCM), onde ele ativa a enzima guanilil ciclase solúvel. Esta enzima ativada produz o mensageiro intracelular monofosfato cíclico de guanosina (GMPC) a partir de guanosina trifosfato (GTP), o que leva à diminuição dos níveis de Ca^{2+} e conseqüentemente, o relaxamento do VSCM (Meyrelles et. al., 2011).

Um determinante importante do tonus vascular é a atividade dos canais de potássio que constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares vasculares. A abertura de um canal de potássio presente na

membrana das células musculares vasculares, provoca um aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular por difusão passiva ($[K^+]_{intracelular} > [K^+]_{extracelular}$), o que causa hiperpolarização da membrana celular (Sobey, 2011). Este estado de hiperpolarização conduz ao encerramento de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem e consequente diminuição da entrada de íons Ca^{2+} para o interior da célula, causando o relaxamento vascular (vasodilatação) (Sobey, 2011; Faraci et. al., 1998). De forma inversa, o encerramento de um canal de potássio causa um estado de despolarização, abertura de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem, aumento da $[Ca^{2+}]_{intracelular}$ e vasoconstrição.

Portanto, a via de sinalização NO/GMPc e a hiperpolarização da membrana através da abertura de canais iônicos, como os de potássio, apresentam um importante papel no relaxamento vascular e na regulação da pressão arterial.

A degradação do GMPc é dada devido à ação de enzimas da família das fosfodiesterases (PDEs), que compreendem uma gama de enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos. Estas são cruciais na modulação da sinalização citoplasmática desse tipo de mensageiro intracelular (Raja et. al., 2004). A isoforma PDE5 é a responsável pela degradação de maneira específica do GMPc e está presente em grande concentração em um número limitado de tecidos, sendo estes o coração, músculo liso vascular sistêmico, corpo cavernoso do pênis, músculo liso brônquico, plaquetas e músculo liso visceral (Glossmann et. al., 1999; Stegbauer et. al., 2013).

Os inibidores das PDEs elevam os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos. Fisiologicamente, existe uma gama de isoformas na família das PDEs, e por isso, inibidores seletivos destas enzimas são ferramentas farmacológicas promissoras. Neste contexto, o sildenafil se destaca por apresentar alta seletividade à PDE5 (Glossmann et. al., 1999; Raja et. al., 2004).

O sildenafil, é uma base fraca (pKa 6,5) e moderadamente lipofílico, resultando em uma boa solubilidade e absorção no trato gastrointestinal (Walker et. al., 1999). Tem como função prolongar os efeitos do segundo mensageiro GMPc na via NO/GMPc,

através da inibição da hidrólise deste composto, prolongando sua ação (Meyrelles et. al., 2011). Entretanto, sabe-se recentemente por dados de outros e de nosso laboratório que o sildenafil apresenta efeitos pleiotrópicos (aumenta a oferta de NO, diminui NADPH oxidase, e apoptose).

O sildenafil demonstrou eficácia contra a disfunção endotelial em transplantados de coração (Bremer et. al., 2005). Há provas substanciais do papel cardioprotetor de vários inibidores de PDE5 após a lesão de isquemia-reperfusão no coração (Salloum et. al., 2008; Schwartz et. al., 2012). Alguns estudos têm demonstrado que o sildenafil promove melhora da função endotelial em condições de doença arterial coronariana (Halcox et. al., 2002), assim como na diabetes, reduzindo o estresse oxidativo em vários tecidos (Milani et. al., 2005; Patil et. al., 2006; Aversa et. al., 2008).

A importância fisiológica da PDE5 na regulação do tônus do músculo liso tem sido demonstrada em estudos clínicos que utilizavam inibidores específicos desta enzima no tratamento da disfunção erétil (Bivalacqua et. al., 2009) e remodelamento vascular (Koyama et. al., 2001). Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com sildenafil foi capaz de promover melhora no relaxamento vascular, diminuir os níveis plasmáticos de AngII, além de diminuir o dano no DNA de animais ateroscleróticos e com hipertensão renovascular 2R1C (Balarini et. al., 2013; Rodrigues et. al., 2013; Dias et. al., 2014).

Trabalhos recentes mostraram que a administração de sildenafil reduz a pressão arterial e melhora a perfusão do músculo esquelético durante o exercício além de possuir efeito protetor na isquemia renal (Roseguini et. al., 2014; Lledo et. al., 2007; Zhao et. al., 2001).

Foi visto também que ele pode representar uma estratégia terapêutica interessante para a neuroproteção neonatal, assim como na redução da quantidade de morte celular em lesões provocadas por isquemia- hipóxia. Outro trabalho mostrou que o sildenafil pode reduzir os déficits cognitivos associados com neuroinflamação induzida pelo peptídeo β -amilóide em camundongos. (Charriaut et. al., 2014; Shrivastava et. al., 2012; Zhang et. al., 2013).

Até hoje, não há tratamento eficaz para a NIC, que, diante dos fatos apresentados, gera uma hipoperfusão (aumento da osmolaridade, diminuição de FSR) e citotoxicidade direta pelo contraste, provocando um aumento na produção de ROS (com redução incompleta ou parcial do O₂ à água, ativação da NADPH oxidase ou por disfunção mitocondrial). Os únicos candidatos são fármacos antioxidantes e reposição de volemia. Sabendo que o modelo experimental é estresse oxidativo dependente e que nossos prévios com sildenafil em outros modelos experimentais de nefropatia tem demonstrado um efeito antioxidante, o objetivo desse trabalho é investigar se a profilaxia com sildenafil pode atenuar o grau de Injúria renal induzida por contraste. Para isso, foram realizados experimentos que avaliam a função renal de cada grupo assim como a busca por possíveis mecanismos que possam justificar o efeito nefroprotetor do sildenafil.

2. OBJETIVOS

Avaliar se há efeitos profiláticos do sildenafil sobre a nefropatia induzida por contraste em ratos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento com sildenafil em ratos com NIC sobre:

- Pressão arterial média;
- Ritmo de filtração glomerular (RFG);
- Fluxo plasmático renal (FPR);
- Fluxo sanguíneo renal (FSR);
- Fração de filtração (FF);
- Resistência vascular renal (RVR).
- Concentração de uréia plasmática;
- Concentração de creatinina plasmática;
- Concentração de proteinúria.
- Produção de superóxido (O_2^-);
- Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2);
- Produção de óxido nítrico (NO);
- Produção de peroxinitrito (NO_3^-) e íons hidroxila (OH^-).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 280 e 400g. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES.

Os animais foram mantidos no biotério do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, até o momento da realização dos experimentos, em condições controladas e estáveis (temperatura 22° C, umidade de 50-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas), onde receberam água e ração (Labina^R) *ad libitum*. Os protocolos experimentais do presente estudo foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

- Controle (CT): os animais deste grupo receberam tratamento com veículo;
- Nefropatia Induzida por Contraste (NIC): os animais deste grupo receberam tratamento com VH, injeção de contraste e injeção de L-name + indometacina ;
- Nefropatia Induzida por Contraste + Sildenafil (NIC + S): os animais deste grupo receberam tratamento com sildenafil, injeção de contraste e injeção de L-name + indometacina.

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Tratamento

Os animais foram tratados, durante 7 dias, por gavagem, com sildenafil (50 mg/Kg/dia) ou veículo, neste caso água destilada (2mL/Kg/dia):

3.3.2 Nefropatia Por Contraste

O procedimento de indução da nefropatia por contraste foi adaptado a partir de protocolos previamente validados em camundongos por Billings et al (2008) e Lee et al (2006). A indução da foi feita em duas partes: indução da insuficiência renal aguda (IRA) por restrição de H₂O e injeções i.p. de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) + indometacina (inibidor da cox); injeção ip de contraste. Portanto:

Indução da IRA:

- No quinto dia de tratamento com sildenafil/água era feita uma restrição hídrica de 24h;
- No sexto dia, após 24h de restrição hídrica, os animais eram anestesiados com uma mistura de Ketamina (91 mg/Kg) e xilazina (9,1 mg/Kg), i.p.. Depois de anestesiados, os animais tinham sua artérial femoral canulada e, antes das injeções i.p. de L-NAME e indometacina, era retirado 0,3mL de sangue (para análise de creatinina e uréia plasmática antes da indução da insuficiência renal aguda pelo L-NAME e Indometacina). Em seguida, os mesmos animais eram submetidos à injeções i.p. (10mg/Kg) de L-NAME (diluído em solução salina) e indometacina (diluído em DMSO).

Injeção de contraste:

- Ainda no sexto dia, 15 minutos após as injeções i.p. de L-NAME e Indometacina, era feita a infusão de 3g/Kg do meio de contraste não iônico de baixa osmolaridade (IOHEXOL – 320 mg / mL), ou de salina (0,9%), através da canulação da veia femoral. No sétimo dia era feita a análise da função renal.

Esquema relacionando os dias de tratamento com as retiradas de amostras antes do experimento da função renal:

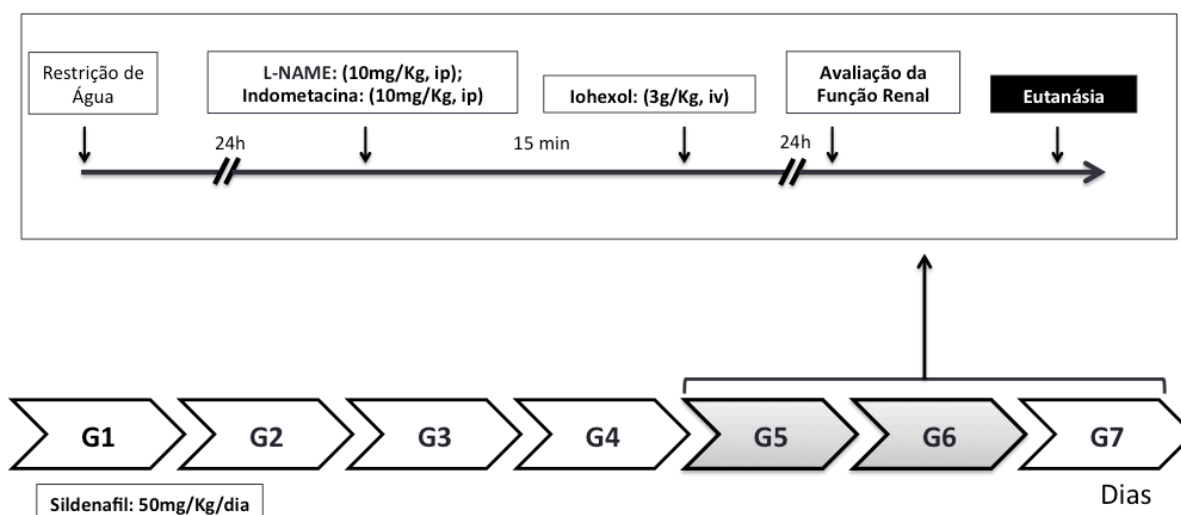


Figura 3 – Organograma esquematizando toda ordem cronológica experimental. A letra G está representando a gavagem (50mg/Kg/dia de sildenafil); os números de 1 – 7 são os dias; os dois balões cinzas (G5 e G6) estão representando os dias de indução da nefropatia por contraste; a caixa retangular acima representa a ordem cronológica ampliada sobre a indução da NIC até a eutanásia do animal (de G5 até G7).

3.3.3 Preparação da Cirurgia dos Animais

Vinte e quatro horas após a administração intravenosa do contraste, os ratos eram anestesiados i.p. com tiopental (50 mg/Kg i.p.) e eram mantidos em decúbito dorsal. Logo após eram feitas incisões afim de canular:

- a traquéia (PE-240): afim de facilitar a ventilação pulmonar do animal;
- a bexiga (PE-240): para coletar diretamente as amostras de urina formada;
- a veia femoral esquerda (PE-50), canulada um dia antes: para a infusão das soluções de prime e manutenção do prime. A infusão da solução de manutenção foi dada através de uma bomba de infusão contínua, na velocidade de 0,1mL/ min;
- a artéria femoral esquerda (PE-50), canulada um dia antes: afim de coletar as amostras de sangue e registrar a pressão arterial do animal.

3.3.4 Protocolo Experimental

Antes de começar o protocolo de função renal, era retirado de cada animais 0,3 ml de sangue, para a análise de ureia e creatinina plasmáticas 24hrs após as injeções de L-NAME e indometacina.

O tempo zero do experimento foi registrado como tempo de cirurgia. Após o término da cirurgia, o animal era levado à uma mesa onde sua veia era conectada a uma bomba de infusão contínua para a infusão das soluções e sua artéria ligada a um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems). Cada rato teve seus dados pressóricos registrados durante todo o experimento, e cada etapa do protocolo experimental durou 30 minutos.

O segundo tempo do experimento se dava pela infusão de solução salina isotônica com manitol a 3% (para aumentar a diurese) a uma velocidade de 0,1mL/min. Enquanto isso, 4 tubos para a coleta de urina eram pesados, 4 ependorfs eram preparados com 2 gotas de heparina para as coletas de sangue e 4 micro-capilares heparinizados eram organizados de forma a coletar sangue para o cálculo do hematócrito.

Após o tempo de perfusão do manitol, era feita manualmente a infusão da solução de *prime* (manitol + inulina e PAH). Devido às características específicas do transporte dessas substâncias (inulina e PAH) ao longo do rim, podemos analisar alguns parâmetros importantes da função renal, através do seu "*clearance*". Entretanto, essas substâncias não são produzidas naturalmente nos animais. Assim, é necessária a infusão endovenosa em uma concentração pré-determinada apropriada para as dosagens das mesmas no sangue e na urina após um determinado período de tempo. Segundos após a infusão do *prime*, iniciou-se a infusão da solução de manutenção do *prime* (durante todo o experimento) através da bomba infusora. Este procedimento se faz necessário por manter tais substâncias nas concentrações plasmáticas desejadas devido á função de depuração dos rins.

Após um período de 30 minutos, eram realizados 4 coletas de urina e de sangue (era centrifugado gerando o plasma), no período de 30 a 30 minutos. Resultando

em 30 minutos de infusão de manitol e 2 horas dividida em 4 coletas de amostras com infusão contínua de solução de manutenção. O protocolo de acima descrito encontra-se esquematizado no esquema abaixo:

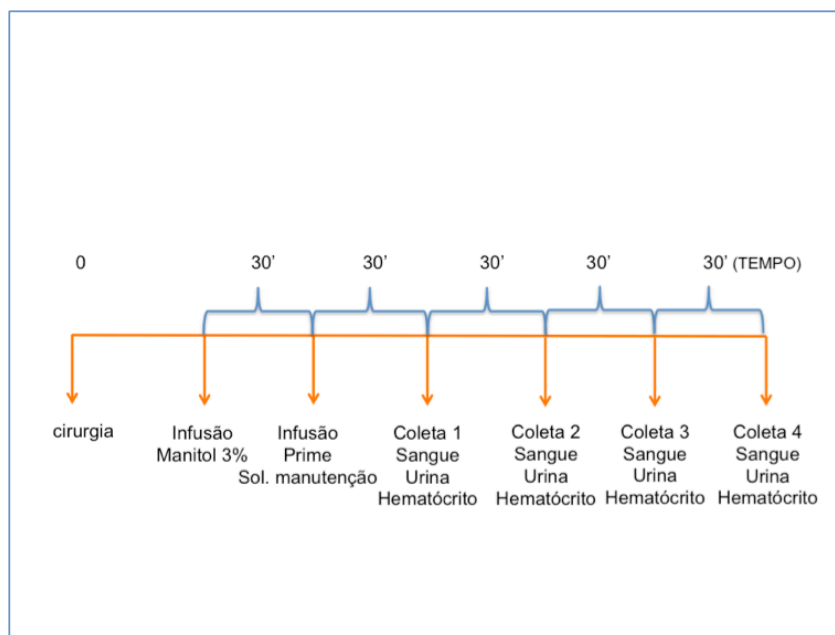


Figura 4 – Esquema experimental das etapas do procedimento de análise da função renal.

3.4 PARÂMETROS RENAIIS ANALISADOS

3.4.1 Avaliação da Hemodinâmica Renal

A análise da hemodinâmica e função renal inclui a avaliação dos parâmetros de fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo plasmático renal (FPR), resistência vascular renal (RVR), taxa de filtração glomerular (TFG) e fração de filtração (FF) através da determinação do hematócrito e *clearance* de inulina e para-aminohipurato (PAH).

As amostras de urina e plasma coletadas durante as duas horas de experimento foram utilizadas para medida de *clearance* de inulina e *clearance* de PAH, utilizando o reagente de antrona numa modificação do método de Fuehr e uma modificação do método de Smith, respectivamente. O volume urinário foi determinado gravimetricamente. As amostras retiradas antes do protocolo renal foram utilizadas

para medida da uremia, creatinina plasmática (utilizando-se Kits Bioclin ®) e proteinúria. Todas as análises foram feitas por espectrofotometria.

Foram analisados:

- Taxa de Filtração Glomerular (TFG): mL/min/Kg, determinado através do clearance de inulina (FUEHR et al. 1955);
- Fluxo Plasmático Renal (FPR): mL/min/Kg, determinado através do clearance de PAH (Smith et al. 1945);

Para se calcular o clearance (C) de uma substância emprega-se a seguinte relação:

$$C \text{ (mL/min)} = U \times V / P$$

Onde: U: concentração da substância na urina;

P: concentração da substância no plasma;

V: fluxo urinário em mL/min.

- Fluxo Sanguíneo Renal (FSR): mL/min/Kg, determinado através do FPR e hematócrito ($FSR = FPR / (1 - \text{Hematócrito})$);
- Fração de Filtração (FF): valores percentuais, determinada através da razão entre a TFG e FPR;

Resistência Vascular Renal (RVR): unidades arbitrárias (u.a.), determinada matematicamente através da lei de Ohm, pela razão entre a pressão arterial média (PAM) e FSR.

3.4.2 Avaliação Dos Parâmetros Bioquímicos

Para a avaliação da uréia plasmática, creatinina plasmática e proteinúria, houveram dois períodos de coleta de sangue e urina, o primeiro no sexto dia antes da indução da IRA e o segundo 24h depois da indução da IRA (antes de começar a função renal). Para a coleta de urina, o animal era colocado numa mesa limpa, em cima de um papel filme, aonde o mesmo urinava e sua urina era coletada. Enfim, analisou-se:

- Delta Creatinina Plasmática (%): onde as amostras plasmáticas foram retirada e analisadas, possibilitando-nos calcular, em valores absolutos (mg/dL), as concentrações de creatinina plasmática antes e após a indução da IRA e, de posse desses valores, determinamos a variação percentual dessas concentrações;
- Delta Uremia (%): através das amostras plasmáticas analisadas, calculamos, em valores absolutos (mg/dL), as concentrações de uréia plasmática antes e após a indução da IRA e, de posse desses valores, determinamos a variação percentual dessas concentrações;
- Delta Proteinúria (%): onde as amostras urina foram retirada e analisadas através do método de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250), possibilitando-nos calcular, em valores absolutos (mg/dL), as concentrações de proteína na urina antes e após a indução da IRA e, de posse desses valores, determinamos a variação percentual dessas concentrações.

3.4.3 Preparação Das Amostras

No final de cada experimento, com o intuito de eliminar o sangue do sistema circulatório, era feita uma incisão torácica que permitia um livre acesso ao coração do animal, onde foi feita uma pequena incisão no átrio direito para liberar a passagem do sangue e, aproximadamente, 200 mL de solução fisiológica Krebs-Hepes (pH 7,4) foi infundida pelo ventrículo esquerdo com auxílio de uma agulha de 22-gauge. A solução foi infundida com pressão controlada pela força da gravidade, sendo a pressão hidrostática determinada pela altura da coluna de vidro contendo a solução (1,36 cm H₂O = 1 mmHg). Ao término da perfusão, o rim direito era separado da cápsula renal e então era removido e pesado. Logo após, o rim esquerdo também era retirado e ambos eram colocados numa placa de Petri contendo 2 mL de solução fisiológica de Krebs- Hepes e armazenados em PBS (0,1 M; pH 7,4), por no máximo 24hrs, para análise citológica. O coração também foi retirado e pesado.

3.4.4 Medidas Biométricas Do Rim E Coração

O índice de massa renal foi calculado pela razão massa do rim direito e tamanho da tíbia (g / cm) para verificar a existência de hipertrofia. Também calculamos a razão entre a massa do coração e tamanho da tíbia (g / cm) para determinar a presença de hipertrofia cardíaca.

3.4.5 Avaliação Do Stress Oxidativo

Para a análise celular, utilizamos um citômetro de fluxo (FACSCanto II Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) acoplado a um computador. No citômetro de fluxo, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulosidade, e intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de marcação pela sonda fluorescente utilizada (DCF, DHE...).

Através dos rins retirados de cada animal, foi feito o isolamento (por técnica enzimática) das células renais. Essas células foram colocadas no citômetro e foram analisados os níveis citoplasmáticos do:

- Óxido Nítrico (NO) = expresso na citometria como DAF;
- Peroxinitrito (NO_3^-) = expresso na citometria como HPF;
- Superóxido (O_2^-) = expresso na citometria como DHE;
- Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) = expresso na citometria como DCF.

Os dados estão expressos como Média \pm EPM e ANOVA 1 via seguida de teste post-hoc de Tukey. A análise estatística dos dados foi efetuada com o auxílio do *software* GraphPad Prism 6.0. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 MASSA CORPORAL (RIM / CORAÇÃO)

Com o objetivo de observar se há hipertrofia cardíaca e aumento da massa relativa dos rins nos ratos submetido ao meio de contraste, foi feita uma comparação da massa do coração e do rim e determinada a razão entre a massa cardíaca e comprimento da tíbia e a razão entre massa renal e comprimento da tíbia dos ratos. Após todo o procedimento de análise da função renal, os animais eram perfundidos com uma solução nutritora de KREBS- HEPES e os rins e coração eram removidos e pesados e a tíbia era retirada.

A tabela abaixo apresenta os valores obtidos nas análises antropométricas. Como pode ser observado, a razão entre massa renal e tíbia demonstrou-se aumentada em ambos os grupos que receberam contraste, quando comparados com o grupo controle, assim como a massa cardíaca. Sendo assim, a administração do meio de contraste gerou um aumento da massa renal e massa cardíaca.

Parâmetros	Controle (n=5)	NIC (n=6)	NIC + sildenafil (n=5)	P
Massa corporal (g)	398 ± 9	323 ± 16*	292 ± 12*	0.0003
Massa renal/ comprimento tíbia (g/cm)	0.338 ± 0.004	0.453 ± 0.013*	0.416 ± 0.028*	0.001
Massa cardíaca/ comprimento tíbia (g/cm)	0.298 ± 0.007	0.338 ± 0.008*	0.338 ± 0.011*	0.008

Tabela 1- Análises antropométricas (massa corporal, massa renal e massa cardíaca) 1 dia após a indução da nefropatia por contraste. Todos os valores são expressos como média ± SEM. Os números entre parêntesis representam os números de animais em cada grupo. * p <0,05 vs. grupo controle. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey post hoc.

4.2 HEMODINÂMICA RENAL

4.2.1 Taxa De Filtração Glomerular (TFG)

Nosso primeiro resultado diz respeito ao clearance de inulina. Em 1935, Shannon e Smith propuseram como substância ideal, para a medida da taxa de filtração glomerular, a inulina, um polímero da frutose, cujo peso molecular é de 5.200 dáltons (Shannon et. al., 1935). Exceto por ser um marcador exógeno, a inulina preenche os demais critérios que um marcador ideal de filtração glomerular deveria ter, ou seja: ser livremente filtrada pelos glomérulos; não ser nem sintetizada e nem destruída pelos túbulos; ser fisiologicamente inerte; e não ser nem reabsorvida e nem secretada pelos túbulos (Cohen, 1975). Logo, sua taxa de excreção é diretamente proporcional à taxa de filtração. A depuração (*clearance*) da inulina passou a ser considerada o método padrão da medida da taxa de filtração glomerular (TFG) tanto para animais como para o homem (Knutsen et. al., 1959; Shuster et. al., 1985; Woolfson et. al., 1997). Portanto, para calcular a TFG aplicamos a fórmula $TFG = (\text{concentração urinária} \times \text{volume}) / \text{concentração plasmática}$.

O grupo NIC ($3,77 \pm 0,26^{* \#}$ mL/min/Kg) apresentou uma diminuição significativa da TFG quando comparado com o grupo Controle ($8,53 \pm 0,55$ mL/min/Kg), comprovando assim que a administração de meio de contraste diminui a taxa de filtração glomerular. No entanto, o tratamento durante sete dias com o sildenafil preveniu a nefropatia induzida pelo contraste no grupo NIC + S ($6,77 \pm 0,39^{* \&}$ mL/min/Kg). Portanto, o sildenafil preveniu a queda da TFG de todos os animais que fizeram o tratamento durante 7 dias, confirmando as nossas expectativas para com o tratamento com o sildenafil. Entretanto, o tratamento com o sildenafil não foi capaz de restabelecer a TFG a valores normais.

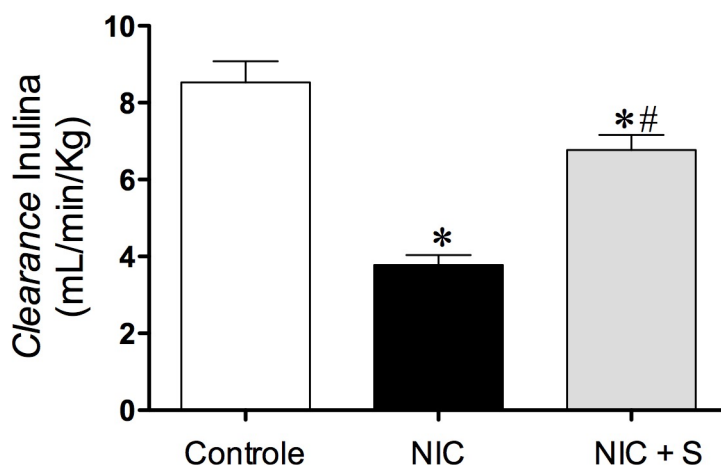


Figura 5 – Valores da TFG através do clearance de inulina, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.2.2 Fluxo Plasmático Renal (FPR)

Para calcular o fluxo plasmático renal (FPR), é necessário a utilização de uma substância que além de ser livremente filtrada deve também ser secretada, e suas quantidades e concentrações serão sempre maiores que as filtradas. Toda quantidade dessa substância que entrar no rim será excretada. (Aires et. al., 2008). Para isso, utilizamos o paraamino-hipurato (PAH), que é um pequeno ânion orgânico solúvel em água, com peso molecular igual a 194 D. Portanto, através do seu *clearance* calculamos: $FPR = (\text{concentração urinária} \times \text{volume}) / \text{concentração plasmática}$.

Os resultados demonstraram uma diminuição do fluxo plasmático renal nos dois grupos quando comparados com o grupo controle ($20,04 \pm 0,9$ mL/min/Kg). Como já esperávamos, o grupo NIC ($9,59 \pm 0,38^*$ mL/min/Kg) teve uma diminuição significativa do FPR quando comparado com o grupo NIC + S ($13,18 \pm 0,26^{* \#}$ mL/min/Kg). Enfim, o tratamento com o sildenafil foi eficaz na prevenção da diminuição do FPR induzida pelo contraste.

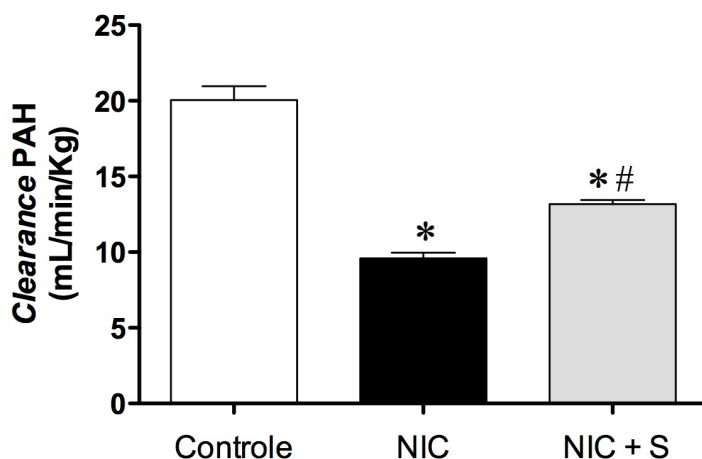


Figura 6 – Valores do FPR através do clearance de PAH, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.2.3 Fluxo Sanguíneo Renal (FSR)

O fluxo sanguíneo renal (FSR) refere-se ao ritmo em que o sangue flui para os rins. O fluxo plasmático renal (FPR) refere-se à parte do FSR que é o plasma. Portanto, para calcularmos o FSR dependemos do FPR e do hematócrito: $FSR = FPR / (1 - \text{Hematócrito})$.

Nossas análises demonstraram uma diminuição significativa do fluxo plasmático renal em todos os grupos quando comparados com o grupo controle ($35,01 \pm 2,02$ mL/min/Kg). O grupo NIC + S ($22,46 \pm 0,8^{* \#}$ mL/min/Kg) apresentou uma diferença significativa quando comparado com o grupo NIC ($16,08 \pm 0,75^*$ mL/min/Kg, graças ao tratamento com sildenafil).

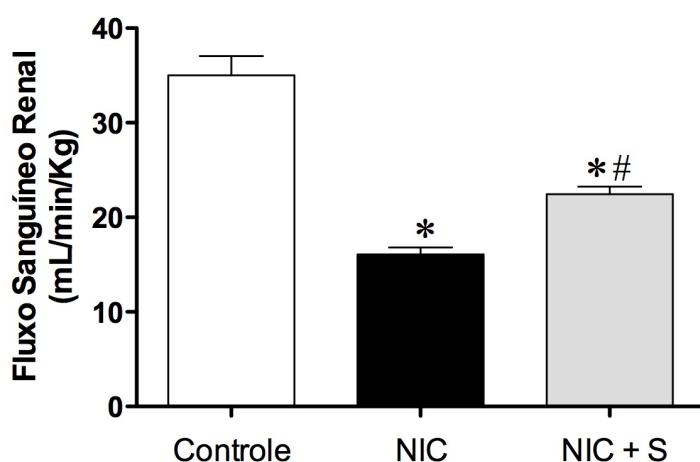


Figura 7 – Valores referentes ao FSR, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.2.4 Fração de Filtração (FF)

Fração de filtração (FF) é a fração ou porcentagem do fluxo plasmático que passa através do glomérulo e se transforma em filtrado glomerular. É, portanto, calculado pela razão da taxa de filtração glomerular e fluxo plasmático renal: $FF = TFG/FPR$.

Ao fazermos as análises estatísticas, obtivemos os seguintes resultados: controle ($40 \pm 1,67$ %), NIC ($42,69 \pm 2,85$ %) e NIC + S ($49,29 \pm 2,03$ %), onde não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

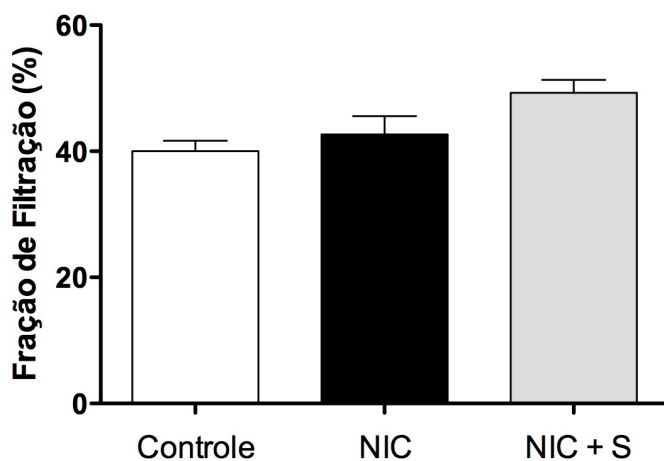


Figura 8 – Valores referentes à FF, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.2.5 Resistência Vascular Renal (RVR)

Através da pressão arterial média (PAM) obtida durante todo o experimento pela artéria femoral conectada a um transdutor de pressão ligado a um sistema de aquisição de dados, calculamos a resistência vascular renal (RVR): $RVR = PAM / FSR$.

Nossos dados demonstraram um aumento da resistência vascular renal no grupo NIC ($7,72 \pm 0,31^*$ u.a) comparado com o grupo controle ($3,59 \pm 0,46$ u.a) . O sildenafil preveniu o aumento da RVR em ratos submetidos ao meio de contraste (NIC + S: $4,86 \pm 0,17^\#$ u.a).

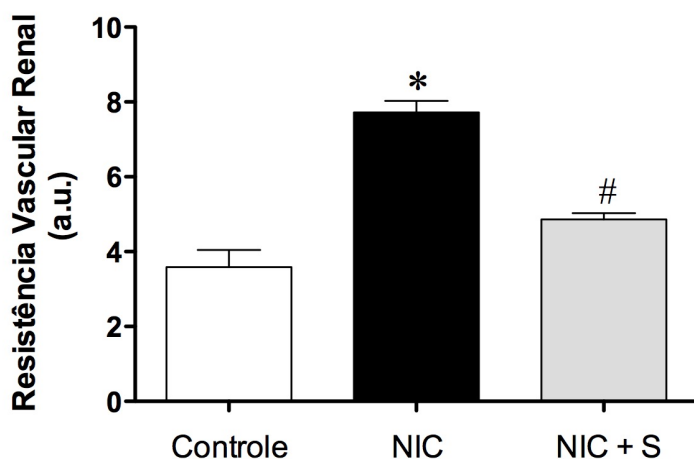


Figura 9 – Valores referentes à RVR, feito 1 dia após a indução da nefropatia por contraste. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.3 URÉIA PLASMÁTICA

Calculamos, em valores absolutos, as concentrações de uréia plasmática (mg/dL) antes e após a indução da IRA e, de posse desses valores, determinamos a variação percentual dessas concentrações.

Como resultado, encontramos um aumento nos níveis de uréia plasmática nos grupos NIC ($279,7 \pm 19,21^*$ %) quando comparados com o grupo controle ($55 \pm 2,5$ %). O grupo NIC + S ($57,44 \pm 4,46^\#$ %) apresentou uma diminuição significativa nos níveis de uréia demonstrando mais uma vez a função protetora do sildenafil sobre a NIC.

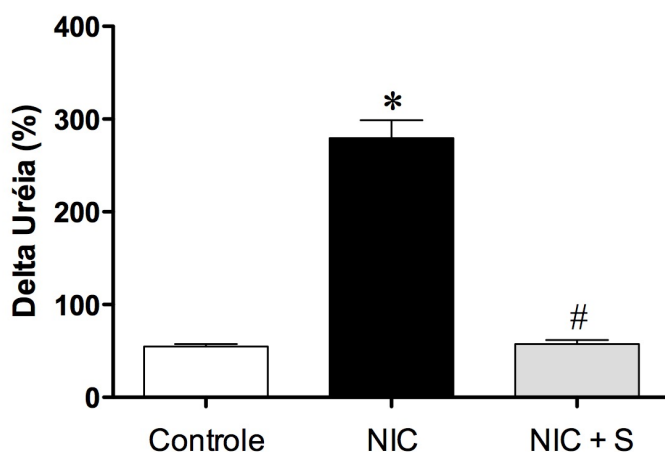


Figura 10 – Valores percentuais dos níveis de uréia plasmática. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; $^\# p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.4 CREATININA PLASMÁTICA

Calculamos, em valores absolutos, as concentrações de creatinina plasmática (mg/dL) antes e após a indução da IRA e, de posse desses valores, determinamos a variação percentual dessas concentrações.

Nossos resultados demonstraram um aumento significativo dos níveis de creatinina plasmática no grupo NIC ($207,5 \pm 19^*$ %) quando comparados com o controle ($37,28 \pm 1,1$ %). O sildenafil preveniu a piora da função renal tanto no grupo NIC + S ($56,66 \pm 3,98^\#$ %).

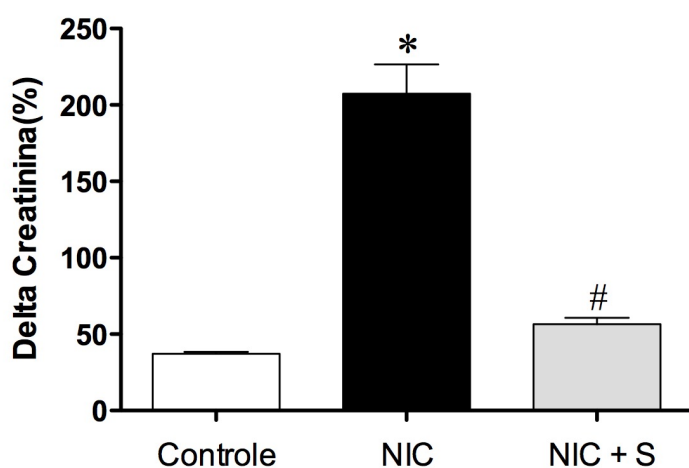


Figura 11 – Valores percentuais dos níveis de creatinina plasmática. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.5 PROTEINÚRIA

Decidimos analisar se nesse modelo, IRA por contraste, haveria perda de proteína pela urina. Da mesma forma que calculamos a uréia e creatinina plasmáticas, também calculamos, em valores absolutos (mg/dL), as concentrações de proteína na

urina antes e após a indução da IRA e, de posse desses valores, determinamos a variação percentual dessas concentrações.

Pudemos observar um aumento significativo dos níveis de proteinúria nos grupos NIC ($130,2 \pm 3,91$ %) e NIC + S ($64,61 \pm 3,44$ %) quando comparados com o grupo controle ($28,78 \pm 1,32$ %). Porém, o grupo NIC + S apresentou uma diminuição significativa dos níveis de proteinúria quando comparado com o grupo NIC, mostrando que além do sildenafil prevenir a piora da função renal de ratos submetidos ao meio de contraste, ele impediu uma maior perda de proteinúria causada pela NIC.

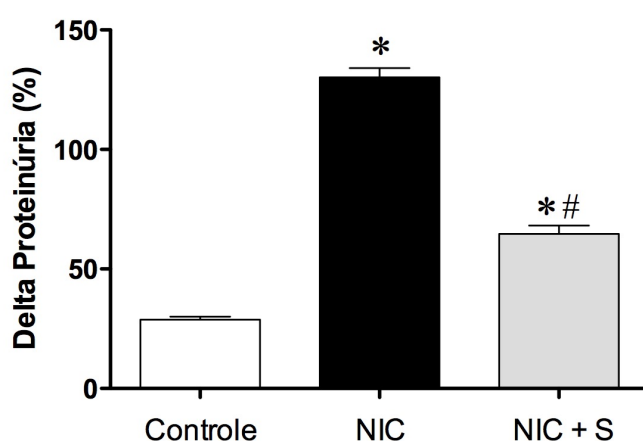


Figura 12 – Valores percentuais dos níveis de proteína na urina. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.6 AVALIAÇÃO DO STRESS OXIDATIVO

Como foi visto durante o trabalho, diversos autores acreditam que há uma produção desequilibrada de radicais livres na nefropatia induzida por contraste. Devido a isso, muitos estudos têm sido feitos, porém, poucos são os resultados sobre espécies reativas de oxigênio.

Para isso, em nossos estudos foram realizadas medidas intracelulares das espécies reativas de oxigênio (ROS) por quantificação indireta da concentração citosólica renal de $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 , NO, ONOO^- e $\text{OH}\bullet$ através da técnica de citometria de fluxo. Todas as amostras foram isoladas em no máximo 24hrs, e armazenadas em -80°C . Como primeiro resultado temos o DHE que demonstra o nível de O_2^- , onde não houve diferença significativa entre os dois grupos que receberam contraste (NIC: $2106,0 \pm 103,7$; NIC + S: $2033,0 \pm 38,0$) quando comparados com o grupo controle ($1605,0 \pm 91,5$). O segundo resultado foi o DCF que nos mostra a quantidade celular de H_2O_2 , onde podemos perceber um aumento significativo nesses níveis no grupo NIC ($2649,0 \pm 239,3$) quando comparado com o grupo controle ($1673,0 \pm 54,7$), e o sildenafil preveniu o aumento dessa espécie reativa de oxigênio (NIC + S: $1973,0 \pm 118,0$). O DAF demonstra os níveis de NO produzidos pela célula, não houve diferença significativa entre os 3 grupos (controle: $1532,0 \pm 19,04$; NIC: $1590,0 \pm 51,37$; NIC + S: $1589,0 \pm 41,85$). Por último, foi feita a análise de HPF que demonstra a concentração de ONOO^- e $\text{OH}\bullet$, podemos perceber um aumento significativo nos níveis de ONOO^- e $\text{OH}\bullet$ no grupo NIC ($3353,0 \pm 159,9$) quando comparado com o grupo controle ($1534,0 \pm 85,3$), e o sildenafil preveniu esse aumento (NIC + S: $2890,0 \pm 101,0$).

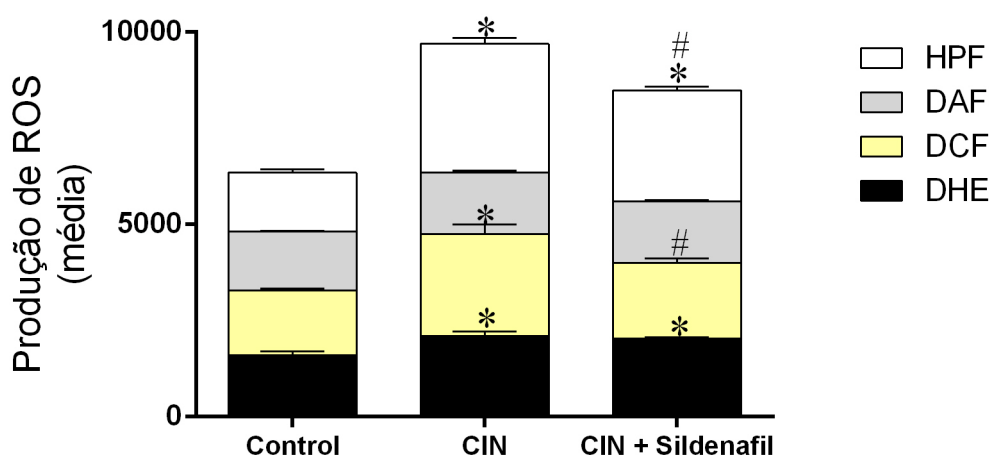


Figura 13 – Medida citológica renal por citometria de fluxo. Controle; NIC (nefropatia induzida por contraste); NIC + S (nefropatia induzida por contraste + sildenafil). DHE (O_2^-); DCF (H_2O_2); DAF (NO); HPF (ONOO^- e $\text{OH}\bullet$). Todos os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. ; # $p < 0,05$ vs. grupo NIC. ANOVA 1 via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

5. DISCUSSÃO

É importante ressaltar a originalidade da linha de pesquisa e o ineditismo deste estudo. Como vimos, a pesquisa sobre nefropatia por contraste é muito ampla, e apresenta diversos modelos experimentais e métodos de avaliação, porém, todos os trabalhos possuem o método de avaliação da função renal por dosagens de uréia e creatinina. Nosso estudo é o primeiro a investigar os efeitos do inibidor de PDE-5, tanto na hemodinâmica renal quanto na participação do estresse oxidativo, através da avaliação inovadora da função renal por padrões-ouro (clearance de inulina e PAH) aliando alterações funcionais acrescidas de investigações a nível molecular, em ratos wistar submetidos ao meio de contraste.

No presente estudo experimental, mostramos que o sildenafil a 50 mg / kg tem um potencial terapêutico na prevenção da NIC através da diminuição da resistência vascular renal, congestão tubular e produção de ROS neste modelo experimental. Este modelo foi desenvolvido com base em um relatório anteriormente feito por Yokomaku e colaboradores (Yokomaku et. al., 2008) afim de investigar a suscetibilidade dos ratos ao contraste iodado após a inibição aguda da produção de NO e prostaglandina.

A NIC ocupa a terceira posição das principais causas de insuficiência renal adquirida em hospital, e esta condição tem sido associada com aumento dos custos de cuidados médicos durante a internação e prolongamento do tempo de internação hospitalar. Embora várias estratégias de prevenção farmacológica - incluindo o uso de N-acetilcisteína, dopamina, fenoldopam, peptídeo natriurético atrial, diuréticos pós-procedimento, antagonistas do receptor de endotelina, bloqueadores dos canais de cálcio, prostaglandina E1, aminofilina ou teofilina, estatinas, e ácido ascórbico - têm sido propostas, os resultados são bem controversos. As duas principais teorias sobre a patogênese da NIC são vasoconstrição renal e efeitos citotóxicos diretos dos agentes de contraste, possivelmente mediados pela diminuição de NO, aumento de adenosina, aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio, resultando em hipoxia medular (Kedrah et. al., 2012; Taylor et. al., 2007; Agmon et. al., 1994; Cunha et. al., 2002; Erley et. al., 1997).

Estudos anteriores demonstraram a ação vasodilatadora dos inibidores da PDE5 no rim (Lledo et. al., 2007; Malavaud et. al., 2001), reduzindo dano tubular com obstrução uretral unilateral (Akgül et. al., 2011) e reduzindo danos renais em modelos de isquemia-reperfusão em ratos. Também melhorou a perfusão do músculo esquelético durante o exercício, reduziu a pressão arterial e atuou sobre o remodelamento vascular (Güzeloğlu et. al., 2011; Gasanov et. al., 2011; Roseguini et. al., 2014;. Lledo et. al., 2007; Zhao et. al., 2001; Choi et al., 2010; Küçük et al., 2012; Koyama et al., 2001). A importância fisiológica de PDE5 na regulação do tônus do músculo liso tem sido demonstrada em estudos clínicos há mais de duas décadas no tratamento da disfunção erétil e hipertensão pulmonar, e neste tempo provou ser segura e desprovida de efeitos secundários graves (Leoni et. al., 2013; Bivalacqua et al., 2009). Através de dados obtidos em nosso laboratório, sabemos que o sildenafil causa relaxamento vascular, reduz os níveis plasmáticos de AngII, reduz os danos ao DNA em animais com aterosclerose e hipertensão renovascular e possui efeitos pleiotrópicos (diminui NADPH oxidase e apoptose) (Balarini et al, 2013;. Rodrigues et al, 2013;. Dias et al 2014Dias AT et al, 2014;. Leal et al, 2015;. Fahning et al, 2015.).

Em seres humanos, tem sido relatado diminuição do fluxo sanguíneo renal em 30-45% dentro de 2-4 h após a injeção de meio de contraste, podendo conduzir à deterioração da função renal devido a hipóxia medular (Kedrah et. al., 2012). A NIC é geralmente definida por uma elevação dos níveis de creatinina sérica de 44,2 µmol/L (0,5 mg / dL) ou mais do que 25% do valor anterior dentro de 2-5 dias após a exposição ao meio de contraste (Morcos et. al., 1999). Em nosso trabalho utilizamos biomarcadores endógenos (creatinina, uréia e proteinúria) e exógenos (inulina e PAH) para a avaliação da função renal. No entanto, alguns autores têm avaliado a cistatina C como um potencial biomarcador da função renal. Cistatina C é um marcador confiável para o diagnóstico precoce e prognóstico de insuficiência renal aguda induzida por contraste em humanos e em ratos (Briguori et al., 2010; Alioğlu et al., 2013; Kerem et al., 2015).

A uréia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo 90% excretados pelos rins e correspondendo a aproximadamente 75% do nitrogênio não-protéico excretado. O restante da uréia é

eliminado basicamente pelo trato gastrointestinal e pela pele. Apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo, não ser reabsorvida nem secretada ativamente, a uréia é um fraco preditor da TFG, pois 40%-70% retornam para o plasma por um processo de difusão passiva, que é dependente do fluxo urinário. Logo, a estase urinária leva a um maior retorno de uréia ainda nos túbulos renais e a uma subestimação da TFG calculada pelo *clearance* de uréia. Outros fatores podem mudar significativamente os valores plasmáticos da uréia sem terem relação com a função renal, destacando-se a dieta e a taxa de produção hepática (Fábio et. al., 2007).

A creatinina é um produto residual da creatina e é filtrada livremente no glomérulo. Ao contrário da uréia, a creatinina é ativamente secretada em uma pequena parcela, mas o suficiente para superestimar a TFG. A quantidade secretada não é constante e depende do indivíduo e da concentração plasmática desse analito, dificultando sobremaneira a determinação de uma constante de secreção. Em termos gerais, 7%-10% da creatinina presente na urina é secretada. Apesar de superestimar a TFG e depender da massa muscular, o *clearance* de creatinina continua sendo um dos marcadores mais usados na avaliação da função renal (Fábio et. al. 2007).

A proteinúria é determinada como uma grande perda de proteína pela urina, especialmente a albumina. Essa perda pela urina é um achado comum em diversas disfunções renais e em algumas vezes pode ser discreta (quando há perdas de alguns mg/dia) ou intensa (quando há perdas de algumas gramas/dia). Dessa maneira, calculamos, em valores absolutos, as concentrações plasmáticas de uréia, e creatinina e proteinúria (mg/dL) antes e após a indução da IRA e, de posse desses valores, determinamos a variação percentual dessas concentrações

Nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de creatinina e uréia plasmáticos após a exposição ao contraste, de forma semelhante, outros autores também tiveram aumento destes biomarcadores após a NIC (Andreucci et al., 20014; Caiazza et al., 2014; Pisani et al., 2014; Tumlin et al., 2006). Observamos também um aumento das concentrações de proteinúria no grupo NIC, mas não no grupo tratado com sildenafil (NIC+ Sildenafil). Em conjunto, estes resultados indicam disfunção e prejuízo renal graves provocados pelo contraste. Estudos in vitro e in vivo demonstraram que o meio de contraste gera danos às células do túbulo

proximal (russo et al., 1995; Agmon et. al., 1994; Lauver et. al., 2014; Kongkham et. al., 2013). Como outras partículas osmóticas, o contraste na luz tubular reduz a quantidade de água reabsorvida aumentando a pressão tubular e reduzindo o gradiente de filtração nos capilares glomerulares, o que aumenta a viscosidade, a produção de ROS, o consumo de ATP e a formação de adenosina, gerando hipoxia (Person et. al., 2005; Dobrota et. al., 1995; Katzberg et. al., 1983; Tumlin et. al., 2006; Ricardo et. al., 2011). Acreditamos que o sildenafil através da redução dos níveis de ROS, melhora o fluxo tubular, reduzindo a pressão hidrostática na cápsula de Bowman e a pressão oncótica no capilar glomerular, diminuindo então a congestão medular gerada pelo contraste e aumentando assim a TFG, evitando toxicidade celular direta e prevenindo danos glomerulares e tubulares,

Outra lesão causada pelo aumento da pressão de perfusão é o aumento da geração de ROS no arteríola aferente (EY Lai et ai, 2012) provocando vasoconstrição e diminuição da TFG. Foi visto por Agmon e colaboradores que o fluxo sanguíneo renal diminui transitoriamente em resposta à administração do contraste (Agmon et. al., 1994), e sabemos que o sildenafil melhora o fluxo sanguíneo renal local (Malavaud et. al., 2001). Em nossos resultados, observamos um maior declínio da TFG proporcional à osmolaridade do agente, no grupo NIC. A diminuição da TFG foi relacionada com a redução da perfusão renal, tal como demonstrado pela diminuição paralela e proporcional do FPR. Comparando as alterações do FPR paralelamente à variação da TFG, percebemos que o sildenafil preveniu o declínio da TFG através da diminuição da RVR, como já era esperado. Enfim, além do mecanismo clássico de inibição da PDE5, o sildenafil reduziu a pressão de perfusão, reduziu os níveis de ROS, principalmente na arteríola aferente, diminuindo RVR causando vasodilatação e conseqüente aumento da TFG, FPR e FSR.

Sabe-se que o contraste aumenta a pressão de perfusão aumentando a contração miogênica da arteríola aferente e o *feedback* tubuloglomerular (EY Lai et ai, 2011;. Magali et ai, 2014;. Ponto et al., 2005). Como sugerido por estudos experimentais, um fator que pode ter participado no desenvolvimento da vasoconstrição induzida pela NIC é o sistema de feedback tubuloglomerular (Reed et. al., 1983; Russo et. al., 1995): onde a depleção de sódio acentua a magnitude e a duração da fase vasoconstritora devido ao meio de contraste, e em resposta, há uma diminuição do

FSR, e o bloqueio do sistema renina-angiotensina intra-renal encurta a duração desta resposta (Russo et. al., 1995; Larson et. al., 1983; Reed et. al., 1983). O aumento da viscosidade provocada pelo contraste também pode gerar obstrução tubular fazendo com que haja um aumento de reabsorção tubular, que ativa as células da mácula densa a enviarem sinais para as células justaglomerulares liberarem renina, e com isso haver formação de AngII. A AngII é uma substância vasoativa que atua na arteríola aferente provocando contração e conseqüentemente diminuição do FSR e da TFG (AIRES et al. 2008). Existem sólidas evidências de que a adenosina seja o principal mediador do *feedback* túbuloglomerular (Katzberg et. al., 1983), provocando contração na arteríola aferente. Em um estudo realizado por Katholi et al , a administração do contraste iônico de alta osmolalidade gerou uma redução de 42% na depuração da creatinina, que foi parcialmente corrigido pela teofilina (um antagonista do receptor de adenosina) e que foi associado com um prolongado aumento na excreção de adenosina, sugerindo lesão tubular concomitante (Katholi et. al., 1995). O meio de contraste pode também aumentar a atividade da sódio-potássio-ATPase, levando ao aumento no gasto de ATP e aumento de adenosina livre, contribuindo para hipóxia medular . Esta noção é apoiada por vários estudos que mostraram alguns efeitos protetores dos antagonistas da adenosina na NIC (Vallon et. al., 2006; Erley et. al.,1997). Sendeski e colaboradores mostraram que o iodixanol contrai os vasos retos medulares descendentes e intensifica angiotensina II induzindo constrição (Sendeski et. al., 2009). Portanto, não podemos descartar a possibilidade do sildenafil influenciar nas vias da AngII e adenosina, uma vez que melhorando o FSR teremos menos mácula densa ativa, as células justaglomerulares liberam menos renina e possivelmente produzem menos AngII e há diminuição na produção de adenosina. Ao mesmo tempo, trabalhos de nosso laboratório (Balarini et. al., 2013; Dias et. al., 2014) mostraram que o tratamento com sildenafil reduziu os níveis de AngII tanto no plasma quanto em tecido renal de camundongos 2R1C.

Vimos que a diminuição do fluxo sanguíneo renal, com conseqüente diminuição da taxa de filtração glomerular, está diretamente ligado ao aumento da resistência vascular renal devido ao aumento na produção de ROS, causada pelo meio de contraste. Devido a isso, alguns estudos têm investigado o aumento do estresse

oxidativo, provocado pelo contraste, através da avaliação da peroxidação lipídica, visto que os produtos de peroxidação lipídica, em termos de MDA, demonstram-se aumentados no tecido renal e no sangue após a exposição ao meio de contraste (Kongkham et. al., 2013). Frente a isso, trouxemos resultados inéditos sobre alterações funcionais celulares renais acrescidas de investigações a nível molecular, após o contato com o contraste.

Alguns autores sugerem que a hipóxia resultante da NIC pode conduzir à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Geradas durante hipóxia parenquimatosa renal induzida por contraste, as ROS podem exercer lesão direta tubular e endotelial vascular e podem intensificar ainda mais a hipóxia parenquimatosa renal em virtude da disfunção endotelial e desregulação do transporte tubular. Acredita-se que há uma diminuição de óxido nítrico (NO) devido à sua reação com as ROS, em particular, superóxido (O_2^-). Esta reação pode levar à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), o mais poderoso oxidante e que pode ser mais prejudicial. A diminuição cortical e medular do fluxo sanguíneo induzida por meio de contraste é, em parte, explicada através do downregulation de NO cortical e medular. (Heyman et. al., 2010; Giaccia et. al., 2004; Sabbatini et. al., 2006; Dawson et. al., 1983; Sendeski et. al., 2011; Pisani et. al., 2013). Em nossos resultados o contraste aumentou a produção de ROS (O_2^- , H_2O_2 , OH^- , $ONOO^-$).

O primeiro resultado obtido pela citometria de fluxo foi DHE que mede a quantidade de O_2^- produzida pelas células renais. Observamos o aumento significativo de O_2^- renal dos grupos NIC e NIC + S. Acreditamos que um dos mecanismos principais pelo qual o contraste provoca o aumento no O_2^- seja via mitocondrial, visto que mesmo em condições fisiológicas, o transporte tubular é associado à formação de ROS, principalmente na parte espessa da alça de Henle onde a densa população mitocondrial representa uma importante fonte de geração de O_2^- , e radicais hidroxila (OH^-) (Heyman et. al., 2010; Pisani et. al., 2013; Riccio et. al., 2013). Em condições fisiológicas, o O_2^- é rapidamente eliminado pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), protegendo, assim, o NO formado e gerando no final $O_2 + H_2O$.

Um trabalho feito por Sendeski demonstrou que o Tempol, superóxido dismutase mimético, reduziu a vasoconstrição induzida por iodixanol, através da dismutação do

O_2^- , apoiando assim o papel das ROS na vasoconstrição de vasos retos medulares descendentes na NIC (Sendeski et. al., 2009). Nossos resultados de DCF demonstraram um aumento significativo dos níveis de H_2O_2 celular renal do grupo NIC. O contraste já havia induzido um aumento na produção de O_2^- neste grupo e já esperávamos um aumento nos níveis de H_2O_2 também. O grupo tratado com sildenafil apresentou um aumento de O_2^- provocado pelo contraste, porém, evitou o aumento na produção de H_2O_2 , prevenindo a piora da função renal de ratos submetidos ao meio de contraste apresentando uma diminuição significativa nos níveis de H_2O_2 , possivelmente pela ativação da SOD e da catalase, convertendo o H_2O_2 em $H_2O + O_2$.

Através dos resultados de HPF, o $ONOO^-$ e OH^- também foram analisados. Resumidamente, o O_2^- oxida o NO gerando o $ONOO^-$, ou seja, diminui a biodisponibilidade do NO fazendo com que haja vasoconstrição (Meyrelles *et al.*, 2011). Os grupos NIC e NIC + S tiveram um aumento significativo dos níveis de O_2^- quando comparado com o grupo controle e, quando analisamos os níveis de NO não observamos diferença entre os 3 grupos. Porém, para as mesmas quantidades de NO e O_2^- produzidas, o grupo NIC apresentou maior produção de $ONOO^-$ mostrando que houve uma atenuada oxidação do NO no grupo NIC quando comparado com o NIC + S, ou seja, o sildenafil preveniu o aumento não só de H_2O_2 mas também de $ONOO^-$ e OH^- .

Além do estresse oxidativo, há uma disfunção no mecanismo de defesa antioxidante com inativação de enzimas antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica provocados pelo meio de contraste (Agmon et. al., 1994; Myers et. al., 2006; Özbek et al 2015; Gasanov et. al., 2011; Wong et. al., 2012; Tepel et. al., 2000; Baliga et. al., 1999). Os mecanismos de defesa antioxidantes celulares consistem em componentes antioxidantes enzimáticos como a catalase, glutathiona-peroxidase e a superóxido dismutase (SOD) (Kongkham et. al., 2013). São observadas diminuição da capacidade antioxidante total no sangue e diminuição da atividade renal da SOD em ratos com nefropatia induzida por contraste (Kongkham et. al., 2013; Nordmann 1994) . A diminuição da atividade da SOD em tecido renal de ratos com NIC pode ser o resultado de estresse oxidativo induzido por inativação e / ou o consumo de antioxidante excessivo (Wohaieb et. al., 1987). Sabe-se que o sildenafil melhora a

capacidade antioxidante total de antioxidantes como, glutathione S-transferase (GSH-ST) e catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) (El-Far et al., 2009; Ozdegirmenci et al., 2011; Atilgan et al., 2014; Celik et al., 2014). Portanto, acreditamos que o sildenafil diminuiu os níveis de ROS na vasculatura renal através da ativação de enzimas antioxidantes. Acreditamos também no papel do sildenafil impedindo lesão renal aguda por meio da indução de biogênese mitocondrial (Whitaker et al., 2013) e melhorando as características morfológicas e mecânicas da mitocôndria (Lee et al., 2014), atenuando a vasodilatação renal, diminuindo a RVR e aumentando a TFG, o FPR e o FSR.

Nos últimos anos, surgiram evidências de que o meio de contraste provoca um aumento na RVR devido a perda na capacidade do endotélio vascular de produzir e liberar NO, ou por um desequilíbrio entre a produção de NO e de endotelina-1, que é essencial para a função vascular na regulação da perfusão dos órgãos. (HEYMAN SN et al. 2008; RICARDO OS et al. 2011; SENDESKI MM et al. 2009). Um achado importante em nosso trabalho foi sobre a produção de NO. Em nossos resultados, os níveis de NO se mantiveram inalterados nos grupos que receberam contraste, sendo semelhantes ao nível de NO produzido pelo grupo controle. Da mesma forma, um estudo *in vitro* feito em células umbilicais humanas demonstrou que mesmo após a exposição ao meio de contraste, essas células apresentaram uma quantidade de NO inalterada (Franke et al. 2009). Provavelmente, os níveis de NO não diminuíram nos grupos que utilizaram L-NAME devido a sua meia-vida, por ser curta (19,2 min) (Avontuur et al., 1998), visto que as células foram isoladas 24hrs após as injeções de L-NAME.

As prostaglandinas e NO ajustam continuamente o transporte tubular medular para o fornecimento de oxigênio, por aumento do fluxo sanguíneo regional e down regulation do transporte tubular. Portanto, acredita-se que algum defeito em um ou nestes dois mecanismos de proteção causará hipóxia medular, o que acontece pela indução por contraste (HEYMAN SN et al. 2008).

Portanto, não podemos esquecer das duas prostaglandinas vasodilatadoras renais que, além de exercerem função no tônus vascular, também agem no balanço hidroeletrólítico e na liberação de renina. As prostaglandinas renais são a

prostaglandina E₂ (PGE₂) e a prostaglandina I₂ (PGI₂ ou prostaciclina) (Michelin et al., 2006). A PGE₂ é encontrada em maior quantidade nos túbulos renais, onde regula o transporte de sódio e cloro na alça de Henle e interfere também no fluxo sanguíneo da medula renal (Delfino et. al., 1995). A PGI₂ é mais abundante no córtex renal, onde regula o tônus vascular renal, a TFG e a produção de renina (Michelin et al., 2006). A produção intra-renal desses vasodilatadores neutraliza o efeito vasoconstritor da angiotensina II sobre a vascularização intra-renal e ajuda manter a resistência vascular em níveis normais ou quase normais na arteríola aferente. Sem esse efeito protetor, a vasoconstrição generalizada resultaria em fluxo sanguíneo renal e TFG reduzidos, apesar da elevação da pressão arterial (Veriander, 1999). Foi visto que o contraste aumenta a concentração urinária de prostaglandina E₂ (Cantley et. al. 1993; Agmon et. al., 1994) .Portanto, mesmo não tendo medido prostaglandina, acreditamos na participação desses vasodilatadores na NIC, onde há um comprometimento dessa via após a utilização do contraste, e , acreditamos na ação do sildenafil aumentando a síntese de PGI₂ e PGE₂, assim como no trabalho de El-Sayed et. al., 2013.

Todas as concentrações de marcadores de estresse oxidativo encontrados neste experimento são igualmente relacionada com a patogênese da NIC e seus marcadores patológicos, incluindo TFG, FPR, uréia, creatinina e proteinúria. Nosso trabalho mostrou um aumento significativo da RVR em ratos submetidos ao meio de contraste, que pode ser explicada também pelo aumento dessas espécies reativas de oxigênio. Da mesma forma, o sildenafil foi capaz de reduzir a produção dessas espécies reativas de oxigênio fazendo com que as mesmas atuassem sobre a vascularização renal provocando uma vasodilatação. Acreditamos no papel das ROS sobre a arteríola aferente, contraindo-a. Quanto maior o nível de ROS, maior a contração, e consequentemente menor FSR e TFG, e vice-e-versa.

Em pacientes com NIC, diversos estudos clínicos relataram que o desequilíbrio do estresse oxidativo e os níveis de anti-oxidantes são uma característica comum dessa doença. Fatores que contribuem para o aumento do estresse oxidativo em pacientes com NIC, tais como diabetes, insuficiência renal aguda, inflamação crônica e uremia, também têm sido relatados (Hopps et. al., 2010; Vaziri 2004;

Vaziri et. al., 2013; Terawaki et. al., 2004). Assim, como um meio de prevenir a nefropatia induzida pelo contraste, estes grupos de pacientes podem, futuramente, ter o benefício do pré-tratamento com sildenafil, potente antioxidante, em casos de administração de contraste. Embora este seja um estudo experimental de prevenção da NIC em rato, o nosso trabalho apresenta uma prova de conceitos que podem ter implicações para futuras pesquisas clínicas em humanos.

6. CONCLUSÃO

Portanto, demonstramos, com este trabalho, que o tratamento durante 7 dias com sildenafil exerce efeitos profiláticos sobre a nefropatia induzida por contraste em ratos wistar. Este estudo demonstrou que o sildenafil foi capaz de prevenir a diminuição da TFG, do FPR e do FSR e prevenir o aumento da RVR, da creatinina sérica, da uréia sérica, da proteinúria e da produção de ROS.

7. REFERÊNCIAS

Agmon Y, Peleg H, Greenfield Z. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest.* 1994 Sep;94(3):1069-75. PubMed PMID: 8083347. PubMed Central PMCID: PMC295165

Aires MM . *Fisiologia.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Pp 679-707.

Akgül T, Huri E, Yağmurdur H, Ayyıldız A, Üstün H, Germiyanoglu C. Phosphodiesterase-5 inhibitors attenuate renal tubular apoptosis after partial unilateral ureteral obstruction: an experimental study. *Kaohsiung J Med Sci.* 2011 Jan;27(1):15-9. doi: 10.1016/j.kjms.2010.03.001. Epub 2011 Jan 28. PubMed PMID: 21329887

Alioglu E, Saygi S, Turk U, Kirilmaz B, Tuzun N, Duman C, Tengiz I, Yildiz S, Ercan E. N-acetylcysteine in preventing contrast-induced nephropathy assessed by cystatin C. *Cardiovasc Ther.* 2013 Jun;31(3):168-73. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00309.x. Epub 2011 Dec 29. PubMed PMID: 22212518.

Amat N, Amat R, Abdureyim S, Hoxur P, Osman Z, Mamut D, Kijjoa A. Aqueous extract of *dioscorea opposita* thunb. normalizes the hypertension in 2K1C hypertensive rats. *BMC Complement Altern Med.* 2014 Jan 21;14:36. doi: 10.1186/1472-6882-14-36. PubMed PMID: 24447776. PubMed PMCID: PMC3904168

Andreucci M, Solomon R, Tasanarong A. Side effects of radiographic contrast media: pathogenesis, risk factors, and prevention. *Biomed Res Int.* 2014;2014:741018. doi: 10.1155/2014/741018. Epub 2014 May 11. PubMed PMID: 24895606; PubMed Central PMCID: PMC4034507

Atilgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, Erdemir F, Markoc F, Saylan O, Erkorkmaz U. The Effects of Trimetazidine and Sildenafil on Bilateral Cavernosal Nerve Injury Induced Oxidative Damage and Cavernosal Fibrosis in Rats. *ScientificWorldJournal.* 2014 Mar 18;2014:970363. doi: 10.1155/2014/970363. eCollection 2014. PubMed PMID: 24782681; PubMed Central PMCID: PMC3977563.

Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Fabbri A, Spera G, Fini M, Rosano GM. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2008 Jan;25(1):37-44. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02298.x. PubMed PMID: 18199130.

Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Fabbri A, Spera G, Fini M, Rosano GM. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2008 Jan;25(1):37-44.

Avontuur JA, Buijk SL, Bruining HA. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998 Oct;54(8):627-31. PubMed PMID: 9860150.

Bakris GL, Burnett JC Jr.. A role for calcium in radiocontrast-induced reductions in renal hemodynamics. *Kidney Int*. 1985 Feb;27(2):465-8. PubMed PMID: 2581011.

Balarini CM, Leal MA, Gomes IB, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med*. 2013 Jan 5;11:3. doi: 10.1186/1479-5876-11-3. PubMed PMID: 23289368. PubMed PMCID: PMC3551739

Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev*. 1999 Nov;31(4):971-97. PubMed PMID: 10575556.

Beavo JA. Nucleotide Phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*. 1995 Oct;75(4):725-48. PubMed PMID: 7480160.

Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int*. Volume 2014 (2014), Article ID 598271, 14 pages.

Bivalacqua TJ, Sussan TE, Gebaska MA, Strong TD, Berkowitz DE, Biswal S, Burnett AL, Champion HC. Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of secondhand smoke induced erectile dysfunction. *J Urol*. 2009 Feb;181(2):899-906. doi: 10.1016/j.juro.2008.10.062. Epub 2008 Dec 17. PubMed PMID: 19095260. PubMed Central PMCID: PMC4124638.

Bourin M, Jolliet P, Ballereau F. An overview of the clinical pharmacokinetics of x-ray contrast media. *Clin Pharmacokinet*. 1997 Mar;32(3):180-93. PubMed PMID: 9084958.

Bremer YA, Salloum F, Ockaili R, Chou E, Moskowitz WB, Kukreja Rc. Sildenafil citrate (viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits. *Pediatr Res*. 2005 Jan;57(1):22-7. Epub 2004 Nov 5. PubMed PMID: 15531735.

Briguori C, Visconti G, Rivera NV, Focaccio A, Golia B, Giannone R, et al. Cystatin C and contrast-induced acute kidney injury. *Circulation*. 2010 May 18;121(19):2117-22. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.919639. Epub 2010 May 3. PubMed PMID: 20439784

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. 1976 Dec;12(6):897-913. PubMed PMID: 1005741.

Cadirici E, Halici Z, Odabasoglu F, Albayrak A, Karakus E, Unal D, Atalay F, Ferah I, Unal B. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. *Clin Exp Immunol*. 2011 Dec;166(3):374-84. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04483.x. PubMed PMID: 22059996; PubMed Central PMCID: PMC3232386.

Caiazza A, Russo L, Sabbatini M, Russo D. Hemodynamic and tubular changes induced by contrast media. *Biomed Res Int*. 2014;2014:578974. doi: 10.1155/2014/578974. Epub 2014 Feb 11. PubMed PMID: 24678510; PubMed Central PMCID: PMC3941595

Campagnaro BP, Tonini CL, Doche LM, Nogueira BV, Vasquez EC, Meyrelles SS. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA Cell Biol*. 2013 Aug;32(8):458-66. doi: 10.1089/dna.2013.2065. Epub 2013 Jun 20. PubMed PMID: 23786322; PubMed Central PMCID: PMC3725873.

Campagnaro BP. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células hematopoiéticas e endoteliais de camundongos. Tese de Doutorado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2012.

Cantley LG, Spokes K, Clark B, McMahon EG, Carter J, Epstein FH. Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction. *Kidney Int*. 1993 Dec;44(6):1217-23. PubMed PMID: 8301922.

Carlos RD (2001). Patofisiologia de sistemas: Renal. São Paulo. Robe editorial.

Charriaut-Marlangue C, Nguyen T, Bonnin P, Duy Ap, Leger PI, Csaba Z, Pansiot J, Bourgeois T, Renolleau S, Baud O. Sildenafil mediates blood-flow redistribution and neuroprotection after neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke*. 2014

Mar;45(3):850-6. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.003606. Epub 2014 Jan 28. PubMed PMID: 24473179.

Cohen ML. Radionuclide clearance techniques. In: Freeman LM; Blaufox MD (Eds). Radionuclide studies of the genitourinary system. 1975. New York: Grune & Stratton. p.23-38.

Cunha Ma, Schor N. Effects of gentamicin, lipopolysaccharide, and contrast media on immortalized proximal tubular cells. Ren Fail. 2002 Nov;24(6):687-90. PubMed PMID: 12472192.

Dawson P, Harrison Mjg, Weisblatt E. Effect of contrast media on red cell filtrability and morphology. Br J Radiol. 1983 Oct;56(670):707-10. PubMed PMID: 6616134.

Delfino VDA, Mocelin AJ. Efeitos renais adversos dos anti- inflamatórios não hormonais: uma abordagem prática. Jornal Brasileiro de Nefrologia, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 199-205, 1995.

Detrenis S, Meschi M, Musini S, Savazzi G. Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art. Nephrol Dial Transplant. 2005 Aug;20(8):1542-50. PubMed PMID: 16033768.

Dias AT, Cintra AS, Frossard JC, Palomino Z, Casarini DE, Gomes I, Balarini CM, Gava AL, Campagnaro BP, Pereira T, Meyrelles SS, Vasquez EC. Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. J Transl Med. 2014 Sep 16;12:250. doi: 10.1186/s12967-014-0250-x. PubMed PMID: 25223948.

Dobrota M, Powell CJ, Holtz E, Wallin A, Vik H. Biochemical and morphological effects of contrast media on the kidney. Acta Radiol Suppl. 1995;399:196-203. PubMed PMID: 8610515

Dogan A, Bekir SP, Nihat U, Fikret E, Fatma M, Oguzhan S, Unal E. The Effects of Trimetazidine and Sildenafil on Bilateral Cavernosal Nerve Injury Induced Oxidative Damage and Cavernosal Fibrosis in Rats. 2014.The Scientific World Journal. ID 970363.

Dousa Tp. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. Kidney Int. 1999 Jan;55(1):29-62. PubMed PMID: 9893113.

El-Sayed MI, Amin HA. Mechanism of endothelial cyto-protective and thrombo-resistance effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil in male rabbit. Arch Med Sci. 2015 Mar 16;11(1):190-8. doi: 10.5114/aoms.2013.33616. Epub 2013 Mar 5. PubMed PMID: 25861307; PubMed Central PMCID: PMC4379354

Erley CM, Heyne N, Burgert K, Langanke J, Risler T, Osswald H (1997). Prevention of radio-contrast-induced nephropathy by adenosine antagonists in rats with chronic nitric oxide deficiency. J Am Soc Nephrol. 1997 Jul;8(7):1125-32. PubMed PMID: 9219162.

Eyre J, Ioannou K, Grubb BD, Saleem MA, Mathieson PW, Brunskill NJ, Christensen EI, Topham PS. Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes. Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Feb;292(2):F674-81. Epub 2006 Oct 10. PubMed PMID: 17032937.

Fábio LS; Costa, Josete CB, José Carlos CL. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. 2007. J. Bras. Patol. Med. Lab., vol.43, n.5, pp. 329-337. ISSN 1676-2444.

Fernando L, Julio P (1999). Atlas of Diseases of the kidney. Acute Renal: Causes and Prognosis.VOL 1.

FLICKR. Disponível em
<<https://www.flickr.com/photos/31134150@N07/2917664577/>>. Acesso em: 20 março 2015.

Franchini KG, Mattson DL, Cowley AW JR (1997). Vasopressin modulation of medullary blood flow and pressure-natriuresis-diuresis in the decerebrated rat. Am J Physiol. 1997 May;272(5 Pt 2):R1472-9. PubMed PMID: 9176339.

Franke RP, Fuhrmann R, Hiebl B, Jung F. Influence of radiographic contrast media on the secretion of vasoactive substances by primary human umbilical venous endothelial cells (HUVEC): prospective, controlled, in vitro comparative study. Clin Hemorheol Microcirc. 2009;43(1-2):181-7. doi: 10.3233/CH-2009-1233. PubMed PMID: 19713613.

Ftough S, Lewington A. Prevention, detection and management of acute kidney injury: concise guideline. Clin Med. 2014 Feb;14(1):61-5. doi: 10.7861/clinmedicine.14-1-61. PubMed PMID: 24532748.

Fu Y, Zhang R, Lu D, Liu H, Chandrashekar K, Juncos LA, and Liu R. NOX2 is the primary source of angiotensin II- induced superoxide in the macula densa. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Mar;298(3):R707-12. doi: 10.1152/ajpregu.00762.2009. Epub 2010 Jan 6. PubMed PMID: 20053956; PubMed Central PMCID: PMC2838666.

Fuehr, J.; Kaczmarczyk, J.; Kruttgen, CD. A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics. *Klin Wochenschr*. 1955 Aug 1;33(29-30):729-30. PubMed PMID: 13264515.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6. PubMed PMID: 6253831.

Gasnov F, Aytac B, Vuruskan H. The effects of tadalafil on renal ischemia reperfusion injury: an experimental study. *Bosn J Basic Med Sci*. 2011 Aug;11(3):158-62. PubMed PMID: 21875417; PubMed Central PMCID: PMC4362549

Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2183-94. PubMed PMID: 15371333; PubMed Central PMCID: PMC517513.

Gleeson TG, Bulugahapitiya S. Contrast-induced nephropathy. *AJR Am J Roentgenol*. 2004 Dec;183(6):1673-89. PubMed PMID: 15547209.

Glossmann H, Petrischor H, Bartsch G. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil. *Experimental Gerontology*. 1999;34(3):305–318. PubMed PMID: 10433386.

Gospos C, Freudenberg N, Staubesand J, Mathias K, Papacharlampos X. The effect of contrast media on the aortic endothelium of rats. *Radiology*, vol. 147, no. 3, pp. 685–688. PubMed PMID: 6844605.

Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. *J Clin Pharmacol*. 45: 987-1003. PubMed PMID: 16100293.

Guyton AC, Hall JE (2006). *Tratado de Fisiologia Médica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Pp. 307-326.

Güzeloğlu M, Yalçınkaya F, Atmaca S, Bağrıyanık A, Oktar S, Yüksel O, et al. The beneficial effects of tadalafil on renal ischemia- reperfusion injury in rats. *Urol Int* 2011; 86: 197-203. PubMed PMID: 21160160.

Halcox JPJ, Nour KRA, Zalos G, Mincemoyer R, Waclawiw MA, Rivera CE, Willie G, Ellahham S, Quyyumi AA. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *Journal of the American College of cardiology*. 2002;40(7):1232–1240. PubMed PMID: 12383570.

Hardiek K, Katholi RE, Ramkumar V, Deitrick C. Proximal tubule cell response to radiographic contrast media. *The American Journal of Physiology: Renal Physiology*, vol. 280, no. 1, pp. F61–F70. PubMed PMID: 11133515.

Heeneman S, Smits JF, Leenders PJ, et al. Effects of angiotensin II on cardiac function and peripheral vascular structure during compensated heart failure in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(10):1985-1994. PubMed PMID: 9351363.

Heinrich MC, Kuhlmann MK, Grgic A, Heckmann M, Kramann B, Uder M. Cytotoxic effects of ionic high- osmolar, nonionic monomeric, and nonionic iso-osmolar dimeric iodinated contrast media on renal tubular cells in vitro. *Radiology*, vol. 235, no. 3, pp. 843–849. PubMed PMID: 15845795.

Heyman SN, Clark BA, Kaiser N, Spokes K, Rosen S, Brezis M, Epstein FH. Radiocontrast agents induce endothelin release in vivo and in vitro. 1992. *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 1, pp. 58–65. PubMed PMID: 1391709.

Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée JM, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. 2010. *Investigative Radiology*, vol. 45, no. 4, pp. 188–195. PubMed PMID: 20195159.

Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. 2008. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 1, pp. 288–296. PubMed PMID: 18057308.

Hopps E, Noto D, Caimi G, Aversa MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010 Jan;20(1):72-7. doi: 10.1016/j.numecd.2009.06.002. Epub 2009 Sep 10. PubMed PMID: 19747805.

Hosgood SA, Bagul A, Kaushik M, Rimoldi J, Gadepalli RS, Nicholson ML. Application of nitric oxide and carbon monoxide in a model of renal preservation. *Br J Surg.* 95: 1060–7. PubMed PMID: 18618865.

Hui-Ling Wang, Nan-Mei Liu, Rui Li. Role of adult resident renal progenitor cells in tubular repair after acute kidney injury. *Journal of integrative medicine,* 12(6):469-475. PubMed PMID: 25412664.

Kai S, John AK. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney International* 81, 819–825. PubMed PMID: 21975865.

Karl T, Jorma W (2005). How Does the Kidney Filter Plasma?. *Physiology* 20(2)96-101

Katholi RE, Taylor GJ, Mccann WP. Nephrotoxicity from contrast media: Attenuation with theophylline. 1995. *Radiology.* 195:17.

Katzberg R, Barret B. Risk of contrast-induced nephropathy with the intravenous administration of iodinated contrast media. 2007. *Radiology.* 243:622-8.

Katzberg RW, Schulman G, Meggs LG, Caldicott WJ, Damiano MM, Hollenberg NK. Mechanism of the renal response to contrast medium in dogs: decrease in renal function due to hipertonicity. *Invest Radiol.* 1983 Jan-Feb;18(1):74-80. PubMed PMID: 6832934.

Kedrah AE, Ari E, Alahdab Y, Gul CB, Macunluoglu B, Atakan A, Asicioglu E, Cakalagaoglu F, Koc M. Effect of the direct renin inhibitor aliskiren in the prevention of experimental contrast-induced nephropathy in the rat. *Kidney Blood Press Res.* 2012;35(6):425-30. doi: 10.1159/000336104. Epub 2012 Jun 6. PubMed PMID: 22677784

Kerem Ö, Köksal C, Fatih K, Erkan S, Fatih A, Metin K, Ataç Ç, Hasan K, R. Doğan K, Orhan Ö. The protective effect of single dose tadalafil in contrast-induced nephropathy: an experimental study. 2015. *Anatol J Cardiol.* 15(4):306-10.

Knutsen E. Renal Clearance Studies on the horse. I. Inulin, endogenous creatinine and ureia. 1959. *Acta Vet. Scand.* v.1, p.56-66.

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

10.3265/Nefrologia.pre2012.Nov.11736. PubMed PMID: 23364634.

Koulouridis I, Price LL, Madias NE, Jaber BL. Hospital-Acquired Acute Kidney Injury and Hospital Readmission: A Cohort Study. 2014. *American Journal of Kidney Diseases*, S0272-6386.

Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, Nishizawa Y. Molecular Pathways of Cyclic Nucleotide-Induced Inhibition of Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;186(1):1–10.

Lai EY, Solis G, Luo Z, Carlstrom M, Sandberg K, Holland S, Wellstein A, Welch WJ, and Wilcox CS. Is required for afferent arteriolar contractile responses to angiotensin II and perfusion pressure in mice. *Hypertension*. 2012 Feb;59(2):415-20. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.184291. Epub 2011 Dec 19. PubMed PMID: 22184329; PubMed Central PMCID: PMC3266435.

Lai EY, Wellstein A, Welch WJ, and Wilcox CS. Superoxide modulates myogenic contractions of mouse afferent arterioles. *Hypertension*. 2011 Oct;58(4):650-6. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.170472. Epub 2011 Aug 22. PubMed PMID: 21859962; PubMed Central PMCID: PMC3190586.

Larson TS, Hudson K, Mertz JI, Romero JC, Knox FG. Renal vasoconstrictive response to contrast medium. The role of sodium balance and the renin-angiotensin system. *J Lab Clin Med*. 1983 Mar;101(3):385-91. PubMed PMID: 6338138

Lauver DA, Carey EG1, Bergin IL2, Lucchesi BR1, Gurm HS3. Sildenafil citrate for prophylaxis of nephropathy in an animal model of contrast-induced acute kidney injury. *PLoS One*. 2014 Nov 26;9(11):e113598. doi: 10.1371/journal.pone.0113598. eCollection 2014. PubMed PMID: 25426714; PubMed Central PMCID: PMC4245209.

Lee KH, Kwon SJ, Woo JS, Lee GJ, Lee SR, Jang HH, Kim HS, Kim JW, Park HK, Cho KS, Kim W. Effects of sildenafil on nanostructural and nanomechanical changes in mitochondria in an ischaemia-reperfusion rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Oct;41(10):763-8. doi: 10.1111/1440-1681.12290. PubMed PMID: 25115773.

Leoni LA, Leite GS, Wichi RB, Rodrigues B. Sildenafil: two decades of benefits or risks? *Aging Male*. 2013 Sep;16(3):85-91. doi: 10.3109/13685538.2013.801952. Epub 2013 Jun 12. PubMed PMID: 23758451.

Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, Romero JC: Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension* 37: 541–546, 2001.

Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, et. al.. Guideline for Percutaneous Coronary Intervention. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. 2011. *J Am Coll Cardiol*. 58:e44–122.

Li PK, Burdmann EA, Mehta RL. World Kidney Day Steering Committee. 2013. Acute Kidney Injury: global health alert, 83(3): 372–376.

Liu R, Ren Y, Garvin JL, and Carretero OA. Superoxide enhances tubuloglomerular feedback by constricting the afferent arteriole. *Kidney Int* 66: 268–274, 2004.

Lledo-Garcia E, Rodriguez-Martinez D, Cabello-Benavente R, Moncada-Iribarren I, Tejedor-Jorge A, Dulin E, Hernandez-Fernandez C, Del Canizo-Lopez JF. Sildenafil improves immediate posttransplant parameters in warm-ischemic kidney transplants. *Transplant Proc*. 2007 Jun;39(5):1354-6. PubMed PMID: 17580138

Lledo-Garcia E, Subira-Rios D, Ogaya-Pinies G, Tejedor-Jorge A, Cañizo-Lopez JF, Hernandez-Fernandez C. Intravenous sildenafil as a preconditioning drug against hemodynamic consequences of warm ischemia-reperfusion on the kidney. *J Urol*. 2011 Jul;186(1):331-3. doi: 10.1016/j.juro.2011.03.036. Epub 2011 May 20. PubMed PMID: 21600605.

Magali A and Christopher S. W. Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 1;20(1):74-101. doi: 10.1089/ars.2013.5259. Epub 2013 Apr 30. PubMed PMID: 23472618; PubMed Central PMCID: PMC3880923.

Magali Araujo and Christopher S. Wilcox (2014). Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. *Antioxid Redox Signal*. 20(1): 74–101.

Malavaud B1, Rostaing L, Tran-Van T, Tack I, Ader JL. Transient renal effects of sildenafil in male kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2001 Oct 15;72(7):1331-3. PubMed PMID: 11602866.

Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TM, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis.* 2011 Nov 14;10:211.

Michele A, Teresa F, Antonio P, Massimo S, Ashour M. Acute Kidney Injury by Radiographic Contrast Media: Pathogenesis and Prevention. 2014. *BioMed Research International.* ID 362725

Michelin AF, Ferreira AAP, Bitar VG, Lopes LC. Toxicidade renal de inibidores seletivos da ciclooxigenase-2: celecoxib e rofecoxib. *Revista Científica de Medicina, Campinas*, v. 15, n. 4, p. 321-332, 2006.

Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, Abdollahi M. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 2005;140(2):251–255.

Montezano AC, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension-reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol*, v. 28, n. 3, p. 288-295, May, 2012.

Morcos SK, Thomsen HS, Webb JA. Contrast-media-induced nephrotoxicity: a consensus report. Contrast Media Safety Committee, European Society of Urogenital Radiology (ESUR). *Eur Radiol.* 1999;9(8):1602-13. PubMed PMID: 10525875.

Müller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 Mar;1(2):221-8. Epub 2005 Dec 22. PubMed PMID: 17699210.

Murphy SW, Barrett BJ, Parfrey PS (2000). Contrast nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 11, no. 1, pp. 177–182.

Myers SI, Wang L, Liu F, Bartula LL. Iodinated contrast induced renal vasoconstriction is due in part to the downregulation of renal cortical and medullary nitric oxide synthesis. *J Vasc Surg.* 2006 Aug;44(2):383-91. PubMed PMID: 16890873

Nallamotheu BK, Shojania KG, Saint S, Hofer TP, Humes HD, Moscucci M, Bates ER. Is acetylcysteine effective in preventing contrast-related nephropathy? A meta-analysis. 2014. *Am J Med.* (12):938-47.

Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol.* 1994

Sep;29(5):513-22. PubMed PMID: 7811335.

Nouri P, Gill P, Li M, Wilcox CS, and Welch WJ. p22phox in the macula densa regulates single nephron GFR during angiotensin II infusion in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1685–H1689, 2007

Nygren A. Contrast media and regional renal blood flow. A study of the effects of ionic and non-ionic monomeric and dimeric contrast media in the rat. 1992. *Acta Radiol Suppl.* 378 (Pt 3):123–135.

Olguín HJ, Reyes LC, Arce AR, Guzmán DC. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension Using Extemporaneous Formulation of Sildenafil in Mexican Children. 2015. *Pediatr Cardiol.* PMID: 25612785.

Özbek K, Ceyhan K, Koç F, Söğüt E, Altunkaş F, Karayakalı M, Çelik A, Kadı H, Köseoğlu RD, Önalın O. The protective effect of single dose tadalafil in contrast-induced nephropathy: an experimental study. *Anatol J Cardiol.* 2015 Apr;15(4):306-10. doi: 10.5152/akd.2014.5380. Epub 2014 Apr 16. PubMed PMID: 25880289.

Öztürk H, Aldemir M, Büyükbayram H, Dokucu A, Otçu S. The effects of the nitric oxide donor molsidomine prevent in warm ischemia-reperfusion injury of the rat renal – A functional and histopathological study. 2001. *Int Urol Nephrol.* 32: 601–7.

Pannu N, Wiebe N, Tonelli M. Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy. 2006. *JAMA.* 295(23):2765-79.

Patil CS, Singh VP, Kulkarni SK. Modulatory effect of sildenafil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacol Rep.* 2006 May-Jun;58(3):373-80

Peer A, Averbukh Z, Berman S, Modai D, Averbukh M, Weissgarten J. Contrast media augmented apoptosis of cultured renal mesangial, tubular, epithelial, endothelial, and hepatic cells. 2003. *Investigative Radiology*, vol. 38, no. 3, pp. 177–182.

Person Pb, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. 2005. *Kidney Int.* 68:14-22.

Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int.* 2005 Jul;68(1):14-22. PubMed PMID: 15954892

Pisani A, Riccio E, Andreucci M. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. 2013. *BioMed Research International*. Article ID 868321, 6 pages.

Pisani A, Sabbatini M, Riccio E, Rossano R, Andreucci M, Capasso C, De Luca V, Carginale V, Bizzarri M, Borrelli A, Schiattarella A, Santangelo M, Mancini A. Effect of a recombinant manganese superoxide dismutase on prevention of contrast-induced acute kidney injury. *Clin Exp Nephrol*. 2014 Jun;18(3):424-31. doi: 10.1007/s10157-013-0828-2. Epub 2013 Jun 27. PubMed PMID: 23807430.

Pontus BP, Peter H, Per L (2005). Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney International*, Vol. 68, pp. 14–22.

Pucelikova T, Dangas G, Mehran R. Contrast-induced nephropathy. 2008. *Catheter Cardiovasc Interv*.;71(1):62-72.

Raja SG, Nayak SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2004;78(4):1496–1506.

Reed JR, Williams RH, Luke RG. The renal hemodynamic response to diatrizoate in normal and diabetic rats. *Invest Radiol*. 1983 Nov-Dec;18(6):536-40. PubMed PMID: 6417044

Ricardo OS, Beatriz M, Rui S, Vítor R, Pedro P, Manuel A, João A, Carlos P. Contrast-induced nephropathy. *Acta Med Port*. 2011 Sep-Oct;24(5):809-20. Epub 2011 Dec 29. PubMed PMID: 22525634

Rodrigues BP, Campagnaro BP, Balarini CM, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2013 Aug 28;12:128.

Roseguini BT, Hirai DM, Alencar MC, Ramos RP, Silva BM, Wolosker N, Neder JA, Nery LE. Sildenafil improves skeletal muscle oxygenation during exercise in men with intermittent claudication. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Aug 15;307(4):R396-404. doi: 10.1152/ajpregu.00183.2014. Epub 2014 Jun 18. PubMed PMID: 24944249

Rudnick M, Tumlin J. Pathogenesis, clinical features, and diagnosis of contrast-induced nephropathy. 2012. Disponível em: http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=renal/9576&selectedTitle=1%7E40&source=search_result#. Accessed August 25, 2014.

Rudnick MR, Tumlin JA. Prevention of radiocontrast media- induced acute kidney injury (acute renal failure). 2009. UpToDate version 17.1.

Sabbatini M, Santillo M, Pisani A et. al. Inhibition of Ras/ERK1/2 signaling protects against postischemic renal injury. 2006. American Journal of Physiology: Renal Physiology, vol. 290, no. 6, pp. F1408–F1415.

Salloum FN, Abbate A, Das A, Houser JE, Mudrick CA, Qureshi IZ, et al. Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice. 2008. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 294:H1398–H1406.

Sayer G, Bhat G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol Clin.* 2014 Feb;32(1):21-32, vii.

Schuster VL, Seldin DW. Renal clearance. In: Seldin DW, Giebisch G. (Eds). *The kidney, physiology and pathophysiology.* 1985. New York: Raven Press. p.365–395.

Schwartz BG, Levine LA, Comstock G, Stecher VJ, Kloner RA. Cardiac uses of phosphodiesterase-5 inhibitors. 2012. *J Am Coll Cardiol.* 59:9–15.

Seeley R, Stephens T, Tate P. Cardiovascular system: blood. 1989. *Anatomy and Physiology.* chap 19.

Sendeski M, Patzak A, Pallone TL, Cao C, Persson AE, Persson PB. Iodixanol, constriction of medullary descending vasa recta, and risk for contrast medium-induced nephropathy. 2009. *Radiology,* vol. 251, no. 3, pp. 697–704.

Sendeski M, Patzak A, Pallone TL, Cao C, Persson AE, Persson PB. Iodixanol, constriction of medullary descending vasa recta, and risk for contrast medium-induced nephropathy. *Radiology.* 2009 Jun;251(3):697-704. doi: 10.1148/radiol.2513081732. Epub 2009 Apr 14. PubMed PMID: 19366904; PubMed Central PMCID: PMC2687533.

Sendeski MM (2011). Pathophysiology of renal tissue damage by iodinated contrast media. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,* vol. 38, no. 5, pp. 292–299.

Shannon JA, Smith HW. The excretion of inulin, xylose and urea by normal and phlorizinized man. 1935. *J. Clin. Invest.* v.14, p.93-96.

Shrivastava K, Chertoff M, Llovera G, Recasens M, Acarin L. Short and long-term analysis and comparison of neurodegeneration and inflammatory cell response in the ipsilateral and contralateral hemisphere of the neonatal mouse brain after hypoxia/ischemia. 2012. *Neurol Res Int*. 2012:781512.

Slide Player. Disponível em < <http://slideplayer.com.br/slide/1670663/> >. Acesso em: 20 março 2015.

Smith HW, Finkelstein N, Aliminosa L, Crawford B, Graber M. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. 1945. *Journal Clinical Investigation*, v.24, p.388-404.

Stacul F, Adam A, Becker Cr, Davidson C, Lameire N, Mccullough PA, et al. Strategies to reduce the risk of contrast-induced nephropathy. 2006. *Am J Cardiol*. 98(6A):59K-77K.

Stacul F, Van Der Molen AJ, Reimer P, Webb JA, Thomsen HS, et al. Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines. 2011. *Eur Radiol* 21:2527–2541.

Stegbauer J. et al. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. *PLoS One*, v. 8, n.11, Jan., 2013.

Stephen PW. Contrast-Induced Nephropathy in Critical Care. 2012. *Critical Care Nurse*. Vol. 32 Issue 6, p 15.

Taylor & Francis (2007) .Radiocontrast nephropathy: renal protection. *SAJAA* 13(6): 26-31.

Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med*. 2000 Jul 20;343(3):180-4. PubMed PMID: 10900277.

Terawaki H1, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int*. 2004 Nov;66(5):1988-93. PubMed PMID: 15496170.

Thomsen HS, Morcos SK, Barret BJ. Contrast-Induced Nephropathy. The Wheel Has Turned 360 Degrees. 2008. *Acta Radiol*. 49:646-657

Touyz RM: Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004, 44:248–252.

Tumkur SM, Vu AT, Li LP, Pierchala L, Prasad PV. Evaluation of intra-renal oxygenation during water diuresis: a time-resolved study using BOLD MRI. 2006. *Kidney Int.* 70:139–143.

Tumlin J, Stacul F, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, McCullough PA; CIN Consensus Working Panel. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol.* 2006 Sep 18;98(6A):14K-20K. Epub 2006 Feb 17. PubMed PMID: 16949376.

Ukaigwe A, Karmacharya P, Mahmood M, Pathak R, Aryal Mr, Jalota L, Donato AA. Meta-analysis on efficacy of statins for prevention of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing coronary angiography. 2014. *The American Journal of Cardiology*, 114(9):1295-302.

Unis A. Açai berry extract attenuates glycerol-induced acute renal failure in rats. 2014. *Renal Failure*, 19:1-8.

Vallon V, Mühlbauer B, Osswald H . Adenosine and kidney function. 2006. *Physiol Rev.* 86(3):901-940.

Vallotton MB et. al. Interaction of vasopressin and angiotensin II in stimulation of prostacyclin synthesis in vascular smooth muscle cells. 1989. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v. 257, n.5, p. 617-624, Nov.

Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003 Jan;63(1):179-85. PubMed PMID: 12472781.

Veriander, J. W. Fisiologia renal. In: CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de fisiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 409-442.

Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. 1999. *Xenobiotica.* 29: 297-310.

Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae

and aortic rings in vitro. 1999. *Am J Cardiol.* 83:3C–12C.

Wang A, Holcslaw T, Bashore Tm, Freed Mi, Miller D, Rudnick Mr, Szerlip H, Thames Md, Davidson Cj, Shusterman N, Schwab Sj. Exacerbation of radiocontrast nephrotoxicity by endothelin receptor antagonism. 2000. *Kidney international.* (4):1675-80.

Weisberg LS, Kurnik PB, Kurnik BR. Radiocontrast-induced nephropathy in humans. Role of renal vasoconstriction. 1992. *Kidney international.*;41:1408.

Weisbord SD. Iodinated contrast media and the kidney. 2008. *Rev Cardiovasc Med.* 9(suppl 1):S14-S23.

Welch WJ and Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int* 59: 1257–1263, 2001.

Whitaker RM, Wills LP, Stallons LJ, Schnellmann RG. cGMP-selective phosphodiesterase inhibitors stimulate mitochondrial biogenesis and promote recovery from acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013 Dec;347(3):626-34. doi: 10.1124/jpet.113.208017. Epub 2013 Sep 16. PubMed PMID: 24042162; PubMed Central PMCID: PMC3836317.

Wohaieb SA, Godin DV. Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats. *Diabetes.* 1987 Feb;36(2):169-73. PubMed PMID: 3803731.

Wong GTC, Irwin MG . Contrast-induced nephropathy. 2007. *Br J Anaesth.* 99(4):474-483.

Wong PC, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Int J Cardiol.* 2012 Jul 12;158(2):186-92. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.06.115. Epub 2011 Jul 23. PubMed PMID: 21784541.

Woolfson RG, Neild GH. The true clinical significance of renography in nephro-urology. 1997. *Eur. J. Nucl. Med.* v.24, p.557-570.

Zhang J, Guo J, Zhao X, Chen Z, Wang G, Liu A, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in APP/PS1 transgenic mice. 2013. *Behav Brain Res.*; 250:230–237.

Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A,

Mirrakhimov MM, Aldashev A, Wilkins MR. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001 Jul 24;104(4):424-8. PubMed PMID: 11468204.