

RUBENS MARONA DE OLIVEIRA

**EFEITO DE RADIOCONTRASTES SOBRE
DETERMINADOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE
MEMBRANA CELULAR DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Medicina (Área de concentração: Nefrologia).

PORTO ALEGRE

2004

RUBENS MARONA DE OLIVEIRA

**EFEITO DE RADIOCONTRASTES SOBRE
DETERMINADOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE
MEMBRANA CELULAR DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Medicina (Área de concentração: Nefrologia)

Orientadores:

Prof. Dr. Fernando Custódio Ferverza

Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Dra. Bartira E. Pinheiro da Costa

PORTO ALEGRE

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Rubens Marona de

Efeito de radiocontrastes sobre determinados sistemas de transporte de membrana celular em eritrócitos humanos

Rubens Marona de Oliveira – orient. Fernando Custódio Ferverza; Carlos Eduardo Poli de Figueiredo; Bartira Pinheiro da Costa – Porto Alegre: PUCRS, 2004. 121 p.: il. tab.

Tese (Doutorado) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de concentração: Nefrologia.

Título em inglês: Effect of radiocontrast on selected membrane transport systems in human erythrocytes.

1. Insuficiência renal aguda; 2. Meios de contraste; 3. Toxicidade de drogas; 4. Proteínas de membrana transportadoras; 5. Membrana eritrocítica; 6. ATPase conversora de Na(+)-K(+); 7. Arginina; 8. Colina.

Aos meus pais,

À Angela, e aos meus filhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Fernando Custódio Ferverza, pesquisador que incentivou, inicialmente, a realização deste trabalho, e participou intensamente, mesmo à distância, da elaboração deste estudo.

Ao Prof. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, meu Co-orientador e amigo, que distingue perseverança de teimosia, e que, pela sua capacidade de orientar e acompanhar, impulsionou decisivamente a conclusão do projeto.

À Dra. Bartira Pinheiro da Costa, pela participação constante, desde os primórdios, nos ensaios realizados em nosso laboratório de pesquisas, e pela disposição e equilíbrio nas sugestões para a montagem deste texto.

Ao Prof. Mário Bernardes Wagner, epidemiologista que, com segurança e paciência, foi inestimável na condução do estudo estatístico.

Ao Prof. Domingos d'Ávila, revisor atento, pelas críticas talentosas ao texto do trabalho.

A todos os colegas que de algum modo estimularam a realização deste trabalho, e, em especial, à Dra Adriana Comparsi, que participou da seleção de novos casos, na parte final do trabalho.

Ao Gabriel, meu filho, que pacientemente deixou sua rotina de publicitário para auxiliar na montagem das figuras da publicação anexa à tese, e das ilustrações e gráficos que fazem parte da apresentação oral.

***Tudo o que sonho ou passo,
o que me falha ou finda,
É como que um terraço
sobre outra coisa ainda.
Essa coisa é que é linda.***

FERNANDO PESSOA, Isto (Poesia),

"*Presença*", Coimbra n.º 38, p. 7, Abr. 1933.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Nefropatia induzida por contraste.....	2
1.1.1 Conceito.....	2
1.1.2 Fatores de risco.....	3
1.1.3 Histórico sobre o uso de radiocontrastes.....	5
1.1.4 Farmacologia dos radiocontrastes.....	5
1.1.5 Estrutura química dos radiocontrastes.....	6
1.1.6 Classificação dos radiocontrastes.....	6
1.1.7 Patogenia da nefropatia induzida por radiocontrastes.....	8
1.2 A membrana celular.....	10
1.2.1 Conceito.....	10
1.2.2 Transporte através da membrana celular.....	11

1.2.3 Alterações nos sistemas de transporte da membrana celular na uremia...	13
1.2.4 Efeitos dos radiocontrastes sobre os sistemas de transporte.....	15
1.2.5 A membrana eritrocitária como modelo de estudo de transporte de membrana.....	21
1.2.6 Ação dos radiocontrastes sobre os eritrócitos.....	23
1.3 Justificativa deste estudo.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Delineamento.....	28
3.2 Amostra estudada.....	28
3.2.1 Critérios de Seleção.....	28
3.3 Coleta e processamento dos eritrócitos.....	29
3.4 Ensaio sobre a atividade da bomba de Na ⁺ /K ⁺	29
3.5 Verificação do número de bombas/eritrócito.....	31
3.6 Estudos sobre o transporte de L-arginina e de colina.....	33
3.7 Análise estatística.....	35
3.8 Estrutura da tese.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Efeito dos radiocontrastes sobre a atividade da bomba Na ⁺ /K ⁺	36
4.2 Atividade da bomba de Na ⁺ /K ⁺ em pacientes submetidos a cateterismo cardíaco.....	37
4.3 Determinação do número de bombas de Na ⁺ /K ⁺ /eritrócito.....	37

4.4	Captação de L-arginina em eritrócitos expostos a concentrações crescentes de Hypaque-M 76®.....	38
4.5	Captação de L-arginina em solução com 14 µmol/L de Hypaque-M 76®, em tempo de exposição crescente.....	39
4.6	Captação de colina em eritrócitos expostos a concentrações crescentes de Hypaque-M 76®.....	40
4.7	Captação de colina em solução com 14 µmol/L de Hypaque-M 76®, em tempo de exposição crescente.....	41
5	DISCUSSÃO.....	43
5.1	Comentários sobre os estudos efetuados nesta tese.....	53
5.1.1	Análise da atividade da bomba de Na ⁺ /K ⁺	53
5.1.2	Estudo do número de bombas de Na ⁺ /K ⁺ em atividade.....	57
5.1.3	Captação de L-arginina e colina em presença de radiocontrastes.....	58
5.1.4	Seletividade do efeito dos radiocontrastes.....	60
6	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	ANEXOS.....	80
	Anexo 1 – Texto encaminhado para publicação.....	80
	Anexo 2 – Termos de consentimento informado.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito dos radiocontrastes sobre a atividade da bomba Na^+/K^+ 37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Influxo eritrocitário de L-arginina com 15 minutos de exposição a concentrações crescentes de Hypaque-M 76®.....	41
Figura 2 - Influxo de L-arginina em solução com 14 µmol/L de Hypaque-M 76® com tempo de exposição crescente.	42
Figura 3 - Influxo eritrocitário de colina com 15 minutos de exposição a concentrações crescentes de Hypaque-M 76®.....	43
Figura 4 - Influxo de colina em solução com 14 µmol/L de Hypaque-M 76®, com tempo de exposição crescente.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AMP cíclico	adenosina monofostato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
bomba de Na⁺/K⁺	bomba de sódio e potássio
CD	composto de diatrizoatos
DM	diatrizoato de meglumina
DS	diatrizoato de sódio
IRA	insuficiência renal aguda
KCl	cloreto de potássio
kg	quilograma
mEq/L	miliequivalentes por litro
mg/dL	miligrama por decilitro
mL	mililitro
mL/kg	mililitro por quilograma
mM	milimolar
mmol/L	milimol por litro
mmol/L cel/h	milimol por litro de célula por hora
μmol/L cel/h	micromol por litro de célula por hora
MOPS	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico
mOsm/L	miliosmóis por litro
μL	microlitro
μmol/L	micromol por litro
NaCl	cloreto de sódio
nM	nanomolar
ON	óxido nítrico
ONS	óxido nítrico sintase
p/V	peso/volume
pmol/g	picomol/grama
Rb⁺	rubídio
rpm	rotações por minuto
vs.	versus

RESUMO

Perda de função renal é reconhecidamente uma das complicações secundárias ao uso intravascular de radiocontrastes. A membrana celular e os sistemas de transporte são possíveis alvos para a toxicidade destas substâncias. O objetivo do presente estudo foi examinar os efeitos de diatrizoato de sódio (DS), diatrizoato meglumina (DM), um composto de diatrizoatos (CD), e Hypaque-M 76[®] sobre sistemas específicos de transporte de membrana celular, usando o eritrócito como modelo. A atividade da bomba de Na⁺/K⁺ foi determinada, o número de bombas de Na⁺/K⁺ foi verificado, e o transporte celular de L-arginina e colina avaliado em eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis e de pacientes que sofreram cateterismo cardíaco. O influxo de potássio foi 1,50±0,35, 1,32±0,37, 1,28±0,30, e 1,01±0,25 mmol/L cel/h nos grupos controle, DS, DM e CD, respectivamente (P=0,004; CD versus grupo controle). Exposição ao radiocontraste composto Hypaque-M 76[®] durante cateterismo cardíaco diminuiu a atividade de bomba de Na⁺/K⁺ (1,40±0,36 vs. 1,27±0,40 mmol/L cel/h; P=0,039). O número de bombas de Na⁺/K⁺ ativas em presença de DS foi diminuído (156±36 vs. 143±34 bombas/eritrócito; P=0,015). O transporte de membrana de L-arginina e colina permaneceu inalterado, exceto em concentrações extracelulares de radiocontrastes muito altas. Estes resultados sugerem que efeitos seletivos sobre a função dos sistemas de transporte de membrana analisados parecem participar

do quadro de citotoxicidade que acompanha a insuficiência renal aguda induzida pelos radiocontrastes.

DESCRITORES:

1. Insuficiência renal aguda; 2. Meios de contraste; 3. Toxicidade de drogas; 4. Proteínas de membrana transportadoras; 5. Membrana eritrocítica; 6. ATPase conversora de Na(+)-K(+); 7. Arginina; 8. Colina.

ABSTRACT

Loss of renal function is a recognized complication following the intravascular use of radiocontrast agents. The cell membrane transport systems are possible targets for radiocontrast toxicity. The aim of the present study was to examine the effects of diatrizoate sodium (DS), diatrizoate meglumine (DM), a diatrizoate compound (DC), and Hypaque-M 76[®] upon membrane transport functions, using the erythrocyte as model. Na⁺/K⁺ pump activity was determined, the number of Na⁺/K⁺ pumps was estimated, and the cell membrane transports of L-arginine and choline were evaluated in erythrocytes obtained from normal individuals and from patients undergoing cardiac catheterization. Potassium influx was 1.50±0.35, 1.32±0.37, 1.28±0.30, and 1.01±0.25 mmol/L cell/h in control, DS, DM and DC groups, respectively (P=0.004; DC against control group). Exposure to Hypaque-M 76[®] during cardiac catheterization diminished the activity of Na⁺/K⁺ pump (1.40±0.36 vs. 1.27±0.40 mmol/L cell/h; P=0.039). The number of Na⁺/K⁺ pumps in presence of DS was decreased (156±36 vs. 143±34 pumps/erythrocyte; P=0.015). L-arginine and choline membrane transports were unchanged, except at very high extracellular radiocontrast concentrations. Results suggest that a selective effect on erythrocytes membrane transport function seems to partake of the cytotoxic picture accompanying radiocontrast-induced acute renal failure.

Keywords: 1. Acute renal failure; 2. Contrast media; 3. Drug toxicity; 4. Membrane proteins; 5. Erythrocyte membrane; 6. Na(+)-K(+) exchanging ATPase; 7. Arginine; 8. Choline.

1 INTRODUÇÃO

Esta tese apresenta um estudo sobre o efeito da exposição a radiocontrastes de três sistemas de transporte da membrana eritrocitária: a bomba de Na^+/K^+ , o transporte do aminoácido L-arginina, precursor da síntese de óxido nítrico, e o sistema de transporte de colina.

A idéia inicial do estudo surgiu da observação de que alguns pacientes, após a exposição aos radiocontrastes, desenvolvem insuficiência renal aguda, com mecanismo ainda pouco conhecido, em que a nefrotoxicidade está incluída, havendo a sugestão de que defeitos do transporte de membrana celular poderiam estar envolvidos na patogênese (ZIEGLER et al., 1975). A possibilidade de que alterações em diferentes sistemas de transporte de membrana possam contribuir para a patogenia da nefropatia induzida por radiocontrastes ainda não foi estudada em toda a sua profundidade. Esta é uma área do conhecimento em que os estudos vêm crescendo em número e complexidade, mas costumam focar apenas um sistema de transporte específico, como os trabalhos recentes de Andrade et al., (1998); Campos et al., (1999) e Bino et al., (2000). Não foi encontrado nenhum estudo prévio analisando, simultaneamente, o efeito dos radiocontrastes sobre vários sistemas de transporte. É intenção desta tese testar a hipótese de que parte dos efeitos provocados pelos radiocontrastes possa estar relacionada com alterações da função da membrana celular, a partir do estudo de

processos de transporte selecionados, utilizando a membrana do eritrócito humano como modelo.

1.1 Nefropatia induzida por contraste

1.1.1 Conceito

Muitas definições da nefropatia induzida por radiocontrastes são encontradas na literatura, mas, usualmente, é conceituada como o declínio agudo na função renal, que ocorre após a administração intravascular de contraste, excluídas outras origens (BARRET, 1994). É habitualmente reversível, de gravidade variada, podendo ser irreversível nos portadores de insuficiência renal avançada (ABRAHAM e KEJLLSTRAND, 1989; DERAY e JACOBS, 1995).

Para fins de pesquisa, a nefropatia induzida pelos radiocontrastes pode ser definida como o aumento de mais de 25% no valor da creatinina sérica, acima do valor prévio ao exame (dentro de 72 horas do exame), se o valor da creatinina sérica prévio ao exame era menor que 1,5 mg/dL, ou o aumento de mais de 1,0 mg/dL se a creatinina anterior ao uso do radiocontraste era acima de 1,5 mg/dL. A escolha destes valores de creatinina para a definição permite que, virtualmente, todos os pacientes com nefropatia induzida por contraste significativa sejam identificados (RUBIN e COHAN, 1991; PORTER, 1993a).

Na apresentação típica, há aumento da creatinina plasmática entre 24 e 48 horas após a infusão do contraste. O pico da elevação ocorre em três a cinco dias, e o retorno ao valor basal entre sete a dez dias (SOLOMON, 1998). A insuficiência renal aguda é, usualmente, não-oligúrica, não havendo necessidade de diálise na maioria dos casos (MANSKE et al., 1990).

Contudo, outras causas de insuficiência renal aguda, entre as quais embolismo aterosclerótico, isquemia, e a associação com outras nefrotoxinas,

devem ser consideradas, em pacientes que têm perda de função renal após exames em que radiocontrastes foram utilizados. Isto tem importância particular se existe perda de função renal acentuada, em pacientes sem fatores de risco evidentes para a nefropatia induzida por radiocontrastes antes do exame (RUDNICK et al., 1994; BREZIS e CRONIN, 1997).

1.1.2 Fatores de risco

Análise multivariada de vários estudos prospectivos, com número adequado de pacientes, demonstrou que o grau de disfunção renal pré-exame, diabetes mellitus, desidratação e altas doses de contraste, aumentavam o risco de nefropatia induzida por radiocontrastes (BARRET, 1994). Entre os fatores de risco ainda se incluem hipovolemia, uso simultâneo de drogas potencialmente nefrotóxicas, como os antiinflamatórios não-esteróides, e os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (PALLER, 1989; BARRET, 1994; RUDNICK et al., 1995; THATTE e VAAMONDE, 1996). Mieloma múltiplo continua sendo citado como fator de risco de nefropatia induzida pelos radiocontrastes. Segundo Porter (1993b), foi relatado, em 1954, o primeiro caso documentado de insuficiência renal aguda oligúrica por radiocontrastes, em paciente com mieloma múltiplo. Apesar de permanecer citado como potencial fator de risco para nefropatia induzida por radiocontrastes, mieloma múltiplo não parece ser fator de risco isolado. McCarthy e Becker (1992), em amplo estudo retrospectivo, não demonstraram que os portadores de mieloma múltiplo tinham maior risco de nefrotoxicidade pelos radiocontrastes.

De todos os fatores de risco independentes, insuficiência renal preexistente parece ser o mais importante. Contudo, os portadores de nefropatia diabética com insuficiência renal possuem risco consideravelmente maior de

nefropatia induzida por radiocontrastes, em relação aos que possuem insuficiência renal preexistente de outra origem (PARFREY et al., 1989; RUDNICK et al., 1995).

O emprego de radiocontrastes é causa importante de insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados (NEUMAYER et al., 1989; HARRIS et al., 1991; TALIERCIO et al., 1991; HALL et al., 1992; DERAY e JACOBS, 1996b; LOUVEL et al., 1996; BREZIS e CRONIN, 1997; SOLOMON, 1998). A incidência de nefropatia induzida pelos radiocontrastes varia entre zero e 90%, na literatura internacional revisada, dependendo de uma série de variáveis, entre as quais estão: delineamento do estudo, critérios de definição de insuficiência renal aguda do ponto de vista clínico, presença de fatores predisponentes de modo simultâneo, e dose de contraste administrada (ABRAHAM e KEJLLSTRAND, 1989; FILLASTRE, 1989; HARRIS et al, 1991; HALL et al., 1992; CRONIN, 1993; GOLDFARB et al., 1993; OLSEN e SOLEZ, 1994; DERAY e JACOBS, 1995; CRONIN e HEINRICH, 1996; BURDMANN et al., 1996; LOUVEL et al., 1996; BREZIS e CRONIN, 1997). Solomon (1998) cita que a nefropatia induzida pelos radiocontrastes é responsável por 5 a 32% dos casos de IRA (insuficiência renal aguda) adquirida no hospital. No Brasil, a análise dos pacientes atendidos na década de 80, pelo Grupo de Insuficiência Renal Aguda do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, revelou que o contraste, isoladamente ou em associação com outras drogas, foi responsável por aproximadamente 9% de todos os casos de insuficiência renal aguda atendidos, e por 25% dos casos de IRA causada por agentes nefrotóxicos (BURDMANN et al., 1996). A observação de Ritchie et al. (1993), citada na publicação do *American College of Cardiology*, de que mais de um milhão de

cateterismos cardíacos são realizados anualmente nos EUA, indica que a população atingida é grande. Apenas neste tipo de exame, incidência de insuficiência renal aguda por radiocontrastes de 1% representaria 10.000 casos por ano. Além da morbidade associada, a nefrotoxicidade dos radiocontrastes continua sendo vinculada com aumento do risco de mortalidade cinco a seis vezes maior, mesmo quando ajustada a outros fatores de co-morbidade. Por outro lado, evidências indicam que, além de reduzir a sobrevida dos pacientes atingidos, aumenta o custo relacionado ao tratamento desta complicação do procedimento e o período de hospitalização (KRÄMER et al., 1999).

1.1.3 Histórico sobre o uso de radiocontrastes

Os radiocontrastes foram descobertos por casualidade em 1923, e começaram a ser utilizados em radiologia em 1933 (KING et al., 1989; ZAGORIA, 1994; DERAY e JACOBS, 1995).

Segundo Porter (1993b), o primeiro relato de insuficiência renal aguda por radiocontrastes é de 1942, nos EUA, quando Pendergrass et al. identificaram 16 pacientes que morreram dentro de 24 horas após estudo angiográfico, em que nove deles apresentavam nefropatia subjacente, sendo que destes, seis morreram de uremia.

1.1.4 Farmacologia dos radiocontrastes

Em seres humanos, o volume de distribuição dos radiocontrastes iodados situa-se entre 20 e 22 por cento, o que é bastante semelhante ao volume de distribuição da inulina, indicando que, após sua administração, fica largamente limitada ao espaço extracelular. Têm meia-vida, variando entre 30 e 60 minutos, sendo eliminados por filtração glomerular, geralmente cinco a seis horas após a

administração, sem sofrer secreção ou reabsorção tubular significativa (CAILLÉ e ALLARD, 1988; ABRAHAM e KEJLLSTRAND, 1989; OLSEN e SOLEZ, 1994).

1.1.5 Estrutura química dos radiocontrastes

Os radiocontrastes têm estrutura química variada, cada vez mais complexa, com a síntese de novas moléculas, resultantes de combinações entre anéis de benzeno com diferentes arranjos e crescentes proporções de iodo na estrutura (CAILLÉ e ALLARD, 1988; DERAY e JACOBS, 1996a). As pesquisas químicas para formular novos radiocontrastes buscam obter moléculas com conteúdo de iodo igualmente alto, condição necessária para obter o maior grau de radiopacidade possível, mas com osmolaridade reduzida (BREZIS e CRONIN, 1997; RUBIN e COHAN, 1991).

1.1.6 Classificação dos radiocontrastes

A proporção de iodo em relação à estrutura da molécula dos radiocontrastes é um dos critérios utilizados para a classificação das moléculas de radiocontraste (ou seja: a relação do número de átomos de iodo na molécula para o número de partículas osmoticamente ativas que a molécula produz em solução). Radiocontrastes com proporção 1,5 são classificados como hiperosmolares e aqueles com proporção 3,0 ou 6,0 de baixa osmolaridade (DERAY e JACOBS, 1996b).

Também são identificados conforme a complexidade da molécula: monômeros se estruturam em um único anel benzênico, e os dímeros contêm dois anéis de benzeno, com um total de seis átomos de iodo (CAILLÉ e ALLARD, 1988).

Outro critério de classificação qualifica-os quanto à dissociação iônica: em iônicos e não-iônicos. Entre os radiocontrastes iônicos estão os mais antigos -

diatrizoato de sódio e diatrizoato meglumina. Além de iônicos, são monômeros, de alta osmolaridade, sendo usados na maior parte dos exames contrastados intravasculares em nosso meio, inclusive nos cateterismos cardíacos. Já os contrastes não-iônicos, entre os quais iohexol, utilizado inclusive como marcador de filtração glomerular, são hidrofílicos e apresentam osmolaridade mais próxima da osmolaridade plasmática (CAILLÉ e ALLARD, 1988; CRONIN, 1993; STERNER et al., 1996; BREZIS e CRONIN, 1997). Têm como vantagem a tendência de causar menor perturbação hemodinâmica e menos efeitos colaterais, inclusive redução na incidência de insuficiência renal aguda (RAPOPORT e LEVITAN, 1974; KIRKPATRICK, 1978; WYCHERLEY et al., 1986; DAVIES e RICHARDSON, 1988; BETTMANN, 1989; HARNISH et al., 1989; KINNINSON et al., 1989; CAMPBELL et al., 1990; KATAYAMA et al., 1990; KINN e BREISBLATT, 1991; TALIERCIO et al., 1991; KORN e BETTMANN, 1992; SPINLER e GOLDFARB, 1992; KATHOLI et al., 1993; BARRET e PARFREY, 1994; YOUNATHAN et al., 1994; DERAY e JACOBS, 1996b; LOUVEL et al., 1996; BREZIS e CRONIN, 1997). Estudos *in vitro* e em animais sugerem que os radiocontrastes de baixa osmolaridade apresentam efeito nefrotóxico menor que os radiocontrastes de alta osmolaridade (BREZIS et al., 1991a; ANDERSEN e VIK, 1993; GOLDFARB et al., 1993; DERAY e JACOBS, 1996b).

Entretanto, vários estudos clínicos bem delineados foram incapazes de demonstrar menor incidência de nefrotoxicidade, ao compararem radiocontrastes de alta e baixa osmolaridade (BREZIS e CRONIN, 1997). Estudo multicêntrico e prospectivo, com 1196 pacientes, comparou diatrizoato de sódio e diatrizoato meglumina (radiocontrastes de alta osmolaridade) com iohexol (radiocontraste de baixa osmolaridade), em pacientes de alto risco, com os controles normais. Este

estudo demonstrou que os indivíduos com função renal normal, na presença ou ausência de diabetes mellitus, tiveram um risco muito baixo de dano renal com qualquer agente de contraste. Porém, pacientes com insuficiência renal que receberam diatrizoato de sódio tiveram 3,3 vezes mais chance de desenvolver dano renal (aumento em creatinina sérica de 1 mg/dL, 48 a 72 horas após a exposição ao diatrizoato) do que os expostos ao iohexol (BREZIS e CRONIN, 1997). Embora os resultados deste estudo sejam animadores, outros relatos recentes sugerem que os radiocontrastes de baixa osmolaridade, como o ioxaglato, e não-iônicos, como iopamidol, também podem causar nefropatia do contraste, em populações de alto risco. Isto significa que, apesar das vantagens teóricas dos novos radiocontrastes, é necessário tomar precauções semelhantes às estabelecidas com radiocontrastes convencionais, ao proceder investigação em indivíduos de alto risco (ARON et al., 1989; NEUMAYER et al., 1989; PALLER, 1989; BRILLET et al., 1991; HALL et al., 1992; SEEGER et al., 1993; SWAN e BENNET, 1993; MELL et al., 1994; TOMMASO, 1994; OLBRICHT et al., 1995; RUDNICK et al., 1995; SCHREIER et al., 1996; THATTE e VAAMONDE, 1996). Apesar das vantagens aparentes, há vários problemas que dificultam a utilização dos radiocontrastes não-iônicos em uso geral (CRONIN, 1993). São substâncias instáveis em solução e sua produção é considerada de alto custo e complexidade (HARDEMAN et al., 1991).

1.1.7 Patogenia da nefropatia induzida por radiocontrastes

É resultante de combinação da ação tóxica dos radiocontrastes sobre as células do epitélio tubular e da isquemia da medula renal, associando a natureza química do contraste, a presença de iodo e a alta osmolaridade. Os primeiros fatores parecem ser mais relevantes para o desenvolvimento de diferentes graus

de lesão celular, enquanto a osmolaridade da solução parece ser de importância secundária, pois não houve desenvolvimento de lesão celular quando segmentos de túbulo renal foram tratados com manitol hipertônico (BARRETT, 1994).

A citotoxicidade na nefropatia induzida por radiocontrastes pode ser sugerida pelas alterações histológicas com dano celular e a presença de enzimúria após sua injeção (RUDNICK et al., 1997). Quanto às alterações vasculares, a injeção intravascular de radiocontraste induz, no rim, resposta hemodinâmica bifásica, com vasodilatação precoce e fugaz, que perdura 10 a 20 segundos, com aumento inicial no fluxo sanguíneo renal, seguido por vasoconstrição prolongada e redução no fluxo sanguíneo renal, que tornam o rim mal perfundido e reduzem a filtração glomerular (ASPELIN et al., 1987c; NEUMAYER et al., 1989; DERAY et al., 1990, FISCHER e BADR, 1993; HALL et al., 1992; BARRET, 1994; MEYRIER, 1994; TOMMASO, 1994; ZAGORIA, 1994; DERAY e JACOBS, 1995; LOUVEL et al., 1996; BREZIS e CRONIN, 1997, SOLOMON, 1998). Por outro lado, foi demonstrado que os efeitos hemodinâmicos intrarenais dos radiocontrastes são marcadamente aumentados pela isquemia prévia (DERAY e JACOBS, 1996b; WEISBERG et al., 1992), o que pode justificar a maior prevalência e maior gravidade de nefrotoxicidade pelos radiocontrastes, em pacientes com insuficiência renal prévia.

O mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está completamente compreendido. Substâncias potencialmente vasoconstritoras - angiotensina, endotelina, adenosina, e tromboxane - têm sido implicadas na patogenia da isquemia renal dependente dos radiocontrastes (KATZBERG, 1997). A vasoconstrição renal, resultado de desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores, leva à isquemia medular, mediada em parte pela liberação intra-

renal de endotelina e de adenosina induzida pelo radiocontraste (SOLOMON et al., 1994; SOLOMON, 1998). Atualmente, ainda se especula quanto à origem dos mediadores desse desequilíbrio entre forças vasoativas com predomínio da vasoconstrição. Além das alterações no metabolismo das prostaglandinas, endotelina, ou adenosina, alterações no metabolismo do óxido nítrico podem estar implicadas (AGMON et al., 1994; ANDRADE et al., 1998). Além de modificar o equilíbrio do tônus vascular, os radiocontrastes também interferem na permeabilidade à água, em respostas hormonais, na captação e na concentração intracelular de AMPcíclico, em várias linhas de células cultivadas em pesquisa (GATZY e MUDGE, 1978).

1.2 A membrana celular

1.2.1 Conceito

A célula é a unidade funcional de todos os organismos vivos, sendo delimitada por uma membrana plasmática, composta de bicamada lipídica (RICKWOOD et al., 1989; HENDRY, 1981). Infiltradas nas duas camadas ficam proteínas e carboidratos (MICHELL, 1988; RICKWOOD et al., 1989; STEIN, 1990). Esta membrana é livremente permeável a uma série de pequenas moléculas não-iônicas, como oxigênio, CO₂, água e uréia, bem como a moléculas lipossolúveis, mas restrita à passagem de outras moléculas, como glicose e aminoácidos (WEST, 1983; RICKWOOD et al., 1989; ALBERTS et al., 1994). Para que estas moléculas de fluxo restrito possam transitar, a membrana dispõe de sistemas transportadores, com particularidades dependentes das diferentes funções da célula (HENDRY, 1981; WEST, 1983; STEIN, 1986; IMANAKA et al., 1987; RICKWOOD et al., 1989; STEIN, 1990; ALBERTS et al., 1994).

Resumindo, a membrana é formada de dupla camada lipídica, nas quais flutuam proteínas e carboidratos constituindo um mosaico, com permeabilidade seletiva, tanto para dentro como para fora da célula.

1.2.2 Transporte através da membrana celular

O transporte de substâncias entre os meios intra e extracelular faz-se por difusão simples e por transporte facilitado por proteínas, que, por sua vez, é realizado por difusão facilitada ou transporte ativo (STEIN, 1986; ROSE e VALDES JR, 1994). Difusão simples e difusão facilitada são mecanismos de transporte passivos. O transporte passivo é a simples passagem de substâncias -molécula a molécula - pelos espaços intermoleculares da membrana, ou em combinação com uma proteína transportadora. As proteínas transportadoras permitem que determinados solutos cruzem a membrana, sem consumo de energia, apenas pelo movimento molecular induzido pela diferença de concentração entre as duas faces da membrana (WEST, 1983; ALBERTS et al., 1994). Na difusão simples ocorre a passagem aleatória de substâncias uma a uma, pelos espaços intermoleculares da membrana, sem participação de sistemas de transporte. O equilíbrio de concentrações entre ambos os lados da membrana acontece ao longo do tempo, dependendo de certas características da substância, como: carga elétrica, peso molecular e solubilidade na bicamada lipídica (EICK e POLI DE FIGUEIREDO, 1994). A passagem ocorre pelos espaços intermoleculares da membrana, por movimento cinético das moléculas, unicamente pelo gradiente de concentrações, que determina a direção do transporte, sem necessidade de fixação a proteínas da membrana. Já o transporte facilitado transmembrana ocorre com a participação de proteínas. A difusão facilitada exige a interação com proteínas transportadoras e a existência

de gradientes de concentração. Este tipo de transporte caracteriza-se por movimento mais rápido de substâncias importantes para a célula, com quantidades maiores das que cruzam a bicamada de lipídeos por difusão simples (BEAUGÉ e LEW, 1977; FERVENZA, 1990). Os sistemas transportadores da membrana celular modificam e reordenam sua configuração durante o movimento transmembrana de seus substratos, expondo seus locais de ligação alternadamente, a cada lado da membrana (WEST, 1983). De outro modo, no mecanismo de transporte mediado, há exigência de transportador, para criar e manter gradientes de concentração, permitindo que a célula ajuste seu meio interno (BEAUGÉ e LEW, 1977). No mecanismo de transporte ativo, há exigência de fonte adicional de energia para criar e manter gradientes iônicos, havendo trânsito de substâncias contra gradiente eletroquímico, permitindo que a célula se mantenha em homeostase (ALBERTS et al., 1994). Para que o transporte ativo ocorra, bombas iônicas, entre as quais a bomba de Na^+/K^+ é o principal exemplo, usam moléculas de adenosina trifosfato (ATP) como fonte de energia (BEAUGÉ e LEW, 1977; EICK e POLI DE FIGUEIREDO, 1994; DE FRANCESCHI et al., 1997).

A bomba de Na^+/K^+ , também denominada Na/K ATPase, é responsável pela manutenção do gradiente iônico entre Na^+ e K^+ , e de outros processos de transporte de íons. No meio intracelular, a concentração de sódio varia entre cinco e 15 mEq/L, enquanto a concentração de potássio atinge 140 mEq/L. De outro lado, a concentração de sódio extracelular atinge 145 mEq/L, e a concentração de potássio atinge cinco mEq/L (ALBERTS et al., 1994). Estas diferenças de concentração são mantidas pela membrana plasmática

virtualmente, em todas as células animais (CANESSA et al., 1992; MERCER, 1993; DORIS, 1994; ROSE e VALDES JR., 1994).

Para que isso ocorra, cada célula dispõe de um número variável de bombas, sendo que o número de bombas oscila de acordo com o tipo de célula entre as espécies. No ventrículo humano normal foi relatada a concentração de 760 ± 58 pmol/g de receptores-ouabaína específicos (ALLEN et al., 1992). No túbulo renal a bomba de Na^+/K^+ é responsável pela remoção de íons Na^+ do filtrado glomerular (LINGREL et al., 1994). No eritrócito há, em média, 300 bombas (JOINER e LAUF, 1978; FERVENZA, 1990), com relatos da presença de 100 até 1200 bombas por eritrócito (JOINER e LAUF, 1978). A inibição da bomba resulta em efluxo de K^+ e influxo de Na^+ , assim como redução no potencial de membrana. A redução no potencial de membrana permite lento influxo de cloreto como também de Na^+ , podendo resultar em influxo de água, edema e lise celular (SCHNELLMANN, 1997).

Redução da atividade da bomba de Na^+/K^+ já foi demonstrada em inúmeras doenças, tais como: insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, transplante renal, uremia, doenças da tireóide, diabetes e outras (FERVENZA, 1990; ALLEN et al., 1992; AVIV e LASKER, 1992; BORCA et al., 1992; GAULT et al., 1992; GUARENA et al., 1993; LIJNEN, 1993; McDONOUGH e FARLEY, 1993; BÖHME et al., 1994; ROSE e VALDES JR, 1994.). Também foram observadas alterações da atividade da bomba de Na^+/K^+ com fármacos, tendo como exemplo a ciclosporina (BORCA et al., 1992; BÖHME et al., 1994).

1.2.3 Alterações nos sistemas de transporte da membrana celular na uremia

Estudando eritrócitos de pacientes urêmicos, Welt et al. (1964) observaram que 25% dos pacientes em uremia avançada sem tratamento, tinham níveis

significativamente mais altos de sódio intracelular, o que foi associado à redução da atividade da bomba de Na^+/K^+ .

Em outros estudos foi constatado que mais sistemas de transporte estavam afetados na uremia, e a concentração plasmática e intracelular de aminoácidos era anormal (YOUNG e PARSONS, 1969; KOPPLE e SWENDSEID, 1975a, 1975b; ALVESTRAND et. al, 1983; TIZIANELLO et al., 1987a, 1987b). Havia aumento da concentração de aminoácidos conjugados, mas quanto aos aminoácidos livres, tanto redução como aumento das concentrações foram descritos, com as concentrações ficando próximas do normal (FRIMPTER et al., 1961; BURZYNSKI, 1969). Entre as alterações mais proeminentes foram observadas altas concentrações de vários aminoácidos não-essenciais, e concentrações reduzidas de aminoácidos essenciais, (ALVESTRAND et al., 1983). Bergstrom et al. (1983), estudando tecido muscular de pacientes urêmicos sem tratamento dialítico, detectaram decréscimo do conteúdo de proteína intramuscular, bem como redução do conteúdo de potássio intracelular, e atribuíram este achado à inibição da bomba de Na^+/K^+ .

Foram constatadas altas concentrações musculares de fenilalanina, citrulina, ornitina e arginina, mesmo com tratamento dialítico e nutrição adequados (FURST et al., 1980). Em trabalhos posteriores, foram descritas anormalidades em diferentes sistemas de transporte de membrana em pacientes urêmicos, incluindo inibição de transporte de potássio por disfunção da bomba de Na^+/K^+ em eritrócitos (FERVENZA et al., 1989a; FERVENZA et al., 1991; POLI DE FIGUEIREDO et al., 1992). Fervenza (1990), estudando transporte de membrana eritrocitária em uremia, sugeriu a existência de ligação entre alguns sinais e sintomas urêmicos com defeitos do transporte de membrana celular, que

poderiam estar envolvidos na patogenia da síndrome. Sabe-se que a composição do conteúdo intracelular é anormal na uremia, sendo possível que esta composição alterada derive de modificações do transporte de membrana, que possam contribuir para a disfunção celular observada.

Dentre os trabalhos mais extensos sobre este assunto estão os estudos de Fervenza (1990), e Poli de Figueiredo (1992). Fervenza (1990) investigou o transporte de cinco aminoácidos em eritrócitos de pacientes em hemodiálise, bem como o sistema de transporte do quaternário de amônio, colina. Em outro estudo, em pacientes urêmicos crônicos, observou que a captação de lisina via sistema de transporte γ^+ , principal transportador de L-arginina, estava alterada em eritrócitos (FERVENZA et al., 1989a). Entretanto, a alteração mais saliente na situação metabólica de uremia crônica foi o aumento da captação de colina, associada à redução da afinidade do seu transportador em eritrócitos, de pacientes em diálise (FERVENZA, 1990; FERVENZA et al., 1991). As origens destas anormalidades ainda não são claras, sendo uma hipótese que desequilíbrio nutricional estivesse associado a efeitos de toxinas urêmicas em certos sistemas de transporte de aminoácidos (FERVENZA, 1990).

1.2.4 Efeitos dos radiocontrastes sobre os sistemas de transporte

Ziegler et al. (1975), descreveram que radiocontrastes exerciam ação tóxica sobre as células do urotélio de anfíbios, em que a bomba de Na^+/K^+ era inibida de modo reversível. Por verificação da diferença de potenciais elétricos, constataram que os radiocontrastes inibiam o transporte de sódio. O mecanismo de alteração da função da bomba de Na^+/K^+ não foi identificado e, segundo os autores, poderia ser consequência de: ação inibitória direta sobre a bomba de Na^+/K^+ ; toxicidade direta sobre o mecanismo de produção de energia das células

epiteliais, inibindo o transporte ativo (dependente de energia); bloqueio do acesso de sódio em direção ao pool de transporte apropriado; atividade aniônica com efeito não-específico no transporte de sódio; alteração morfológica e estrutural do epitélio ou de membranas celulares individualmente, de alguma maneira desfavoráveis ao transporte de sódio (ZIEGLER et al., 1975).

Ziegler e Olsen (1980), com o mesmo modelo de estudo em urotélio, sugeriram que os radiocontrastes não eram inibidores metabólicos das reações produtoras de energia ligadas ao transporte de sódio neste tecido, e interpretaram que o efeito era além da bomba de Na^+/K^+ , por inibição da acidificação no urotélio, impedindo a passagem de bicarbonato da serosa para o tecido epitelial.

Cada um destes possíveis mecanismos para a inibição do transporte de sódio ou a superposição de vários deles permanece em aberto para futura avaliação experimental.

A alteração da função da bomba de Na^+/K^+ frente aos radiocontrastes mereceu investigação por diferentes métodos, na espécie humana. Aspelin et al. (1987a, 1987b, 1987c) observaram que radiocontrastes alteravam propriedades estruturais dos eritrócitos. Bino et al. (2000) constataram que radiocontrastes inibiram a bomba de Na^+/K^+ em córtex e zona medular renal.

Durante a década de 90 surgiram pesquisas a respeito da participação do óxido nítrico (ON) na fisiopatologia da nefropatia induzida por radiocontrastes, sendo, porém, escassos os estudos a respeito do envolvimento da L-arginina, aminoácido precursor da síntese do ON (SCHWARTZ et al., 1994; ANDRADE et al., 1998; CAMPOS et al., 1999; TOME et al., 1999).

ON é um gás, considerado atualmente uma das moléculas mais importantes em biologia, sintetizado a partir de L-arginina, com a participação de ON sintases, que compõem uma família de enzimas (MONCADA e HIGGS, 1993). As ON sintases até agora identificadas são três, e têm distribuições diferentes nos tecidos, inclusive em nível intra-renal, sendo reguladas através de mecanismos específicos. No rim, ON participa em vários processos vitais, entre os quais a regulação da hemodinâmica glomerular e medular, regulação do volume e do líquido extracelular, da resposta de retroalimentação túbulo-glomerular e liberação de renina. Porém, além de seus efeitos benéficos como mensageiro e molécula básica de defesa imunológica, pode provocar efeitos nocivos. Quando sua produção é excessiva pode ser citotóxico, reagindo com espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, conduzindo a formação de ânions de peroxinitrito e produção de radicais hidroxilados. Sabe-se que desequilíbrio na via L-arginina-ON pode contribuir na evolução desfavorável de várias glomerulonefrites mediadas por mecanismo imune, bem como na insuficiência renal isquêmica, nefropatia obstrutiva, rejeição aguda e crônica de transplante renal e nefropatia induzida pelo radiocontraste (BREZIS et al., 1991b; ERLEY et al., 1997; KONE, 1997; SCHMIDT e BAYLIS, 2000). Produção deficiente de óxido nítrico também se vincula com a patogênese da hipertensão volume-dependente (ERLEY et al., 1997; KONE, 1997).

No que se refere à uremia crônica, sabe-se que a produção de óxido nítrico é baixa (SCHMIDT e BAYLIS, 2000). Esta dualidade entre efeitos benéficos e prejudiciais do ON deu origem ao interesse extraordinário nesta molécula, e a procura por compreensão detalhada da biossíntese do ON e seu precursor L-arginina (REYES et al., 1994; KONE, 1997). Atualmente, existem poucos relatos

a respeito do transporte deste aminoácido através da membrana celular, tema de fundamental importância, já que a produção de ON ocorre dentro da célula (AGMON et al., 1994; ANDRADE et al., 1998).

A síntese de óxido nítrico pelo endotélio vascular é responsável pelo tônus vasodilatador, essencial para a regulação da pressão arterial (MONCADA e HIGGS, 1993). Conseqüentemente, L-arginina pode ter papel importante na alteração do tônus vascular ligada a nefropatia induzida por radiocontrastes, se houvesse modificação na sua captação pela membrana celular. Sabe-se que o risco de IRA está aumentado em pacientes com circulação renal comprometida, já que a vasodilatação dependente do endotélio está prejudicada (AGMON et al., 1994; YU et al., 1994).

Outros estudos demonstraram que o ON participa na lesão renal por hipóxia em suspensões de túbulos proximais de ratos (YU et al., 1994; YU, 1997). Estudos em ratos hipercolesterolêmicos, nos quais a vasodilatação endotélio-dependente está prejudicada, mostraram que a administração de L-arginina por via oral ou endovenosa, induzindo a produção de ON, evita vasoconstrição e a diminuição da taxa de filtração de glomerular associada com a administração de radiocontrastes (ANDRADE et al., 1998; CAMPOS et al., 1999; TOME et al., 1999).

Agmon et al. (1994) produziram um modelo simples de nefropatia por radiocontraste, com ratos pré-tratados com indometacina e L-nitroarginina metil-ester (L-NAME), antes da administração de iotalamato. Neste estudo concluíram que prostanóides e óxido nítrico têm papel protetor importante na resposta renal ao material dos radiocontrastes. Síntese reduzida destas substâncias vasoativas

em doenças renais e vasculares poderia incrementar o risco das populações mais expostas à nefropatia induzida por radiocontrastes.

É possível que os radiocontrastes também interfiram com outros sistemas de transporte, por exemplo, transporte de colina. Askari (1966) detectou que colina transita pela membrana celular de eritrócitos humanos com a participação de transportadores específicos. O transportador não tem papel fisiológico óbvio em eritrócitos maduros e é provavelmente vestigial, considerando que colina não é nem incorporada em fosfolipídios nem convertida em metabólito dentro do eritrócito (ASKARI, 1966; MARTIN, 1968). Isto faz com que os eritrócitos sejam um modelo muito útil para estudar o transportador de colina (MARTIN, 1972; MARTIN, 1977). O transportador eritrocitário de colina foi estudado extensivamente e sua cinética bem caracterizada. Foram identificados dois mecanismos distintos de captação de colina em eritrócitos: difusão simples e mecanismo facilitado, que se satura em baixas concentrações extracelulares do íon (ASKARI, 1966). A cinética do transportador de colina é algo complexo, podendo executar trocas colina-colina ou fluxos de colina unidirecionais (DEVES e KRUPKA, 1979; DEVES e KRUPKA, 1983). Anormalidades no transporte de colina foram descritas em situações onde a função renal está prejudicada (FERVENZA et al., 1991; POLI DE FIGUEIREDO et al., 1992). No que se refere ao transporte de colina, ligado à toxicidade celular, existem estudos sobre alterações na função colinérgica no sistema nervoso central (LOPEZ DEL PINO et al., 1983; CHROBAK et al., 1989; GYLYS et al., 1992; FERGUSON et al., 1994; RIBEIRO et al., 2003), e um relato ligando gentamicina à alteração do metabolismo dos fosfolipídeos em cultura de células de túbulo proximal humano (CHATTERJEE, 1987). Já em referência a alterações do transporte de colina e

toxicidade eritrócitária, Deves e Krupka (1990), descreveram a inibição do transporte de colina por etanol e vários alcanóis em eritrócitos. Colina é um íon quaternário de amônio exigido na síntese dos fosfolipídeos da membrana celular e precursor de acetilcolina (MARTIN, 1972).

Colina participa na síntese de fosfolipídios e a síntese de fosfolipídios é fundamental para manter a homeostasia da membrana celular. Células desprovidas de colina perecem por apoptose (ZEISEL, 2000).

Por outro lado, de todos os sistemas de transporte estudados nos pacientes urêmicos, o sistema transportador eritrocitário de colina foi o que apresenta as alterações mais significativas. Fervenza et al. (1991), detectaram diferença consistente de duas a três vezes na capacidade eritrocitária máxima de captação de colina em pacientes urêmicos, quando comparada com controles normais. Contudo, até o momento inexistente relato de estudo a respeito do transporte de colina através da membrana celular, em presença de radiocontrastes.

As alterações do transporte de colina em presença de radiocontrastes, bem como seus mecanismos, ainda não foram investigados, merecendo agora maior atenção. O uso de colina como indicador de disfunção do transporte de membrana celular se justifica, pois sendo elemento participante dos mecanismos de síntese da membrana celular, poderia estar vinculada à fisiopatologia da nefrotoxicidade induzida pelos radiocontrastes. Buscamos, também, pela avaliação do transporte de colina em eritrócitos expostos a radiocontrastes, fornecer informações sobre a fisiopatologia da nefrotoxicidade induzida pelos radiocontrastes, pois a membrana do eritrócito é modelo de estudo de transporte

de membrana reconhecido e aceito, permitindo extrapolar os resultados obtidos para outras células (STEWART e FRICKE, 2003).

1.2.5 A membrana eritrocitária como modelo de estudo de transporte de membrana

O eritrócito humano maduro tem metabolismo relativamente simples, já que não necessita sintetizar proteínas ou lipídeos ou replicar seu material genético. Contudo, precisa manter sua forma, o conteúdo de seu meio interno e sua integridade estrutural (FERVENZA, 1990). O conhecimento das características dos fluxos de substâncias através das membranas celulares é proveniente, em grande parte, dos estudos realizados em eritrócitos humanos, notadamente quando a identificação dos diversos sistemas de transporte e seus mecanismos é facilitada pela existência de inibidores específicos (FERVENZA, 1990; POLI DE FIGUEIREDO, 1992; STEWART e FRICKE, 2003). Os eritrócitos possuem série relevante de sistemas de transporte, tanto para íons como para moléculas (YOUNG e ELLORY, 1983). Podem ser citadas algumas vantagens importantes que o estudo do transporte de membrana nos eritrócitos traz: são células individualizadas, com grande homogeneidade, em que a ausência de compartimentos anatômicos evita as dificuldades existentes quando se executa análises de múltiplos compartimentos. Outrossim, a ausência de organelas internas indica que muitas funções dos eritrócitos devem ser diretamente ligadas às propriedades da membrana. Finalmente, há também vantagens em estudar o transporte em modelo onde a substância transportada não é rapidamente metabolizada (FERVENZA, 1990). Quando incubados, os eritrócitos imediatamente entram em contato com o meio, de onde podem ser fácil e rapidamente separados. Sendo as células humanas mais facilmente disponíveis,

são particularmente importantes no contexto clínico (FERVENZA, 1990). Ainda a propósito, os eritrócitos podem ser distribuídos em alíquotas, e a observação da modificação da composição do meio intracelular torna-se facilitada, pois pode ser obtida por lise e reconstituição da membrana fragmentada (CAVIERES, 1977).

Apesar de não podermos dizer que é uma "típica" membrana celular, a membrana dos eritrócitos é uma verdadeira membrana lipídica de dupla camada, que tem sido muito bem caracterizada, tanto com respeito à sua estrutura química, como quanto à sua dinâmica (FERVENZA, 1990). Embora o uso de bicamadas lipídicas artificiais possa trazer algumas vantagens em alguns problemas específicos, a membrana eritrocitária é inestimável como modelo para estudo sob condições fisiológicas. Muitos sistemas de transporte têm sido estudados na membrana eritrocitária, e a alta qualidade dos dados obtidos têm permitido que outros sistemas sejam explorados em detalhe, e os resultados observados ampliados para outras células, como o transporte pela bomba de Na^+/K^+ (GARAY e GARRAHAN, 1973; STEWART e FRICKE, 2003). Os eritrócitos representam modelo bem aceito para estudos do transporte de membrana e os dados obtidos geralmente se demonstram válidos quando analisamos estes sistemas de transporte em outros tecidos, sendo modelo de escolha para estudos de transporte ativo de Na^+ e K^+ (BEAUGÉ e LEW, 1977). Facilmente obtidos, permitem que as propriedades do transporte de membrana sejam avaliadas em diversas condições, sem danificar a membrana. Entretanto, a expressão "eritrócito humano normal" tem sido denominada "uma abstração de conveniência" (FERVENZA, 1990), já que uma amostra de sangue contém uma população de células em diferentes estágios de maturação. Muitas funções se alteram com a idade dos eritrócitos e sua maturação, incluindo os transportadores

(FERVENZA, 1990). Estudo de Fervenza (1990), indica que, tendo-se o cuidado de que os eritrócitos da amostra não sejam nem tão jovens nem tão velhos, a distribuição da “população” de eritrócitos é considerada constante entre indivíduos.

1.2.6 Ação dos radiocontrastes sobre os eritrócitos

Os radiocontrastes não são inertes em relação aos eritrócitos. Aspelin et al. (1987a, 1987b, 1987c), detectaram alterações de propriedades estruturais dos eritrócitos devidas à exposição a radiocontrastes, o que reforça a idéia de que possam ser tóxicos para a membrana eritrocitária. Alteram o volume celular (modificando forma, capacidade de agregação e de deformação), bem como inibem a produção de energia direta ou indiretamente (ASPELIN et al., 1987a, 1987b, 1987c). Também foi observado em ratos que a deformabilidade dos eritrócitos ficava reduzida na presença de radiocontrastes, acompanhada de aumento da viscosidade sangüínea, obstáculo ao trânsito fácil de eritrócitos na microcirculação renal, levando à hipoperfusão regional, especialmente na medula renal (DERAY, 1999). Hipoperfusão medular seletiva foi detectada ao comparar-se o fluxo sangüíneo cortical e papilar após a infusão de vários radiocontrastes, resultando em aumento da atividade metabólica e maior consumo de oxigênio (BREZIS et al., 1991a; HEYMAN et al., 1999). Em estudo feito em coelhos, a infusão de radiocontrastes foi ligada à remoção incompleta dos eritrócitos dos vasos da porção externa da medula, e houve correlação forte entre a massa eritrocitária na zona interseptal e a necrose da porção espessa ascendente medular da alça de Henle (HEYMAN et al., 1999). Ao mesmo tempo, ocorreu redução da saturação da hemoglobina, reduzindo a disponibilidade de O₂ aos tecidos (DERAY, 1999).

1.3 Justificativa deste estudo

A nefropatia induzida por radiocontrastes ainda tem seu mecanismo fisiopatológico desconhecido, sendo causa de aumento de morbidade e mortalidade em pacientes de alto risco, que se vinculam com o aumento da idade da população e pela maior utilização de procedimentos radiológicos invasivos para diagnóstico e/ou tratamento, que demandam infusões de radiocontrastes por vezes volumosas.

Sabe-se que a fisiopatologia da nefropatia dos radiocontrastes é multifatorial, onde toxicidade direta destes agentes sobre a célula tubular renal está implicada, e a membrana celular pode estar com a função alterada (ABRAHAM e KEJLLSTRAND, 1989; CRONIN, 1993; ZAGORIA, 1994).

Por outro lado, algumas propriedades da membrana dependerão das diferentes funções especializadas da célula (FERVENZA, 1990; ALBERTS et al., 1994). Estas propriedades podem estar alteradas em diferentes doenças, ajudando a identificá-las adequada e, talvez, precocemente. Situações como hipertensão arterial, uremia e transplante renal têm sido estudadas, evidenciando disfunções celulares e defeitos no transporte de membrana, capazes de sugerir sua responsabilidade na patogênese destas entidades (FERVENZA et al., 1989a, 1989b; FERVENZA, 1990; POLI de FIGUEIREDO, 1992).

Como os processos de transporte transmembrana ocorrem através de proteínas da membrana plasmática, podem ser estudados por técnica laboratorial. Em estudo preliminar foi observado que a membrana de eritrócitos expostos a diatrizoato de sódio tem menor número de bombas de Na^+/K^+ em atividade, e a atividade da bomba de Na^+/K^+ também diminui em presença de algumas destas substâncias (FERVENZA et al., 1994).

Ainda no mesmo contexto, sistemas de transporte de L-arginina e colina também podem ser avaliados quanto ao seu influxo pela membrana celular, em presença de soluções contendo radiocontrastes. Avaliação do transporte de L-arginina e colina em eritrócitos expostos a radiocontrastes pode fornecer informações sobre a fisiopatologia da insuficiência renal aguda, pois a membrana do eritrócito é modelo de estudo de transporte de membrana reconhecido e aceito, permitindo transpor os resultados obtidos para outras células (STEWART e FRICKE, 2003).

O projeto foi delineado com o propósito de tornar disponível informação a respeito deste tema. Tornou-se factível no Hospital São Lucas da PUCRS, em que o uso de radiocontrastes é freqüente, como hospital de referência para atendimento de alta complexidade, e onde a tecnologia para avaliação do transporte de membrana celular estava ao alcance no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Foi utilizada a técnica de determinação da atividade da bomba de Na^+/K^+ e avaliação do seu número em cada eritrócito, pois estudos prévios sugeriram que existe disfunção deste sistema de transporte em presença de radiocontrastes (ZIEGLER et al., 1975; BINO et al., 2000).

Foi estudado o influxo do aminoácido L-arginina pelo fato deste ser precursor da síntese intracelular de ON, e pelas evidências crescentes que indicam o ON como elemento integrante dos mecanismos fisiopatológicos da insuficiência renal aguda por radiocontrastes.

O estudo do transporte de colina foi feito, pois colina participa na síntese dos fosfolipídeos da membrana celular, e disfunção de seu transporte poderia estar implicada como indicador de disfunção da membrana. Outro motivo para

seu estudo foi o resultado observado por Ferverza et al. (1991), que apontou significativo aumento do influxo de colina em pacientes com insuficiência renal. Todos os sistemas de transporte de membrana estudados compõem métodos de estudo da linha de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

A presente revisão tem por objetivo colaborar para o conhecimento da fisiopatologia da toxicidade dos radiocontrastes, condição necessária para a formulação de esquemas terapêuticos que atenuem a lesão renal desencadeada por estes agentes, que podem interferir com sistemas de transporte de específicos da membrana celular de eritrócitos humanos.

Sumarizando, o objetivo do presente trabalho é responder se os sistemas de transporte dos eritrócitos estudados têm sua função alterada quando expostos a radiocontrastes, ao serem comparados aos controles.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de radiocontrastes selecionados sobre distintos sistemas de transporte da membrana do eritrócito humano.

2.2 Objetivos específicos

Comparar

a) a atividade da bomba de Na^+/K^+ em eritrócitos isolados de indivíduos saudáveis e de pacientes submetidos a cateterismo cardíaco, expostos a composto de radiocontrastes Hypaque-M 76®;

b) a atividade da bomba de Na^+/K^+ em eritrócitos isolados expostos a diatrizoato de sódio, diatrizoato de meglumina ou composto de radiocontrastes Hypaque-M 76®;

c) o número de bombas de Na^+/K^+ em atividade por eritrócito na presença e na ausência de diatrizoato de sódio;

d) o transporte transmembrana de L-arginina e de colina, na presença e ausência de Hypaque-M 76®.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento

Experimentos em laboratório com amostras-controles.

3.2 Amostra estudada

Foram analisados indivíduos de ambos os sexos, sem delimitação de idade. Esta amostra incluiu pacientes atendidos tanto no ambulatório como na internação clínica do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, além de grupo controle de voluntários que exerciam atividade profissional no HSL.

3.2.1 Critérios de Seleção

A amostra foi constituída de indivíduos saudáveis e pacientes submetidos a cateterismo cardíaco que aceitaram participar do estudo, por anuência verbal e assinatura de Termo de Consentimento Pós-Informado. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa na Área da Saúde da PUCRS.

Indivíduos com uma ou mais das seguintes características: diabetes mellitus, história prévia de nefropatia, doença de tireóide, hepatopatia, neoplasia, uso de digitálicos, ou transfusão sanguínea há menos de 120 dias, não foram incluídos.

3.3 Coleta e processamento dos eritrócitos

Amostras de 10 mL de sangue foram coletadas para os ensaios, em tubos, heparinizados e centrifugadas, em no máximo uma hora. Após centrifugação do sangue, plasma, leucócitos e plaquetas foram removidos, restando somente eritrócitos. Os eritrócitos foram lavados três vezes, por centrifugação e ressuspensão seqüencial em salina (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, glicose 5 mM, MOPS 10 mM, pH 7,4) a 4°C para a realização dos ensaios de transporte de membrana. Hematócritos foram medidos em contador de células Coulter T 890.

Para avaliar a influência dos radiocontrastes na atividade do transporte de membrana foram incubados eritrócitos isolados em solução salina ou soluções com radiocontrastes.

3.4 Ensaios sobre a atividade da bomba de Na⁺/K⁺

Para verificar a atividade da bomba de Na⁺/K⁺ foi utilizada a medida do influxo de ⁸⁶Rb⁺.

O influxo de ⁸⁶Rb⁺ foi medido de acordo com técnicas previamente descritas (FERVENZA et al., 1989b). A técnica incluiu ressuspensão dos eritrócitos em salina a 4°C para obter hematócrito próximo de 10%, posteriormente mantidos em banho de água a 4°C para inibir a atividade da bomba de Na⁺/K⁺ durante o ensaio.

Foi estabelecido em estudos previamente publicados que ⁸⁶Rb⁺ é congênere válido para medir o influxo de K⁺ (BEAUGÉ e LEW, 1977). Portanto, o procedimento a seguir foi o utilizado para as medidas de fluxo de K⁺.

Os experimentos executados em pacientes submetidos a cateterismo cardíaco avaliaram a atividade da bomba de Na⁺/K⁺ em eritrócitos colhidos antes da infusão de radiocontraste e após 15 minutos da sua administração. O

radiocontraste empregado foi Hypaque-M 76[®], (Winthrop Inc. Malvern, PA USA) [composto de diatrizoato de sódio a 10% (p/V) e solução de diatrizoato de meglumina a 66% (p/V)], sendo que o volume injetado variou entre 70 e 90 mL, equivalente, para volemia de 5000 mL, a dose entre 14 e 18 $\mu\text{mol/L}$ de Hypaque-M 76[®]/mL de sangue.

Tubos em triplicata contendo 1 mL de suspensão de eritrócitos foram incubados em banho de água a 37°C por cinco minutos com solução 0,1 mM de ouabaína ou salina normal. Para avaliar a influência dos radiocontrastes na bomba de Na^+/K^+ foram incubados eritrócitos por 15 minutos com soluções de diatrizoato de sódio (diatrizoato de sódio 150 mM, KCl 5 mM, MOPS 10 mM, glicose 5 mM, pH 7,4), diatrizoato de meglumina (diatrizoato de meglumina 150 mM, KCl 5 mM, MOPS 10 mM, glicose 5 mM, pH 7,4) ou composto de diatrizoatos [composto das soluções de diatrizoato de meglumina e diatrizoato de sódio em concentrações semelhantes às existentes no radiocontraste comercial Hypaque-M 76[®] (diatrizoato de meglumina 11,42 mM e diatrizoato de sódio 2,08 mM)] com ou sem ouabaína. Em seqüência, foi acrescentada quantidade marcadora de $^{86}\text{Rb}^+$ a cada tubo, e o fluxo a 37°C após cinco minutos de incubação foi executado. Os fluxos foram então iniciados e interrompidos em banho de água a 4°C. Após esfriamento por três minutos, os tubos foram centrifugados rapidamente (2000 rpm), sendo então recuperados 10 μL de sobrenadante para contagem do teor de $^{86}\text{Rb}^+$ extracelular. Após a aspiração do conteúdo sobrenadante, os eritrócitos foram então lavados três vezes em solução salina isotônica de MgCl_2 (MgCl_2 107 mM, MOPS 10 mM, pH 7,4) a 4°C. Foi então induzida lise eritrocitária por adição de 0,5 mL de Triton X-100 a 0,1% e as proteínas precipitadas por adição de 1 mL de ácido tricloroacético a 5%, seguida

de centrifugação (3000 rpm) por 10 minutos. O conteúdo de $^{86}\text{Rb}^+$ do sobrenadante e do intracelular foi então contado, num espectrofotômetro de cintilação β (Beckman LS-6500 - Beckman Coulter, Inc. Fullerton CA, USA), medindo-se também frascos marcados como padrão de referência da radiação. A relação entre a contagem de $^{86}\text{Rb}^+$ intracelular e extracelular foi usada, junto com o hematócrito e a concentração de K^+ medida, para calcular o influxo total de K^+ e seu componente ouabaína-sensível (indicador da atividade da bomba de Na^+/K^+). O cálculo do influxo de K^+ foi determinado conforme a fórmula:

$$\frac{\text{CPMa} \times [\text{K}^+] \times \text{vol. Sobren.}}{\text{CPMs} \times (\text{Hct} / 100) \times 0,54 \times 10^{-5}} \times 12 = \text{mmol/L células/h}$$

onde:

CPMa = contagens por minuto do material intracelular.

$[\text{K}^+]$ = concentração de potássio da solução.

vol. Sobren. = alíquota do material extracelular (em mL).

12 = fator de correção de tempo.

CPMs = contagens por minuto da alíquota do material extracelular.

Hct/100 = hematócrito em %.

$0,54 \times 10^{-5}$ = volume da suspensão de hemácias contido em cada tubo e corrigido para litro.

mmol/L células/h = influxo de K^+ observado (em cada litro de células em uma hora).

3.5 Verificação do número de bombas/eritrócito

Para identificar a existência de efeito dos radiocontrastes no número de bombas de Na^+/K^+ , eritrócitos foram incubados em presença ou ausência de

diatrizoato de sódio. O número de bombas de Na^+/K^+ foi determinado de acordo com técnicas descritas previamente em outros estudos (FERVENZA et al., 1989b). Tubos contendo alíquotas de 1 mL da suspensão de eritrócitos em salina ou em diatrizoato de sódio foram incubados em banho de água a 37°C , durante cinco minutos, com ou sem solução 0,1 mM de ouabaína não-marcada. Em seqüência, foi acrescentado a cada tubo solução de ouabaína marcada com ^3H , com concentração final de aproximadamente 440 nM, suficiente para ocupar todos os sítios da bomba. As suspensões foram então incubadas em banho de água a 37°C , por duas horas, e após os eritrócitos foram lavados três vezes em solução de MgCl_2 a 4°C . O ^3H ligado foi solubilizado por adição em seqüência de Triton X-100 a 0,1% e ácido tricloroacético, e a radioatividade foi posteriormente contada. A ligação específica da ouabaína foi calculada pela subtração da ^3H -ouabaína ligada na presença de excesso de ouabaína fria. O número de bombas de Na^+/K^+ por eritrócito foi determinado conforme a fórmula:

$$(\text{CPMa}-\text{CPMao}) \times (\text{n de moles ouab./CPM Padrão}) \times 6,02 \times 10^{23}$$

$$(\text{Htc} \times 0,4 \times 100) / 1 \times 10^{-6}$$

onde:

CPMa: = contagens β da amostra sem ouabaína (por minuto).

CPMao = contagens β da amostra em solução com ouabaína (por minuto).

n de moles ouab. = concentração da solução de ouabaína marcada.

CPMPadrão = contagens β da solução-padrão.

$6,02 \times 10^{23}$ = número de Avogadro ou número de moléculas/mol.

Htc = hematócrito da suspensão de células.

0,4 = volume da suspensão de células contido em cada tubo (mL).

1×10^{-6} = correção para o volume em litros da amostra.

Número de bombas de Na^+K^+ /célula = resultado obtido conforme demonstrado na equação acima em cada indivíduo.

A multiplicação pelo n° de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), converte a contagem do número de moles de ouabaína em número de bombas ativas/eritrócito.

3.6 Estudos sobre o transporte de L-arginina e de colina

Amostras de sangue usadas nos experimentos de estudo do transporte de L-arginina e de colina foram colhidas de indivíduos saudáveis. Duas séries de experimentos foram executadas. No primeiro, foi utilizado sangue previamente incubado por 15 min em soluções de Hypaque-M 76[®], com concentrações crescentes (0; 3,5; 7; 14; 28; 70 e 112 $\mu\text{mol/L}$). A escolha das concentrações partiu da concentração de Hypaque-M 76[®] de 14 $\mu\text{mol/L}$, semelhante a estimada durante os cateterismos cardíacos seguida de suas múltiplas e sub-múltiplas. Na outra série ($n=5$ ou 6), o sangue foi pré-incubado em solução de Hypaque-M 76[®] (concentração fixa 14 $\mu\text{mol/L}$ semelhante a estimada durante os cateterismos cardíacos) por 0, 5, 15 e 30 minutos. Os fluxos de controle foram executados em solução salina.

As medidas de fluxo foram realizadas usando métodos previamente descritos em experimentos de estudo de fluxo transmembrana em eritrócitos (FERVENZA et al., 1990; FERVENZA, 1990; FERVENZA et al., 1991). A captação eritrocitária total de L-arginina (ou colina) foi medida incubando eritrócitos em hematócrito de 10%, durante três minutos (ou 5 minutos para colina), em banho de água a 37°C, na presença de 500 $\mu\text{mol/L}$ de solução de L-arginina (ou de colina 250 $\mu\text{mol/L}$). ^{14}C -L-arginina ou ^{14}C -colina foram usadas como marcadores. Os fluxos foram começados e interrompidos em banho de

água a 4°C, por três minutos. Os eritrócitos foram então centrifugados e a radioatividade extracelular removida por aspiração e a lavagem realizada através da ressuspensão dos eritrócitos em salina a 4°C, seguida de centrifugação três vezes repetidas a 14000 rpm. Os eritrócitos foram então lisados, pela adição de Triton X-100 a 0,1%, seguida pela precipitação de proteínas em presença de ácido tricloroacético. Os eritrócitos foram então compactados pela centrifugação a 14000 rpm, durante cinco minutos. O sobrenadante foi então transferido por pipetagem para frasco contendo fluido de cintilação. A radioatividade intracelular foi medida por cinco minutos com contador de cintilação Beckman LS-6500. O cálculo dos fluxos de L-arginina e de colina foi determinado conforme a fórmula:

$$\frac{\text{CPMa} \times (0,011/\text{CMPp}) \times 1000 \times 20}{(\text{Hct} / 0,225)/100} = \mu\text{mol/L células/h}$$

onde:

CPMa = contagens por minuto da amostra.

0,011 mL = volume da alíquota da solução-padrão.

CPMp = contagens por minuto da solução-padrão.

1000 = fator de correção do volume (para litro).

20 = fator de correção de tempo (para hora).

Hct = hematócrito em %.

0,225 mL = volume da suspensão de eritrócitos contido em cada tubo.

$\mu\text{mol/L células/h}$ = influxo de L-arginina/colina observado (em cada litro de células em uma hora).

3.7 Análise estatística

Diferenças estatísticas entre grupos múltiplos foram analisadas pela análise de variância de medidas repetidas (ANOVA). Os testes de comparações *post hoc* foram executados pelo teste de comparações de múltiplo de Dunnett (comparação contra controle), ou pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (comparações emparelhadas). Comparações entre dois grupos emparelhados foram executadas pelo teste *t* de Student de dupla cauda. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Foi avaliada a magnitude do tamanho de efeito de acordo com Hopkins (HOPKINS, 2002). O programa utilizado como banco de dados e planilha eletrônica para os cálculos da atividade da bomba de Na^+/K^+ e do número de bombas foi o Microsoft Excel versão 2000. O programa de computador GraphPad Prism 3.03, (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA 92121, EUA) foi usado para a análise estatística.

3.8 Estrutura da tese

Tendo em vista que não há recomendação formal, por parte do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em relação à estrutura e apresentação de teses, utilizou-se, para a presente, as recomendações feitas por Spector (2001). A revisão da literatura tem apresentação sob forma de resenha bibliográfica, com a citação dos autores no sistema sobrenome-ano, conforme padrão indicado pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Foi incluído, também, como anexo, o texto referente ao artigo encaminhado para publicação.

4 RESULTADOS

A atividade da bomba de Na^+/K^+ foi avaliada em 8 indivíduos saudáveis adultos, com média de idade 55 anos (DP=11), variando entre 44 a 74 anos, dos quais 7 eram mulheres; e em 15 pacientes submetidos a cateterismo cardíaco, com média de idade de 56 anos (DP \pm 9), variando entre 44 a 74 anos, sendo 9 mulheres.

4.1 Efeito dos radiocontrastes sobre a atividade da bomba Na^+/K^+ .

O efeito das diferentes soluções de radiocontraste na atividade da bomba de Na^+/K^+ com concentração de 5 mmol/L de potássio extracelular (n=8) é mostrado na Tabela 1.

O influxo de potássio foi significativamente diferente entre grupos. A análise estatística com comparações *post hoc*, identificou influxo de potássio maior no grupo de controle quando comparado ao grupo exposto ao composto de diatrizoatos, com magnitude de tamanho de efeito grande (HOPKINS, 2002).

Tabela 1 - Efeito dos radiocontrastes sobre a atividade da bomba Na^+/K^+ .

Atividade da bomba de Na^+/K^+ (mmol/L células/h)			
Controle	DS	DM	CD
$1,50 \pm 0,35^*$	$1,32 \pm 0,37$	$1,28 \pm 0,30$	$1,01 \pm 0,25^*$

n=8. Valores: média \pm desvio-padrão.

DS: diatrizoato de sódio, DM: diatrizoato meglumina,

CD: Composto de diatrizoato de sódio e diatrizoato meglumina

Análise de variância de medidas repetidas, $P=0,004$; * Teste *post hoc* de Tukey: $P<0,010$).

4.2 Atividade da bomba de Na^+/K^+ em pacientes submetidos a cateterismo cardíaco

As medidas de atividade da bomba de Na^+/K^+ em eritrócitos de 15 pacientes antes e depois de cateterismo cardíaco usando Hypaque-M 76[®] foram respectivamente $1,40 \pm 0,36$ e $1,27 \pm 0,40$ mmol/L células/h (teste *t* de Student $P=0,039$).

A média do peso dos pacientes foi 69 ± 10 kg e a injeção de radiocontraste foi de $1,03 \pm 0,16$ mL/kg.

4.3 Determinação do número de bombas de Na^+/K^+ /eritrócito

O número de bombas foi quantificado em 20 indivíduos adultos, e a idade média foi de 48 anos ($DP=16$), variando de 26 a 76 anos, sendo 8 mulheres. O número de bombas de Na^+/K^+ na presença de diatrizoato de sódio foi significativamente menor que na solução salina-controle, com 143 ± 34 e 156 ± 36 bombas/eritrócito, respectivamente ($P=0,0145$, teste *t* de Student).

4.4 Captação de L-arginina em eritrócitos expostos a concentrações crescentes de Hypaque-M 76®

Foram executados ensaios de fluxo de L-arginina em eritrócitos de 10 indivíduos adultos saudáveis, com idade entre 23 a 50 anos, média de 28 ± 7 anos, dos quais 6 eram mulheres.

A Figura 1 mostra o influxo de L-arginina/eritrócito em solução 500 μM de L-arginina extracelular. A captação de L-arginina em diferentes concentrações de Hypaque-M 76® só foi significativamente menor quando a incubação foi feita em concentrações extremamente altas (70 e 112 $\mu\text{mol/L}$), comparada à incubação em salina ($P=0,0001$, Análise de variância de medidas repetidas; $P=0,01$, no teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunnett).

Embora houvesse diferença estatisticamente significativa, a magnitude do tamanho de efeito foi pequena (HOPKINS, 2002).

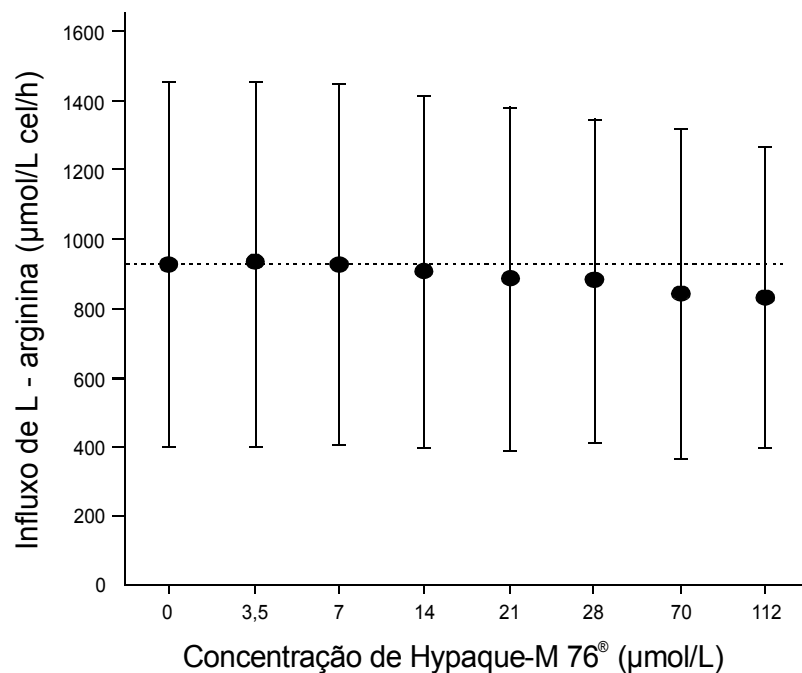


Figura 1 – Influxo eritrocitário em solução 500 µM de L-arginina extracelular, com 15 minutos de exposição a concentrações crescentes de Hypaque-M 76[®]. n=10. Captação de L-arginina foi significativamente menor apenas nas concentrações de 70 e 112 µmol/L do radiocontraste comparado ao controle incubado em salina. Análise de variância de medidas repetidas, P=0,0001. Teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunnett, P=0,010).

4.5 Captação de L-arginina em solução com 14 µmol/L de Hypaque-M 76[®], em tempo de exposição crescente

O estudo da influência do tempo de exposição ao radiocontraste sobre a captação de L-arginina no eritrócito foi executado em 5 indivíduos e os resultados estão apresentados na Figura 2.

Houve diminuição progressiva de captação de L-arginina com o aumento do tempo de exposição ao Hypaque-M 76[®] em ambos os grupos, sem haver diferença significativa entre os valores de captação entre o grupo exposto ao Hypaque-M 76[®] e o grupo controle (P=0,996, Análise de variância de medidas repetidas).

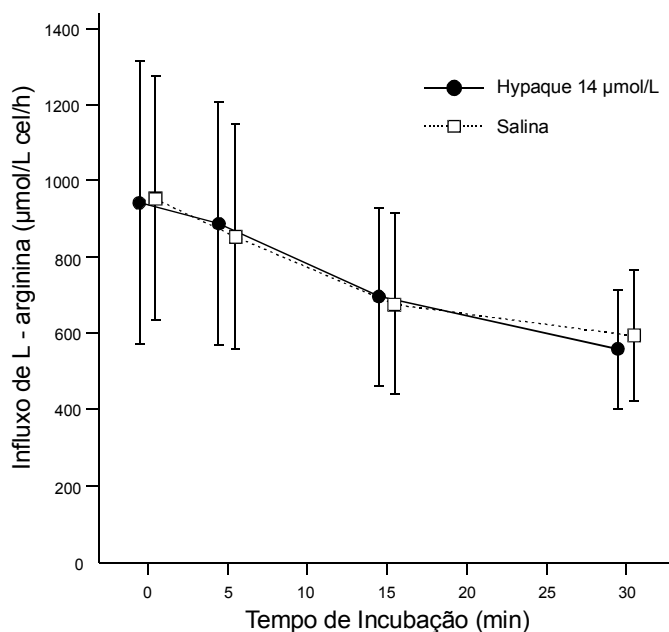


Figura 2 - Influxo eritrocitário em solução 500 µM de L-arginina extracelular após 15 minutos de exposição à salina ou solução 14 µmol/L de Hypaque-M 76®. n=5.

Redução progressiva da captação com o tempo, sem diferença entre grupos.

Análise de variância de medidas repetidas; P=0,996.

Pontos e linhas verticais representam média e desvio padrão.

4.6 Captação de colina em eritrócitos expostos a concentrações crescentes de Hypaque-M 76®

Os ensaios sobre transporte de colina foram executados em 10 indivíduos adultos saudáveis, com idade entre 24 e 50 anos, e média de 29 anos (DP=9), destes, 5 eram mulheres.

A Figura 3 mostra o influxo de colina em eritrócitos em solução 250 µM de colina extracelular. A captação de colina em concentrações diferentes de Hypaque-M 76® só apresentou diferença estatisticamente significativa nos fluxos executados na concentração mais alta (112 µmol/L), quando comparada à incubação em salina (P=0,0001, Análise de variância de medidas repetidas; P=0,01, no teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunnett), e a magnitude do tamanho do efeito foi moderada (HOPKINS, 2002).

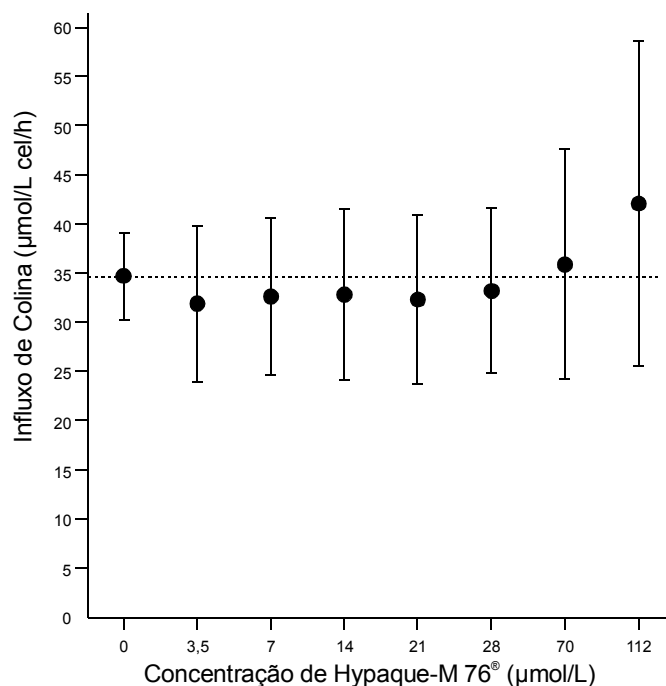


Figura 3 – Influxo eritrocitário em solução 250 µM de colina extracelular, com 15 minutos de exposição a concentrações crescentes de Hypaque-M 76®. n=10.

Captação de colina significativamente maior apenas na concentração 112 µmol/L do radiocontraste comparado ao controle incubado em salina.

Análise de variância de medidas repetidas, P=0,001. Teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunnett, P=0,010).

4.7 Captação de colina em solução com 14 µmol/L de Hypaque-M 76®, em tempo de exposição crescente

O estudo da influência do tempo de exposição dos eritrócitos aos radiocontrastes na captação de colina foi executado em 6 indivíduos e os resultados são apresentados na Figura 4.

Não houve diferença significativa, tanto entre grupos quanto entre diferentes tempos de exposição ao Hypaque-M 76® ou solução salina (P=0,628 e P=0,122, respectivamente; Análise de variância de medidas repetidas).

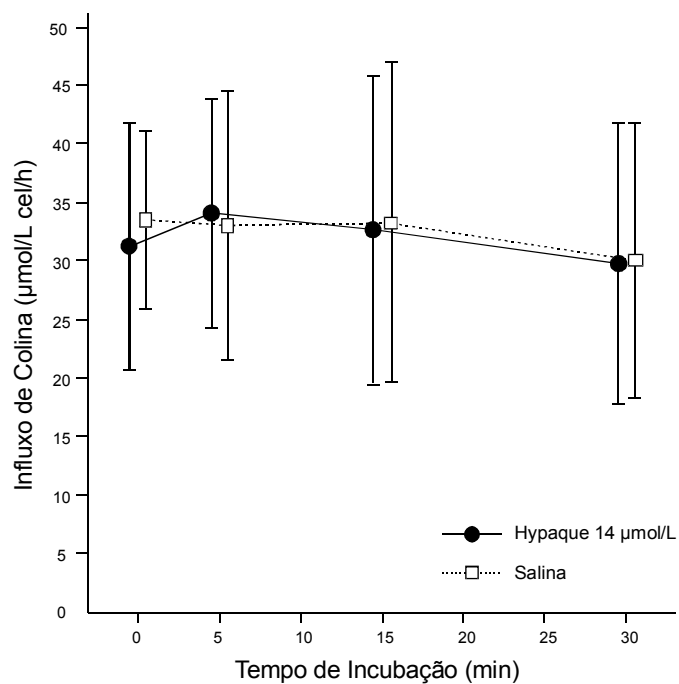


Figura 4 – Influxo eritrocitário em solução 250 µM de colina extracelular após 15 minutos de exposição à salina ou solução 14 µmol/L de Hypaque-M 76®. n=6.

Redução progressiva da captação com o tempo, sem diferença entre grupos e com o tempo.

Análise de variância de medidas repetidas; P=0,628, e P=0,122, respectivamente.

Pontos e linhas verticais representam média e desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

O mecanismo pelo qual a administração intravascular de contrastes provoca lesão renal é ainda incerto, e apenas parcialmente conhecido. Uma das dificuldades é a inexistência de modelos experimentais em animais, dos quais se possam estender os resultados obtidos para a espécie humana (ZIEGLER et al., 1975; BREZIS e CRONIN, 1997; GATZY e MUDGE, 1978). Isto é resultado das grandes diferenças metodológicas separando estes modelos de experimentos em animais, dos utilizados no estudo da insuficiência renal aguda em humanos.

O rim normal, em animais e humanos, é extremamente resistente à ação lesiva dos radiocontrastes, e modelos experimentais sobre a ação destes agentes em animais costumam ser eficazes em desencadear nefropatia induzida pelos radiocontrastes, quando outros mecanismos de agressão renal são associados aos radiocontrastes (CRONIN, 1993; BARRET, 1994; BREZIS e ROSEN, 1995; BURDMAN et al., 1996).

Os estudos em humanos incluem desde levantamentos de dados retrospectivos até ensaios clínicos. Nestes estudos, cada indivíduo pode ter presente múltiplos fatores de risco para insuficiência renal aguda, com intensidade variável, indivíduo a indivíduo, tornando a amostra menos homogênea, e aumentando a chance de erro de interpretação dos resultados. Esta diversidade fica mais significativa na avaliação da nefrotoxicidade clínica dos

radiocontrastes, pois a nefrotoxicidade tem íntima relação com o número de fatores de risco presentes, simultaneamente, na amostra estudada (BREZIS e CRONIN, 1997).

Outro aspecto importante a considerar, ao analisar resultados destes relatos, é que nos estudos clínicos a substância em estudo é administrada em dose terapêutica, ao invés de dosagem tóxica. Além disso, na insuficiência renal aguda induzida pelos radiocontrastes em humanos, a morfologia da lesão existente revela necrose tubular focal, enquanto o modelo de único agente causal em animais evidencia dano cortical extenso, com dano tubular proximal inespecífico, freqüentemente pouco correlacionado com a função renal, pois a dose administrada é tóxica (BREZIS e CRONIN, 1997).

Quanto aos protocolos de pesquisa em fisiopatologia da insuficiência renal aguda com experimentos em animais, duas formas de abordagem são aplicadas, vinculadas ao número de fatores precipitantes de insuficiência renal aguda empregados: o modelo de único fator e o de múltiplos fatores. O de único fator cursa com incidência de insuficiência renal aguda em 100% dos casos, pois a dose administrada é tóxica, e dano cortical extenso com dano tubular proximal inespecífico (LASSER et al., 1995; BREZIS e CRONIN, 1997). Já nos modelos de múltiplos fatores, o dano cortical é substituído por dano mais intenso da medular mais superficial, sugerindo que seu mecanismo possa se relacionar à alteração do balanço de oxigênio intramedular (BREZIS e CRONIN, 1997). É preciso destacar que, experimentalmente, há sinergia notável entre nefrotoxinas e hipoperfusão renal para quase todas as nefropatias tóxicas (BREZIS e CRONIN, 1997; MURPHY et al., 2000). Experimentos em túbulos isolados de coelhos e cães com insuficiência cardíaca, ratos pré-condicionados, ou em outros animais

com isquemia renal, demonstraram que sinergia entre o agente tóxico e a hipóxia são cruciais à ocorrência de nefrotoxicidade pelos contrastes (HUMES et al., 1987; BREZIS e ROSEN, 1995; BREZIS e CRONIN, 1997). Animais saudáveis expostos à infusão de radiocontrastes, em doses de uso clínico, tiveram alterações transitórias mínimas no fluxo sanguíneo renal (FSR), sem haver disfunção renal persistente. Nos estudos em humanos, a disfunção ocorreu com maior frequência quando os indivíduos em estudo apresentavam insuficiência renal crônica prévia, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca congestiva, estenose de artéria renal, situações acompanhadas de isquemia renal de intensidade variável (DERAY, 1999).

Os estudos em humanos proporcionaram, até o momento, a noção de que há a instalação de dois processos principais para que a lesão renal na nefropatia induzida por radiocontrastes se estabeleça: nefrotoxicidade direta e uma sucessão de modificações do tônus vascular intra-renal, levando à isquemia da medular renal (ASPELIN et al., 1987c; NEUMAYER et al., 1989; HALL. et al., 1992; FISCHER e BADR, 1993; MEYRIER, 1994; BARRET,1994; TOMMASO 1994; ZAGORIA, 1994; DERAY e JACOBS, 1995; LOUVEL et al., 1996; BREZIS e CRONIN, 1997; SOLOMON, 1998). A sinergia entre toxicidade celular e hipoperfusão renal dificulta a identificação completa do que está verdadeiramente relacionado à toxicidade do radiocontraste e o que está vinculado à isquemia renal, tanto nos estudos em animais de experimentação, como nos melhores experimentos prospectivos em humanos (WAYBILL e WAYBILL, 2001).

Esta é uma das principais razões que motivaram a realização do presente estudo, relativo ao efeito dos radiocontrastes com grupos controlados, através de

um único agente causal, buscando compor, de modo mais exato, o mosaico da fisiopatologia da toxicidade celular, induzida por estas substâncias.

Como o dano celular pelos radiocontrastes termina sendo mediado por múltiplos mecanismos, alterações da permeabilidade da membrana celular poderiam ter papel destacado. Porém, há poucos trabalhos publicados em que tenham sido feitos estudos sobre a influência dos radiocontrastes sobre os sistemas de transporte de membrana.

Este estudo se constituiu de experimentos em laboratório com amostras-controle, e procurou incrementar o conhecimento sobre a fisiopatologia da nefropatia induzida por radiocontrastes. Para esse objetivo foram observados diferentes sistemas de transporte de membrana eritrocitária, expostos a soluções que continham alguns destes agentes, utilizando métodos de estudo reconhecidos internacionalmente (GARAY e GARRAHAN, 1973; BEAUGÉ e LEW, 1977; FERVENZA et al., 1989a, 1989b, 1990; FERVENZA et al., 1991; POLI DE FIGUEIREDO, 1992; STEWART e FRICKE, 2003). Aspelin et al. (1987a, 1987b, 1987c), observaram modificações estruturais e de função em eritrócitos expostos a radiocontrastes, o que reforça a idéia de que os eritrócitos possam servir como modelo para identificar a influência dos radiocontrastes sobre a membrana celular.

No que se refere ao delineamento do estudo, a utilização de metodologia com experimentos laboratoriais acompanhada de amostras-controle reduziu a influência dos efeitos dos múltiplos fatores em estudo, reduzindo o erro inerente ao experimento.

A utilização de análise de variância de medidas repetidas, empregada em grande parte do estudo, permitiu que os resultados observados fossem definidos

em seu grau de significância com menor tamanho de amostra, por ser um método de análise estatística poderoso (ALTMAN, 1991; MOTULSKY, 1995).

Com relação aos sistemas de transporte estudados, a função da bomba de Na^+/K^+ foi avaliada pela determinação da atividade da bomba de Na^+/K^+ pelo transporte de rubídio através da membrana do eritrócito humano, que se mostrou reduzida em presença de Hypaque M- 76[®] nas concentrações ocorridas durante cateterismo cardíaco. Também se observou menor atividade da bomba em presença de composto de diatrizoatos, em comparação com soluções exclusivas de diatrizoato de sódio ou diatrizoato de meglumina. Com os resultados obtidos permanece um questionamento em relação à redução da atividade, que poderia estar ocorrendo por comprometimento de todas as bombas, ou por disfunção de parte delas. Para avaliar um dos mecanismos de alteração da atividade da bomba de Na^+/K^+ , determinamos também o número de bombas em atividade, quando foi constatado que menor número de bombas de Na^+/K^+ estavam ativas quando os eritrócitos foram expostos a soluções de diatrizoato de sódio. Com o método de estudo empregado originou-se nova abordagem do estudo da toxicidade eritrocitária induzida pelos radiocontrastes, sendo possível que a medida observada indique a modificação da atividade da bomba de Na^+/K^+ , também no túbulo renal.

Já Hypaque-M 76[®], tanto em ensaios com concentrações ou tempos de exposição crescentes, não causou alteração de influxo nos sistemas de transporte de L-arginina e de colina em concentrações equivalentes às aquelas encontradas no cateterismo cardíaco, havendo alteração apenas em concentrações cinco a oito vezes maiores que as encontradas neste tipo de exame no HSL da PUC.

As observações de Ziegler et al. (1975), Aspelin et al. (1987a, 1987b, 1987c) e Bino et al. (2000) sobre alterações no comportamento das membranas celulares frente aos radiocontrastes indicam que disfunção da bomba de Na^+/K^+ pode estar presente, afetando a função celular. Presente na membrana de todas as células animais - responsável pela manutenção da viabilidade da célula - a bomba de Na^+/K^+ é alvo potencial de toxicidade química, e daí provém o interesse pelo estudo de sua função na nefropatia induzida pelos radiocontrastes, de patogenia multifatorial, em que toxicidade celular está incluída (ABRAHAM e KEJLLSTRAND, 1989; RICKWOOD et al., 1989; CRONIN, 1993; ZAGORIA 1994).

Seguindo este raciocínio, levantaram-se outras questões: os radiocontrastes poderiam afetar a função de sistemas de transporte diferentes através de alterações seletivas? Se tal ocorre, como se processa esta alteração? Estas questões ainda não estão totalmente esclarecidas, apesar dos experimentos anteriormente realizados. Tendo em vista que os radiocontrastes têm eliminação renal por filtração glomerular, há grande possibilidade de que a interação de suas moléculas com o epitélio tubular faça parte da fisiopatologia dos radiocontrastes (ABRAHAM e KEJLLSTRAND, 1989; HARDIEK et al., 2001).

A participação do iodo na nefropatia induzida pelos radiocontrastes persiste aspecto gerador de controvérsia (BREZIS e CRONIN, 1997). Do ponto de vista da visualização radiológica propiciada pelos radiocontrastes, atribui-se o grau de definição do exame contrastado diretamente à quantidade de iodo administrado (CAILLÉ e ALLARD, 1988; BREZIS e CRONIN, 1997; THE COMPREHENSIVE..., 2004). Dobrota et al. (1995), detectaram retenção de radiocontrastes pelas células tubulares, em quantidades semelhantes ao do

dextran. É possível que os efeitos dos radiocontrastes sobre a função da membrana possam representar o resultado da presença de iodo na molécula, que poderia estar envolvido com dano à membrana e alterações celulares com formação de vacúolos (CRONIN, 1993). Contudo, a participação do iodo como co-responsável pela nefrotoxicidade não é clara, apesar de as moléculas dos novos radiocontrastes isoosmolares e não-iônicos (potencialmente menos nefrotóxicos) possuírem maior conteúdo de iodo na estrutura.

Ao observar a morfologia celular, a resposta mais comum a estas interações nas células tubulares, em experimentos com animais e em culturas de células, é a presença de vacúolos intracelulares à microscopia de luz e microscopia eletrônica (ANDERSEN e VIK, 1993; ANDERSEN et al., 1994; WALDAY et al., 1995; TERVAHARTIALA et al., 1997). Tervahartiala et al. (1997) constataram que estas alterações de lisosomas e vacuolização em células do túbulo proximal começavam tardiamente ao contato com o agente, dentro de duas horas de administração dos radiocontrastes.

À microscopia eletrônica, Andersen et al. (1994) constataram que o conteúdo deste material é elétron-denso e granular, sugerindo que tenha origem em alterações do citoplasma. Contudo, Burdmann et al. (1996), comentam que a vacuolização não se correlacionava com a existência de perda de função renal, indício de que tem expressão inespecífica.

A toxicidade dos radiocontrastes não pode ser totalmente associada com as características ou propriedades das diversas moléculas de radiocontrastes como osmolaridade, viscosidade ou hidrofilia (BEAUFILS et al., 1995; DOBROTA et al., 1995). Esta constatação confirmou o resultado de estudo em que células tubulares de ratos expostas a iodixanol, -radiocontraste não-iônico e isosmolar-,

não só apresentavam vacuolização, como retiveram iodo (DOBROTA et al., 1995; WALDAY et al., 1995).

Os relatos dos estudos acima indicam que há interação definida entre células tubulares e os radiocontrastes, sendo ainda necessária investigação complementar para melhor compreender e tratar estes efeitos.

A lesão tubular renal parece ser resultado da participação das características específicas dos radiocontrastes, associada a alterações vasculares. Elas dão origem a alterações celulares ligadas a osmolaridade, atividade iônica e/ou conteúdo de iodo, e à deterioração da hemodinâmica renal, (SOLOMON et al., 1994; SOLOMON, 1998). Conforme já exposto, os radiocontrastes induzem resposta hemodinâmica com vasoconstrição prolongada e redução no fluxo sanguíneo renal. Mal perfundido, o rim reduz a filtração glomerular, com retorno gradual aos valores basais, sendo possível que, na presença de isquemia renal grave, os efeitos hemodinâmicos dos radiocontrastes sejam potencializados. Para verificar a veracidade destas hipóteses foram feitos estudos em rins de cães submetidos à isquemia por clampeamento e expostos a radiocontraste. Os contrastes de baixa osmolaridade induziram, marcadamente, menos vasoconstrição e menor redução do fluxo sanguíneo renal durante os períodos de clampeamento, o que pode sugerir que são indicados em pacientes de alto risco (DERAY et al., 1991; DERAY, 1999). Há, também, dados que apóiam a afirmação de que adenosina endógena e a ação do cálcio são essenciais para o efeito dos radiocontrastes no fluxo sanguíneo renal. Em revisão sobre nefropatia induzida por radiocontraste, Deray (1999) sugeriu que em cães a infusão de radiocontrastes hiperosmolares resulta em maior transporte de sódio (documentado também com a infusão de salina hipertônica), com subsequente

geração intra-renal de adenosina e ativação da vasoconstrição cálcio-dependente. Os resultados obtidos em rins isquêmicos, em seu estudo, poderiam explicar porquê a nefropatia induzida por radiocontrastes ocorre principalmente em pacientes com insuficiência renal prévia (DERAY, 1999).

A hipótese de que a nefrotoxicidade induzida por radiocontrastes possa estar vinculada à hiperosmolaridade das soluções de uso mais comum continua sendo outro enfoque do problema. Katzberg et al. (1986) sugerem, em seu estudo em cães com uso de diatrizoatos (iônicos e de alta osmolaridade) e iopamidol (agente não-iônico e de baixa osmolaridade), que o efeito direto dos radiocontrastes poderia relacionar-se, predominantemente, com a hipertonicidade dos agentes testados.

A osmolaridade não é causa isolada da nefrotoxicidade, pois esta ocorre mesmo com o uso dos novos radiocontrastes não-iônicos e de mais baixa osmolaridade (BREZIS e CRONIN, 1997; ZAGER et al., 2003). Entretanto, menor osmolaridade dos radiocontrastes induz menor alteração na resistência vascular, com menor duração e intensidade da vasoconstrição renal, que também é proporcional ao incremento da osmolaridade (DERAY E JACOBS, 1996b). Pelos estudos de Ziegler et al. (1975), foi constatado que diatrizoato e iotalamato de sódio (agentes iônicos e de alta osmolaridade) diminuem a atividade da bomba de Na^+/K^+ , e que este fenômeno se relacionou com maiores concentrações de diatrizoato. Estudos anteriores em cães sugeriram que os radiocontrastes têm efeito natriurético, já que a natriurese observada foi maior que a produzida por carga equimolar de manitol (PORTER et al., 1971). Também no estudo recente de Hardiek et al. (2001), foi demonstrado que manitol, quando equiosmolar ao iopamidol, não causava o mesmo efeito sobre as células tubulares que o

radiocontraste, sugerindo que os radiocontrastes têm efeito tóxico não ligado exclusivamente à osmolaridade. O efeito natriurético e a inibição do transporte de Na^+ pelos radiocontrastes, descritos em outros estudos, sugerem que haja comprometimento do transporte iônico nas células do túbulo renal (PORTER et al., 1971; ZIEGLER et al., 1975; ZIEGLER e OLSEN, 1980; BINO et al., 2000).

Também tem sido objeto de estudo o envolvimento de radicais livres e peroxidação lipídica na fisiopatologia da nefropatia induzida pelos radiocontrastes (PARVEZ et al., 1989; BAKRIS et al., 1990a, 1990b; YOSHIOKA et al., 1992). Parvez et al. (1989), estudaram a indução de peroxidação lipídica em rins de rato e seu impacto na função renal com glicerol, diatrizoatos e iopromide (agente monômero não-iônico). Nos animais em que infundiram solução de diatrizoatos, a creatinina plasmática foi dez vezes maior que a observada com infusão de glicerol, tendo sido identificadas também alterações morfológicas intensas nos túbulos proximais. Já com a infusão de iopromide, a creatinina se elevou menos, sendo cinco vezes mais alta na comparação com glicerol. Contudo, apenas nos animais expostos a ambos os radiocontrastes houve significativo aumento da concentração de marcador da peroxidação, em relação aos controles. Em trabalho recente, estudando segmentos isolados de túbulo proximal de camundongos, ou células de túbulos proximais cultivadas (HK-2), Zager et al. (2003) expuseram estas células a ioversol (agente não-iônico, monômero, de baixa osmolaridade), N-acetilcisteína, outros antioxidantes (glutation, superóxido dismutase e catalase) ou pró-oxidantes (depleção de glutatión e inibição da heme oxigenase). Segundo os autores, os resultados obtidos afastaram a possibilidade da participação de stress oxidativo das células tubulares na fisiopatologia da insuficiência renal aguda induzida por radiocontrastes. Pelos resultados dos

experimentos efetuados, identificaram como possíveis mecanismos de nefrotoxicidade a lesão mitocondrial, liberação de citocromo c e lesão da membrana plasmática. O radiocontraste ioversol nesta observação alterou a integridade mitocondrial, estimada pela redução de ATP e pela liberação de citocromo c. Também induziu dano à membrana plasmática, indicado tanto pela perda de proteínas residentes (bomba de Na^+/K^+ e caveolina), como pelo aumento da suscetibilidade ao ataque da fosfolipase A2. Contudo, não foi evidenciado que a osmolaridade do ioversol (600 mOsm/L) fosse responsável pelos efeitos tóxicos do radiocontraste testado.

Quanto à reversibilidade da disfunção renal, estudo de Hardiek et al. (2001), em túbulos proximais de porcos, indicou que iopamidol não afetava a viabilidade tubular, mas reduzia a proliferação celular e alterava a função mitocondrial. A rápida recuperação observada após a remoção do radiocontraste sugeria que a inibição da função mitocondrial talvez fosse transitória, explicando, em parte, a reversibilidade da toxicidade dos radiocontrastes.

5.1 Comentários sobre os estudos efetuados nesta tese

5.1.1 Análise da atividade da bomba de Na^+/K^+

Houve redução significativa da atividade da bomba de Na^+/K^+ em eritrócitos coletados após 15 minutos da infusão de Hypaque-M 76® no cateterismo cardíaco, quando comparada com a atividade observada em eritrócitos coletados dos pacientes antes do cateterismo e incubados exclusivamente em salina. Já no estudo comparativo da atividade da bomba de Na^+/K^+ entre eritrócitos incubados em salina e em presença de solução exclusiva de diatrizoato de sódio, de diatrizoato meglumina e composto de diatrizoatos, não houve diferença significativa para atividade da bomba, quando comparados os eritrócitos

incubados com solução exclusiva de diatrizoato de sódio e os eritrócitos incubados em solução exclusiva de diatrizoato meglumina.

Entretanto, observou-se redução significativa na atividade da bomba de Na^+/K^+ em presença do composto de diatrizoatos que o produto comercial Hypaque-M 76[®] contém, quando comparada com a observada nos indivíduos-controle. Por este experimento, pode-se identificar que a bomba de Na^+/K^+ sofre redução de sua atividade na presença de Hypaque-M 76[®], na dose que foi administrada. Este achado sugere que diatrizoato de sódio e diatrizoato meglumina, usados de forma isolada, não alteram significativamente a atividade da bomba de Na^+/K^+ pelo método empregado - evento que necessita confirmação em estudos com maior tamanho de amostra, e talvez com maior tempo de incubação dos eritrócitos com os radiocontrastes.

Os resultados indicam que a utilização de composto de diatrizoatos não reduz a ação tóxica dos radiocontrastes sobre a bomba de Na^+/K^+ , e talvez possa desencadear efeito sinérgico danoso, pela associação entre diatrizoato de sódio e de meglumina sobre a bomba de Na^+/K^+ , nas concentrações existentes no composto. Se a alteração de atividade da bomba de Na^+/K^+ tivesse relação exclusiva com a concentração de radiocontrastes em solução, seria lógico esperar menor atividade da bomba em presença das soluções contendo exclusivamente os radiocontrastes diatrizoato de sódio e diatrizoato meglumina, já que, nas condições do estudo, continha maior concentração de cada um dos radiocontrastes, separadamente, nestas soluções.

É relevante citar que os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os resultados obtidos em trabalho de Humes et al. (1987), que observaram efeito tóxico moderado do diatrizoato de meglumina sobre células do

epitélio tubular de coelhos. Contudo, quando em associação com diatrizoato de sódio, diatrizoato de meglumina, teve aumento da sua toxicidade sobre as células tubulares (HUMES et al., 1987).

No que se refere a modificações nas propriedades do sangue quando do uso de Hypaque-M 76[®] nas quantidades usadas em cateterismo cardíaco, o hematócrito e a concentração de hemoglobina podem cair entre 10 a 15%, e a osmolaridade plasmática pode subir 10 a 12%. Estas alterações iniciam imediatamente após a injeção, atingem o máximo em 2 a 5 minutos, e o retorno ao normal acontece após 10 a 15 minutos (THE COMPREHENSIVE..., 2004). Tais alterações poderiam redundar em dano celular por hipóxia e pelo aumento transitório da osmolaridade, capaz de provocar redução da deformabilidade dos eritrócitos, impedindo sua livre passagem pela microcirculação, conforme observado por Aspelin et al. (1987c).

Quanto à dose de Hypaque-M 76[®], administrada nos cateterismos cardíacos deste estudo, que foi de 70 mL, é importante salientar que a dose se aproxima da metade da dose de radiocontraste usada para cateterismo cardíaco diagnóstico, comparando com a citada por Taliércio et al. (1991), que variava entre 134 a 144 mL, ou com dados fornecidos pela Society for Cardiac Angiography and Interventions Registry, que atingia 130 mL (TOMMASO, 1994).

Contudo, mesmo que a dose utilizada nos cateterismos cardíacos no HSL da PUC tenha sido menor, foi possível observar inibição da atividade da bomba de Na⁺/K⁺, possivelmente por efeito do composto de diatrizoatos. Estes dados confirmam que persiste indefinida a dose segura de radiocontrastes administrados por via intravascular, para que não se observe toxicidade destes radiocontrastes. No que se vincula ao conceito de baixa dose de radiocontrastes,

encontram-se múltiplos enunciados, entre os quais: menos de 70 mL, menos de 125 mL, ou menos de 5 mL/kg (para um máximo de 300 mL), divididos pela concentração de creatinina plasmática. Alguns estudos demonstraram correlação significativa entre volume de radiocontraste administrado, enquanto outros não (RUDNICK et al., 1997). Entretanto, pacientes diabéticos com creatinina plasmática acima de 5 mg/dL podem estar em risco de apresentarem nefropatia induzida por radiocontrastes com a infusão de apenas 20 a 30 mL (MANSKE et al., 1990). Em outros estudos, pacientes com creatinina prévia ao exame maior que 2,0 mg/dL, que receberam menos que 125 mL de contraste, tinham risco de insuficiência renal aguda pelos radiocontrastes de 2%, enquanto que naqueles que receberam dose acima de 125 mL, a incidência era 19% (TALIERCIO et al., 1991; TOMMASO, 1994). De modo semelhante, o conceito de alta dose de contraste é muito amplo. Rosovsky et al. (1996), em trabalho retrospectivo, citam que o conceito de dose alta de radiocontraste variou entre 250 e 800 mL, sem representar risco de nefrotoxicidade, avaliada pela dosagem de creatinina após infusão de radiocontrastes em 255 pacientes que tinham creatinina abaixo de 1,6 mg/dL antes do exame.

Em que pese o presente estudo não ter o objetivo de estudar a quimiotoxicidade específica de cada radiocontraste, nossa expectativa era de que o uso de associações de radiocontrastes iônicos como Hypaque-M 76® (diatrizoato de sódio e diatrizoato de meglumina em concentrações menores na solução exclusiva de cada um) diminuísse a chance de haver alteração da atividade da bomba de Na^+/K^+ dos eritrócitos, por restringir a concentração de cada um dos fármacos em solução. Isto não se confirmou em nosso estudo, indicando a necessidade de ampliação de estudos de laboratório quanto a este

aspecto. O que se observou foi que a atividade da bomba de Na^+/K^+ eritrocitária permaneceu inalterada em soluções exclusivas de diatrizoato de sódio e diatrizoato meglumina, o que, à primeira vista, parece representar um fenômeno paradoxal.

5.1.2 Estudo do número de bombas de Na^+/K^+ em atividade

Dando seqüência ao estudo, analisou-se o número de bombas ativas por eritrócito. O objetivo era testar a hipótese de que a redução da atividade da bomba de Na^+/K^+ , com conseqüente alteração da permeabilidade da membrana celular e perda da homeostase, constatada nos experimentos anteriormente descritos, poderia estar relacionada à redução do número de bombas em atividade (ZIEGLER et al., 1975; BINO et al., 2000). A determinação do número de bombas de Na^+/K^+ em atividade em eritrócitos humanos expostos a diatrizoato de sódio indicou que existe redução da atividade da bomba de Na^+/K^+ pela redução do número de bombas ativas, em relação ao grupo controle. Esta constatação indicou que o efeito deste radiocontraste atinge, com mais intensidade, parte das bombas Na^+/K^+ , inativando-as nas condições testadas. Este fenômeno se contrapõe aos resultados observados no estudo de atividade da bomba de Na^+/K^+ e merece reflexão. A resposta talvez esteja no tempo de exposição dos eritrócitos ao diatrizoato de sódio, que poderia ser insuficiente para mostrar a redução da atividade da bomba. Tervahartiala et al. (1997), em seu estudo, observaram que a vacuolização de células tubulares nos experimentos em animais ocorria duas horas após a exposição aos radiocontrastes. Analisando tanto a atividade como o número de bombas ativas, nossos resultados sugerem a existência de possível efeito dos radiocontrastes sobre a bomba Na^+/K^+ . Bino et al. (2000), sugeriram que a inibição do transporte iônico tubular através da bomba

de Na^+/K^+ poderia representar importante mecanismo citotóxico envolvido na fisiopatologia da nefropatia por radiocontrastes. Nosso estudo, usando eritrócitos como modelo celular, está em acordo com aquele estudo.

5.1.3 Captação de L-arginina e colina em presença de radiocontrastes

Toxinas urêmicas e radiocontrastes estão associados tanto com redução da atividade como com número de bombas Na^+/K^+ em eritrócitos (FERVENZA, 1990; FERVENZA et al., 1994). Contudo, seus efeitos em outros sistemas de transporte parecem ser diferentes. O efeito do Hypaque M-76[®] nos fluxos de L-arginina e colina eritrocitários não foi relevante, e presente apenas nas mais altas concentrações de radiocontrastes testadas no estudo. O efeito da insuficiência renal crônica com aumento na captação de colina em eritrócitos é um dos resultados mais impressionantes (FERVENZA et al., 1991), oposto ao observado com Hypaque-M 76[®] neste estudo, em que a captação de colina esteve inalterada.

Em torno do envolvimento da via L-arginina-ON na fisiopatologia da nefropatia induzida pelos radiocontrastes, evidências crescentes têm demonstrado participação do óxido nítrico (BOBADILLA et al., 1994; SCHRAMM et al., 1994; YU et al., 1994; TOME et al., 1999). Também foram demonstrados tanto efeitos benéficos como prejudiciais de L-arginina em isquemia renal (LIEBERTHAL et al., 1989; BHARDWAJ e MOORE., 1989; BOBADILLA et al., 1994; SCHRAMM et al., 1994; TOME et al., 1999). Alteração do metabolismo de L-arginina, aminoácido precursor do óxido nítrico, e da sua captação através da membrana celular, poderiam ser origem da participação do ON na nefropatia induzida pelos radiocontrastes. Porém, os estudos até agora publicados apresentam resultados controversos, justificando a necessidade de

complementação das análises até aqui efetuadas. Já foi demonstrado, anteriormente, que a infusão de L-arginina protege o parênquima renal da vasoconstrição renal induzida pelos radiocontrastes em ratos hipercolesterolêmicos, (ANDRADE et al., 1998; CAMPOS et al., 1999). Também foi demonstrado efeito benéfico de uma única infusão de L-arginina em ratos expostos a radiocontrastes (SCHWARTZ et al., 1994). Em ratos, a intervenção sobre o sistema metabólico do ON, que parece participar da regulação do fluxo sanguíneo da medular renal e do balanço de oxigênio, permitiu a modulação das alterações patológicas e funcionais induzidas pelos radiocontrastes (DERAY, 1999). Estes achados fortalecem a importância da participação da hipóxia como causa da lesão tubular induzida pelos radiocontrastes (DERAY et al., 1991).

Foi demonstrado que diatrizoato meglumina e iohexol (agente não-iônico e de baixa osmolaridade) podem induzir ou aumentar vasoconstrição, em parte por causar alterações seletivas na sensibilidade arterial à endotelina e ao ON em rins de ratos (MURPHY et al., 1998). Em cães, os radiocontrastes induziram redução significativa no fluxo sanguíneo renal e na filtração glomerular, e aumento significativo na excreção urinária de endotelina (BAGNIS et al., 1997). Também se constatou que L-arginina atenua o efeito do L-NAME na redução da filtração glomerular induzida pelos radiocontrastes. Este achado sustenta a hipótese de que a vasoconstrição intra-renal, induzida pelos radiocontrastes, possa envolver desequilíbrio de agentes vasoativos do endotélio, como ON e endotelina. Foi sugerido que ON cumpre papel fundamental na insuficiência renal radiocontrastes-induzida, em estudo que demonstrou que L-arginina atenuou a redução do monofosfato cíclico de guanosina 3'-5' urinário e a excreção de nitritos e nitratos, induzidas pela administração de material de radiocontraste em ratos

(SCHWARTZ et al., 1994). O efeito protetor da L-arginina poderia estar associado com efeitos inespecíficos do aminoácido na circulação renal, via fluxo sanguíneo renal aumentado, e não necessariamente por efeitos na rota L-arginina/óxido nítrico. Pelos estudos anteriores se identifica que a participação do ON na nefropatia induzida pelos radiocontrastes ainda é de difícil interpretação. Agmon et al. (1994) demonstraram que ON possui papel protetor na resposta renal aos radiocontrastes. Yu et al. (1994), detectaram alteração oposta, ao observarem que o ON pode ser prejudicial por seu efeito citotóxico direto em células tubulares de ratos e/ou sua reação com superóxidos, gerando o oxidante peroxinitrito. No momento, o que se pode inferir é que ON parece tomar parte com efeitos opostos, sendo benéfico, provavelmente melhorando a hemodinâmica renal, e prejudicial, por seu efeito citotóxico. Porém, mesmo que as alterações provocadas pela nefropatia induzida pelos radiocontrastes possam ser mediadas por mecanismos múltiplos, as alterações na permeabilidade da membrana celular poderiam ter papel importante na fisiopatologia. Contudo, os resultados do estudo com influxo de L-arginina nesta tese não sugerem que tal efeito seja mediado por alteração do influxo celular de L-arginina, já que os radiocontrastes não alteraram a captação de L-arginina, exceto em concentrações muito altas de Hypaque M-76®.

5.1.4 Seletividade do efeito dos radiocontrastes

O estudo sobre o transporte de membrana por transporte ativo em presença de radiocontrastes mostrou haver menor atividade da bomba de Na^+/K^+ , o que se correlaciona com observações advindas de outros estudos. Gomes et al. (1985), observaram que pacientes em uso de digitálicos foram mais suscetíveis à manifestação da nefropatia induzida por radiocontrastes, fato que poderia ser

explicado pela existência de efeito sinérgico de dois inibidores diferentes na atividade da bomba de Na^+/K^+ tubular: digitálicos e radiocontrastes.

Neste aspecto, nossos dados podem sugerir que tal efeito possa estar ligado ao número reduzido de bombas ativas, tornando o transtorno do transporte ativo de Na^+/K^+ evento importante na fisiopatologia da nefropatia por radiocontrastes. Nesta linha de pensamento também são significativos os trabalhos de Miyazawa et al. (1989) e Hayakawa e Shimizu (1996). Miyazawa et al. (1989), em seu estudo, verificaram que a infusão de sangue contendo diatrizoato aumentou os níveis de sódio e reduziu os de potássio, no cérebro de ratos. Já Hayakawa e Shimizu (1996) verificaram, em coelhos, que os radiocontrastes aumentam os níveis plasmáticos de potássio, tendo sido demonstrado que tal efeito está ligado à alteração da permeabilidade do eritrócito.

Na presente tese, o estudo do transporte de membrana por difusão facilitada só detectou diferença estatisticamente significativa no transporte de L-arginina e colina em concentrações extracelulares muito altas do composto de diatrizoatos Hypaque M-76[®], pelo menos cinco vezes maior que a concentração empregada durante os cateterismos cardíacos no Hospital São Lucas da PUC. Tal efeito poderia relacionar-se à influência dos radiocontrastes sobre propriedades estruturais da membrana celular. Aspelin et al. (1987b, 1987c) demonstraram que as mudanças na morfologia do eritrócito são dose-dependentes, indicando correlação entre concentração sanguínea de radiocontrastes e o grau crescente de formação de eritrócitos deformados como equinócitos.

No que se refere ao estudo da influência dos radiocontrastes sobre o transporte de colina foi evidenciado que o transporte de colina se modifica ao alterarem-se algumas propriedades da membrana (KIRK et al., 1992). Estudos de outros sistemas de transporte reforçam a idéia de que as alterações são seletivas. Foi demonstrado recentemente, em túbulos proximais isolados de rins de Killifishes, que os radiocontrastes diminuem o transporte mediado pela proteína de resistência a multidrogas 2 (Mrp2), por causar liberação de endotelina e sinalizar, pela proteína quinase-C, um receptor ET_B (MASEREEUW et al., 2000; TERLOUW et al., 2001; TERLOUW et al., 2002). É de interesse citar que a fosforilação da bomba Na^+/K^+ pela proteína quinase-C, dependente do AMP-cíclico ou proteína quinase C, inibe a atividade da bomba (BERTORELLO et al., 1991). O efeito dos radiocontrastes sobre a função da membrana do eritrócito parece ser seletivo, já que não pudemos demonstrar modificação significativa no transporte de L-arginina e colina em eritrócitos expostos a uma combinação de diatrizoatos de sódio e meglumina.

As observações do presente estudo, em conjunto, parecem apontar para os mesmos aspectos: a atividade da bomba Na^+/K^+ diminuiu com a exposição ao composto de diatrizoatos, sem haver alteração significativa no transporte de L-arginina e colina, em concentrações empregadas usualmente na prática clínica. Isto reforça a idéia de que, no futuro, possa ser ampliada a análise do efeito dos radiocontrastes sobre a membrana celular. Poderíamos complementar o estudo das alterações ligadas à atividade da bomba de Na^+/K^+ realizando estudos sobre transporte de membrana na presença de radiocontrastes não-iônicos e de osmolaridade mais baixa, supostamente menos associados à toxicidade celular, variando tanto as concentrações utilizadas como os períodos de incubação, que

não foram realizados nesta tese. Também poderíamos focar a resposta da bomba de Na^+/K^+ eritrocitária em relação ao tempo de contato com os radiocontrastes, em eritrócitos de pacientes submetidos a cateterismo, bem como em relação à exposição dos eritrócitos a diferentes concentrações de radiocontraste, antes de os pacientes serem submetidos a cateterismo. Com tal avaliação poderíamos identificar, também, a existência de fatores plasmáticos envolvidos na alteração da função de transporte da membrana eritrocitária. A continuidade nesta linha de pesquisa, acompanhando pacientes expostos a radiocontrastes, talvez possa fornecer maiores informações a respeito de como se comportam aqueles que irão desenvolver a insuficiência renal aguda induzida pelos radiocontrastes.

Como qualquer trabalho em laboratório, este estudo tem relevância limitada aos aspectos observados: busca da existência de alteração da função da membrana em sistemas de transporte selecionados, e não têm aplicação clínica imediata. No entanto, a observação dos resultados indica que os radiocontrastes alteram a função da membrana celular dos eritrócitos, possivelmente através da inibição da função de determinados sistemas de transporte de membrana, o que pode ser importante na fisiopatologia da insuficiência renal aguda induzida pelos radiocontrastes.

Em conclusão, alguns sistemas de transporte na membrana dos eritrócitos de pacientes expostos aos radiocontrastes testados apresentaram modificações interessantes. Dentre elas chama a atenção a redução do número de bombas em atividade, que não tinha sido relatada previamente. O estudo do transporte de membrana em eritrócitos realizado nesta tese representa um pequeno passo na compreensão da fisiopatologia multifatorial da toxicidade por radiocontrastes.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo, realizado em eritrócitos de indivíduos adultos, permite as seguintes observações:

- A atividade da bomba de Na^+/K^+ após o cateterismo cardíaco com injeção de Hypaque-M 76[®] esteve diminuída, quando comparada à atividade antes do exame.
- A atividade da bomba de Na^+/K^+ diminuiu na presença de composto de diatrizoato de sódio e diatrizoato de meglumina (CD), e permaneceu inalterada na presença de diatrizoato de sódio (DS) ou de diatrizoato de meglumina (DM).
- O número de bombas de Na^+/K^+ em atividade na membrana eritrocitária, em presença de diatrizoato de sódio, diminuiu.
- Não ocorreu alteração significativa no transporte de L-arginina e de colina com a exposição à Hypaque M-76[®].

Este estudo indica que os radiocontrastes alteram a função da membrana celular de eritrócitos, afetando determinados sistemas de transporte, sugerindo que esta possa ser um dos mecanismos de sua toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, P.A. e KEJLLSTRAND, C.M. *Contrast media nephropathy*. In: MASSRY, S.G. e GLASSOCK, R. *Textbook of Nephrology*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. p. 851-859.

AGMON, Y. et al. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest*, New York, v. 94, n. 3, p. 1069-1075, Sept. 1994.

ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing Inc, 1994. 1408 p.

ALLEN, P.D. et al. Na,K ATPase expression in normal and failing human left ventricle. *Basic Res Cardiol*, Suppl. 1. Darmstadt, v. 87, p. 87-94, 1992.

ALTMAN, D.G. *Practical statistics for medical research*, Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 1991. 611 p.

ALVESTRAND, A. et al. Intracellular amino acids in uremia. *Kidney Int Suppl*, Cambridge, Ma, p. S9-16, Dec. 1983.

ANDERSEN, K.J. e VIK, H. Use of renal epithelial cells lines for testing cellular toxicity. *Contrib Nephrol*, Basel, v. 101, p. 227-234, 1993.

ANDERSEN, K.J. et al. Effects of iodinated X-ray contrast media on renal epithelial cells in culture. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 29, n. 11, p. 955-962, Nov. 1994.

ANDRADE, L. et al. Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: protective role of L-arginine. *Kidney Int*, Cambridge, Ma. v. 53, n. 6, p. 1736-1742, June 1998.

ARON, N.B. et al. Acute renal failure associated with ioxaglate, a low-osmolality radiocontrast agent. *Am J Kidney Dis*, New York, v. 13, n. 3, p. 189-193, 1989.

ASKARI, A. Uptake of some quaternary ammonium ions by human erythrocytes. *J Gen Physiol*, New York, v. 49, p. 1147-1160, 1966.

ASPELIN, P. et al. Effect of four non ionic contrast media on red cells in vitro. I. Morphology. *Acta Radiol Suppl*, Copenhagen, 370, p. 79-83, 1987a.

ASPELIN, P. et al. Effect of four non ionic contrast media on red cells in vitro. II. Aggregation. *Acta Radiol Suppl*, Copenhagen, 370, p. 85-87, 1987b.

ASPELIN, P. et al. Effect of four non ionic contrast media on red cells in vitro. III. Deformability. *Acta Radiol Suppl*, Copenhagen, I 370, p. 89-91, 1987c.

AVIV, A. e LASKER, N. Defects in membrane transport of ions as possible pathogenic factors in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 68-72, 1992.

BAGNIS, C. et al. Role of endothelium-derived nitric oxide-endothelin balance in contrast medium-induced acute renal vasoconstriction in dogs. *Acad Radiol*, Reston, Va., v. 4, n. 5, p. 343-348, 1997.

BAKRIS, G.L. et al. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: A role of free radicals. *A J Physiol*, Washington, v. 258, p. F115-120, Jan. 1990a.

BAKRIS, G.L. et al. Oxygen free radical involvement in urinary Tamm-Horsfall protein excretion after intrarenal injection of contrast medium. *Radiology*, Easton Pa, v.175, n. 1 p. 57-60, Apr. 1990b.

BARRET, B. Contrast nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*, Baltimore, v. 5, n. 2, p. 125-137, 1994.

BARRET, B. e PARFREY, P.S. Prevention of nephrotoxicity induced by radiocontrast agents. *N Engl J Med*, Boston, v. 331, n. 21, p. 1449-1450, Nov. 1994.

BEAUFILS, H. et al. Iobitridol, a new nonionic low-osmolality contrast agent and iohexol. Impact on renal histology in the rat. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 33-39, Jan. 1995.

BEAUGÉ, L. e LEW, V. L. *Passive fluxes of sodium and potassium across red cell membranes*. In: ELLORY, C. e LEW, V. *Membrane transport in red cells*, London: Academic Press, 1977. p. 39-51.

BERGSTROM, J et al. Muscle intracellular electrolytes in patients with chronic uremia. *Kidney Int Suppl*, New York, v. 16, p. S153-160. Dec. 1983.

BERTORELLO, A.M. et al. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺-K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci*, Washington, v. 88, n. 4, p. 11359-11362, 1991.

BETTMANN, M. Guidelines for use of low-osmolality contrast agents. *Radiology*, Easton Pa, v. 172, n. 3, pt. 2, 901-903, Sept. 1989.

BHARDWAJ, R. e MOORE, P.K. The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol*, London, v. 97, n. 3, p. 739-744, July 1989.

BINO, F.G. et al. *The effect of nonionic radiocontrast media on the activity of purified human kidney Na,K⁺ ATPase*. In: TANIGUCHI, K. e KAYA, S. *Proceedings of the 9th International Conference on the Na/K-ATPase and related ATPases*. Amsterdam, Elsevier, 2000. p. 413-416.

BOBADILLA, N.A. et al. Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int*, New York, v. 46, n. 3, p. 773-779, Sept. 1994.

BÖHME, M. et al. ATP dependent export pumps and their inhibition by cyclosporins. *Adv Enzyme Regul*, Oxford, v. 34, p. 371-380, 1994.

BORCA, M. et al. Changes in cellular ion transport and arterial pressure in renal transplant patients using cyclosporin. *Minerva Urol Nefrol*, Torino, v. 44, n. 2, p. 139-142, Apr. 1992.

BREZIS, M. et al. Experimental nephrotoxicity of the radiocontrast agents iohexol, ioxiglate, Na iothalamate - An in vitro and in vivo study. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 325-331, Apr. 1991a.

BREZIS, M. et al. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest*, New Haven, v. 88, n. 2, p. 390-395, Aug. 1991b.

BREZIS, M. e ROSEN, S. Mechanisms of Disease: Hypoxia of the renal medulla -- its implications for disease. *N Engl J Med*, Boston, v. 332, n. 10. p. 647-655, Mar. 1995.

BREZIS, M. e CRONIN, R. *Radiocontrast media-induced acute renal failure*. In: SCHRIER, R. e GOTTSCHALK, C. *Diseases of the Kidney*, 6th ed. Boston: Little, Brown, 1997, p. 1189-1202.

BRILLET, G. et al. Renal tolerance of AMI 25. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 26, n. 10, p. 879-881, 1991.

BURDMANN, E. et al. *Nefropatia tóxica e túbulo-intersticial*, In: RIELLA, M. *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 325-349.

BURZYNSKI, S. Bound amino acids in serum of patients with chronic renal insufficiency. *Clin Chim Acta*, Amsterdam, v. 25 n. 2, p. 231-237, Aug. 1969.

CAILLÉ, J.M. e ALLARD, M. Neurotoxicity of hidrosoluble iodine contrast media. *Invest Radiol, Suppl. 1*, Philadelphia, v. 23, p. S210-212, Sept. 1988.

CAMPBELL, D.R. et al. A comparative study of the nephrotoxicity of iohexol, iopamidol and ioxiglate in peripheral angiography. *Can Assoc Radiol J*, Montreal, v. 41, n. 3, p. 133-137, June 1990.

CAMPOS, S.B. et al. Protective effect of L-arginine on hypercholesterolemia-enhanced renal ischemic injury. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 327-334, Apr. 1999.

CANESSA, C.M. et al. Mutation of a cysteine in the first transmembrane segment of Na,K-ATPase alpha subunit confers ouabain resistance. *EMBO J*, Oxford, v. 11, n. 5, p. 1681-1687, 1992.

CAVIERES, J. D. *The sodium pump in human red cells*. In: ELLORY, C e LEW, L.L. *Membrane Transport in Red Cells*, London: Academic Press, 1977. p.1-37.

CHATTERJEE, S. Gentamicin-induced alterations in phospholipid metabolism in cultured human proximal tubular cells. *J Biochem Toxicol*, Deerfield Beach, Fla., v. 2, p. 181-201, Fall-Winter, 1987.

CHROBAK, J.J. et al. Hemicholinium-3 prevents the working memory impairments and the cholinergic hypofunction induced by ethylcholine aziridinium ion (AF64A). *Brain Res*, Amsterdam, v. 504, n. 2, p. 269-275, Dec. 1989.

CRONIN, R. *Radiocontrast media-induced acute renal failure*. In: SCHRIER, R. e GOTTSCHALK, C. *Diseases of the Kidney*, 5th ed. Boston: Little Brown, 1993. p. 1187-1201.

CRONIN, R. e HEINRICH, W. *Toxic nephropathy*. In: BRENNER, B. *The Kidney*, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 1680-1711.

DAVIES, P. e RICHARDSON, R.E. A randomized long-term study of acute and delayed reactions to a non-ionic and an ionic medium. *Invest Radiol Suppl* 1, Philadelphia, v. 23, p. S 209, 1988.

DE FRANCESCHI, L. et al. Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport. *J Clin Invest*, New York, v. 99, n. 2, p. 220-227, Jan. 1997.

DERAY, G et al. A role for adenosine calcium and ischemia in radiocontrast-induced intrarenal vasoconstriction. *Am J Nephrol*; Basel, v. 10, n. 4, p. 316-322, 1990.

DERAY, G et al. Renal vasoconstriction after low and high osmolar contrast agents in ischemic and nonischemic canine kidney. *Clin Nephrol*, München-Deisenhofen, v. 36, n. 2, p. 93-96, Aug. 1991.

DERAY, G e JACOBS, C. *Contrast Media Nephropathy*. In: MASSRY, G. e GLASSOCK, R. *Textbook of Nephrology*, 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 974-981.

DERAY, G. e JACOBS, C. Renal tolerance of nonionic dimers. *Invest Radiol*, v 31, n. 6, p. 372-377, June 1996a.

DERAY, G e JACOBS, C. Are low osmolality contrast media less nephrotoxic? *Nephrol Dial Transplant*, Oxford, v. 11, n. 6, p. 930-931, June 1996b.

DERAY, G. Festschrift for Professor Claude Jacobs. Nephrotoxicity of contrast media. *Nephrol Dial Transplant*, Berlin, v. 14 n. 11, p. 2602-2606, Nov. 1999.

DEVES, R. e KRUPKA, R.M. The binding and translocation steps in transport as related to substrate structure. A study of the choline carrier of erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v. 557 n. 2 p. 469-485, Nov. 1979.

DEVES, R. e KRUPKA, R.M. Apparent noncompetitive inhibition of choline transport in erythrocytes by inhibitors bound at the substrate site. *J Membr Biol*, New York, v. 74 n. 3, p.183-189, 1983.

DEVES, R. e KRUPKA, R.M. Inhibition of choline transport in erythrocytes by n-alkanols. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v.1030, n. 1, p. 32-40, Nov. 1990.

DOBROTA, M. et al. Biochemical and morphological effects of contrast media on the kidney. *Acta Radiol Suppl*, Stockholm, v. 399, p. 196-203, 1995.

DORIS, P. Regulation of Na-K ATPase by endogenous ouabain like materials. *Proc Soc Exp Biol Med*, Baltimore, v. 205, n. 3, p. 202-212, Mar. 1994.

EICK, R.G. e POLI DE FIGUEIREDO, C.E. Transporte de membrana celular. *Acta Med*, Porto Alegre, p.427-435, 1994.

ERLEY, C.M. et al. Prevention of radiocontrast-induced nephropathy by adenosine antagonists in rats with chronic nitric oxide deficiency. *J Am Soc Nephrol*, Baltimore, v. 8, n. 7, p. 1125-1132, July 1997.

FERGUSON S.S. et al. Regulation of rat-brain synaptosomal [H-3] hemicholinium-3 binding and [H-3] choline transport sites following exposure to choline mustard aziridinium ion. *J Neurochem*, London, v. 63, n. 4, p. 1328-1337, Oct. 1994.

FERVENZA, F.C. et al. Increased lysine transport capacity in erythrocytes from patients with chronic renal failure. *Clin Sci*, London, v. 76, n. 4, p. 419-422, Apr. 1989a.

FERVENZA, F.C. et al. Effects of dialysis and transplantation on red cell Na pump function in renal failure. *Nephron*, Basel, v. 53, n. 2, p. 121-128, 1989b.

FERVENZA, F.C. et al. A study of the membrane transport of aminoacids in erythrocytes from patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, Berlin, v. 5, p. 594-599, 1990.

FERVENZA, F. C. *Membrane transport abnormalities in patients with renal failure*. Oxford. D.Phil. Thesis. Oxford University, 1990, 216 p.

FERVENZA, F.C. et al. Abnormal erythrocyte choline transport in patients with chronic renal failure. *Clin Sci*, London, v. 80, n. 2, p 137-141, Feb. 1991.

FERVENZA, F.C. et al. Redução do número de bombas de Na⁺/ K⁺ em eritrócitos com diatrizoato de sódio. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEFROLOGIA, 1994, Fortaleza. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Nefrologia*, 1994.

FILLASTRE, J.P. Drug nephrotoxicity: mechanism of action. *Ann Biol Clin*, Paris, v. 47, n. 2, p. 91-97, 1989.

FISCHER, D e BADR, K. *Renal circulatory and nephron function in experimental acute renal failure*. In: LAZARUS, J. M e BRENNER, B. *Acute renal failure*, 3rd ed. New York: Churchill-Livingstone, 1993, p. 53-67.

FRIMPTER, G. et al. Conjugated amino acids in plasma of patients with uremia. *J Clin Invest*. v. 40, p 1208-1216, July 1961.

FURST, P. et al. Effects of nutrition and catabolic stress on intracellular amino acid pools in uremia. *Am J Clin Nutr*, Bethesda, Md v. 33, n. 7, p. 1387-1395, July 1980.

GARAY, R.P. e GARRAHAN, P.J. The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells. *J Physiol*, Cambridge, Ma., v. 231,p. 297-325, 1973.

GATZY, J. e MUDGE, G. The effect of diatrizoate salts on vasopressin-induced volume flow across the excised toad urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther*, Baltimore, v. 204, n. 2, p. 469-480, Feb. 1978.

GAULT, M.H. et al. Heparin, fatty acids and sodium, potassium-ATPase inhibition by plasma factors during hemodialysis. *Nephron*, Basel, v. 60, n. 3, p. 292-301, 1992.

GOLDFARB, S. et al. Low osmolality contrast media and the risk of contrast-associated nephrotoxicity. *Invest Radiol Suppl* 5, Philadelphia, v. 28, p. S 7-10, discussion S11-12, Nov. 1993.

GOMES, A. et al. Acute renal dysfunction after major arteriography. *Am J Roentgenol*, Baltimore, v. 145, n. 12, p. 1249-1253, Dec. 1985.

GUARENA, C. et al. Abnormal erythrocyte sodium transport in patients with polycystic kidney disease and hypertension. *Arch Mal Coeur*, Paris, v. 86, n. 8, p. 1241-1243, 1993.

GYLYS, K.H. et al. Characterization of the irreversible inhibition of high-affinity choline transport produced by hemicholinium mustard. *J Neurochem*, London, v. 59, n. 4, p. 1302-1308, Oct. 1992.

HALL, K.A. et al. Contrast-induced nephrotoxicity: the effects of vasodilator therapy. *J Surg Res*, New York, v. 53, n. 4, p. 317-320, Oct. 1992.

HARDEMAN, M.R. et al. The effect of low osmolar ionic and non-ionic contrast media on human blood viscosity, erythrocyte morphology, and aggregation behaviour. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 26, p. 810-819, 1991.

HARDIEK, K. et al. Proximal tubule cell response to radiographic contrast media *Am J Physiol*, Renal Physiol, Washington, v. 280, p. F61-F70, 2001.

HARNISH, P. et al. Intravascular contrast media and the blood brain barrier. Testing the new non-ionic agent ioxilan. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 34-36, 1989.

HARRIS, K. et al. Nephrotoxicity from contrast material in renal insufficiency: ionic versus non-ionic agents. *Radiology*, Easton Pa, v. 179, n. 6, p. 849-852, 1991.

HAYAKAWA, K. e SHIMIZU, Y. Do iodinated contrast media increase serum potassium levels? *Radiology*, Easton Pa, v. 200, n. 2, p. 407-411, 1996.

HENDRY, B. *Membrane Physiology and Cell Excitation*, London, Croom Helm Ltd, 1981. 159 p.

HEYMAN S.N. et al. Pathophysiology of radiocontrast nephropathy: a role for medullary hypoxia. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 34, n. 11, p. 685-691, Nov. 1999.

HOPKINS, W.G. Scale of magnitudes for effect statistics. 2002. Disponível em: <<http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>>. Acesso em: 20 abr. 2002. atualizado em May 2002.

HUMES, H.D. et al. Direct toxic effect of the radiocontrast agent diatrizoate on renal proximal tubule cells. *Am J Physiol*, Washington, v. 252, p. F246-255, 1987.

IMANAKA, T. et al. Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential. *J Cell Biol*, New York, v. 105, n. 6, pt 2, p. 2915-2922, Dec. 1987.

JOINER, C e LAUF, P. The correlation between ouabain binding and potassium pump inhibition in human and sheep erythrocytes. *J Physiol*, Cambridge, Ma, v. 283, p. 155-175, Oct. 1978.

KATAYAMA, H. et al. Adverse reactions to ionic and non-ionic contrast media. *Radiology*, Easton Pa, v. 175, n. 3, p. 621-628, June 1990.

KATHOLI, R. et al. Nephrotoxicity of non-ionic low osmolality versus ionic high-osmolality contrast media: a prospective double-blind randomized comparison in human beings. *Radiology*, Easton Pa, v. 186, n. 1, p. 183-187, June 1993.

KATZBERG, R.W. et al. Acute systemic and renal hemodynamic effects of meglumine/sodium diatrizoate 76% and iopamidol in euvoletic and dehydrated dogs. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 21, n. 10, p. 793-797, Oct. 1986.

KATZBERG, R.W. Urography into the 21st century: new contrast media, renal handling, imaging characteristics, and nephrotoxicity. *Radiology*, Easton Pa, v. 204 n. 2, p. 297-312, Aug, 1997.

KING, B. et al. Low osmolality contrast media: a current perspective. *Mayo Clin Proc*, Rochester, v. 64, n. 8, p. 976-985, 1989.

KINN, R. e BREISBLATT, W. Cortical blindness after coronary angiography: a rare but reversible complication. *Cathet Cardiovasc Diagn*, New York, v. 22, n. 3, p. 177-179, Mar. 1991.

KINNINSON, M. et al. Results of randomized controlled trials of low-versus high-osmolality contrast media. *Radiology*, Easton Pa, v. 170, n. 2, p. 381-389, Feb. 1989.

KIRK, K. et al. Effect of cell age on erythrocyte choline transport: implications for the increased choline permeability of malaria-infected erythrocytes. *Biochem J*, London, v. 283 (Pt 2), p. 617-619, 1992.

KIRKPATRICK, J. The blood brain barrier: its role in contrast studies. *Comput Tomogr*, New York, v. 2, n. 3, p. 189-196, 1978.

KONE, B.C. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis*, New York, v. 30, n. 3, p. 311-333, Sept. 1997.

KOPPLE, J.D. e SWENDSEID, M.E. Protein and amino acid metabolism in uremic patients undergoing maintenance hemodialysis. *Kidney Int Suppl*, New York, v. 2, p. 64-72, Jan. 1975a.

KOPPLE, J.D. e SWENDSEID, M.E. Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *J Clin Invest*, New Haven, v. 55. n. 5, p. 881-891, May 1975b.

KORN, W. e BETTMANN, M. A low osmolality versus high osmolality contrast material. *Curr Opin Radiol*, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 9-15, Apr. 1992.

KRÄMER, B.K. et al. A primer in radiocontrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, Berlin, v.14, n. 12, p. 2830-2834. Dec. 1999.

LASSER, E.C. et al. A role for nitric oxide in x-ray contrast material toxicity. *Acad Radiol*, Reston, Va., v. 2, p. 559-564, 1995.

LIEBERTHAL, W. et al. Renal ischemia and reperfusion impair endothelium dependent vascular relaxation. *Am J Physiol*, Washington, v. 256, p. F894-F900, 1989.

LIJNEN, P. Erythrocyte cation transport systems and membrane lipids in insulin -dependent diabetics. *Am J Hypertens*, New York, v. 6, n. 9, p. 763-770, Sept. 1993.

LINGREL, J. et al. Na,K-ATPase: Structure-Function Studies. *Ren Physiol Biochem*, Basel, v. 17, n. 4, p. 198-200, May-Aug. 1994.

LOPEZ DEL PINO, V. et al. Isolated intestinal cells of guinea pig: a suitable model for assessing direct toxic effects of ethanol on the mucosa of the upper small intestine. *Arch Toxicol Suppl*, Berlin, v. 6, p. 322-326, 1983.

LOUVEL, J.P. et al, Effects of the low-osmolality contrast medium ioversol (Optiray) on renal function in a geriatric population. *Acta Radiol*, Copenhagen, v. 37, n. 6, p. 950-953, Nov. 1996.

MANSKE, C. et al. Contrast nephropathy in azotemic diabetic patients undergoing coronary angiography. *Am J Med*, Newton, v. 89, p. 615-621, Nov. 1990.

MARTIN, K. Concentrative accumulation of choline by human erythrocytes. *J Gen Physiol*, New York, v. 51, p. 497-516, Apr.1968.

MARTIN, K. Extracellular cations and the movement of choline across the erythrocyte membrane. *J Physiol*, London, v. 224, p. 207-230, 1972.

MARTIN, K. *Choline transport in red cells*. In: *Membrane transport in red cells*. ELLORY, J.C. e LEW, V.L. New York: Academic Press, 1977. p.101-103.

MASEREEUW, R. et al. Endothelin B receptor-mediated regulation of ATP-driven drug secretion in renal proximal tubule. *Mol Pharmacol*, New York, v. 57, n. 1, p. 59-67, Jan. 2000.

McCARTHY, C.S. e BECKER, J.A. Multiple myeloma and contrast media. *Radiology*, Easton Pa, v.183, p. 519-521, 1992.

McDONOUGH, A. A. e FARLEY, R.A. Regulation of Na,K-ATPase activity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, Philadelphia, v. 2, n. 5, p. 725-734, 1993.

MELL, M. et al. Use of spiral computed tomography in the diagnosis of transplant renal artery stenosis. *Transplantation*, Baltimore, v. 57, n. 5, p. 746-748, Mar. 1994.

MERCER, R. Structure of Na-K ATPase. *Int Rev Cytol*, New York, v. 137C, p. 139-168, 1993.

MEYRIER, A. [Nephrotoxicity of iodine contrast media] - Nephrotoxicite des produits de contraste iodés. *Ann Radiol*, Paris, v. 37, n. 4, p. 286-295, 1994.

MICHELL, R. How do receptors at the cell surface send signals to the cell interior? *Br Med J*, Basic Molecular and Cell Biology, London, p. 90-99, 1988.

MIYAZAWA, T. et al. Role of blood cell deformation in toxicity of contrast media in cerebral angiography. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 24, n. 5, p. 383-389, May 1989.

MONCADA, S. e HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, Boston, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, Dec. 1993.

MOTULSKY, H. *Intuitive biostatistics*, New York: Oxford University Press, 1995. 386 p.

MURPHY, M.E. et al. Influence of contrast media on the response of rat renal arteries to endothelin and nitric oxide: influence of contrast media. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 356-365, June 1998.

MURPHY, S.W. et al. Contrast nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, v.11, n. 1 p. 177-182, Jan. 2000.

NEUMAYER, H.H. et al. Prevention of radiocontrast media induced nephrotoxicity by the calcium channel blocker nitrendipine: a prospective randomized clinical trial. *Nephrol Dial Transplant*, Berlin, v. 4, n. 12, p. 1030-1036, 1989.

OLBRICHT, C. et al. Minimally invasive diagnosis of renal artery stenosis by spiral computed tomography angiography. *Kidney Int*, New York, v. 48, p. 1332-1337, 1995.

OLSEN, S. e SOLEZ, K. *Acute tubular necrosis and toxic renal injury*. In: TISHER, C.C. & BRENNER, B. *Renal Pathology*, 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994, p. 769-809.

PALLER, M. Drug induced nephropathies. *Med Clin North Am*. Philadelphia, v. 74, n. 4, p. 909-917, July 1989.

PARFREY, P. et al. Contrast material-induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal failure, or both. A prospective controlled study. *N Engl J Med*, Boston, v. 320, n. 3, p. 143-149, 1989.

PARVEZ, Z. et al. Contrast media-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 24, n. 9, p. 697-702, Sept. 1989.

POLI DE FIGUEIREDO, C.E et al. Erythrocyte choline uptake after renal transplantation. *Lancet*, London, v. 339, p. 146-148, Jan. 1992.

POLI DE FIGUEIREDO, C.E. *Membrane transport alterations in disease states*. Oxford. D.Phil. Thesis. Oxford University, 1992, 215 p.

PORTER, G.A. et al. Sequential effect of angiographic contrast agent on canine renal and systemic hemodynamics. *Am Heart J*, St. Louis, v. 81, n. 1, p. 80-92, 1971.

PORTER, G.A. Contrast medium-associated nephropathy. Recognition and management. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 28, n. 4, p. S11-18, Sept. 1993a.

PORTER, G.A. Effects of contrast agents on renal function. *Invest Radiol*, Philadelphia, v. 28, n. 5, p. S1-5, Nov. 1993b.

RAPOPORT, S e LEVITAN, H. Neurotoxicity of x-ray contrast media: relation to lipid solubility and blood-brain barrier permeability. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, Baltimore, v. 122, n. 1, p. 186-193, Sept. 1974.

REYES, A.A. et al. Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol*, Washington, v. 267, n. 3 pt 2, p. F331-346, 1994.

RIBEIRO F.M. et al. The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *J Neurochem*, London, v. 87, n. 1, p. 136-146, Oct. 2003.

RICKWOOD, D. et al. *Membrane Structure and Function*. Oxford, IRL Press at Oxford University Press, 1989. 83 p.

RITCHIE, J.L. et al. Use of Nonionic or Low Osmolar Contrast Agents in Cardiovascular Procedures - American College of Cardiology Position Statement. *J Am Coll Cardiol*, New York, v. 21, n. 2, p. 269-273, 1993.

ROSE, A. e VALDES JR, R. Understanding the sodium potassium pump and its relevance to disease. *Clin Chem*, Washington, v. 40, n. 9, p. 1674-1685, Sept. 1994.

ROSOVSKY, M.A. et al. High-dose administration of nonionic contrast media: a retrospective review. *Radiology*, Easton Pa, v. 200, n. 1, p. 119-122, July 1996.

RUBIN, J.D. e COHAN, R.H. Ionated radiographic contrast media: comparison of low osmolar with conventional ionic agents. *Curr Opin Radiol*, Philadelphia, v. 3, n. 5, p. 637-645, 1991.

RUDNICK, M.R. et al. Nephrotoxic risks of renal angiography: contrast media-associated nephrotoxicity and atheroembolism - a critical review. *Am J Kidney Dis*. Duluth, v. 24, n. 4, p. 713-727, 1994.

RUDNICK, M.R. et al. Nephrotoxicity of ionic and non-ionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial. *Kidney Int*, New York, v. 47, p. 254-261, 1995.

RUDNICK, M.R. et al. Contrast media-associated nephrotoxicity. *Semin Nephrol*, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 15-26, Jan. 1997.

SCHMIDT, R.J e BAYLIS, C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int*, New York, v. 58, n. 3, p.1261-1266, Sept. 2000.

SCHNELLMANN, R. *Pathophysiology of nephrotoxic cell injury*. In: SCHRIER, R. e GOTTSCHALK, C. *Diseases of the Kidney*, 6th ed. Boston: Little, Brown, 1997. p. 1049-1067.

SCHRAMM, L. et al. Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail*, New York, v.16, n. 5, p. 555-569, 1994.

SCHREIER, D.Z. et al. A prospective study of carbon dioxide-digital subtraction vs. standard contrast arteriography in the evaluation of the renal arteries. *Arch Surg*, Chicago, v. 131, n. 5, p. 503-508, 1996.

SCHWARTZ, D. et al. Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal failure in rats. *Am J Physiol*, Washington, v. 267, n. 3 pt2, p. F374-F379, 1994.

SEEGER, J et al. Carbon dioxide gas as an arterial contrast agent. *Ann Surg*, Philadelphia, v. 217, n. 6, p. 688-698, June 1993.

SOLOMON, R. et al. Effects of saline, mannitol, and furosemide on acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. *N Engl J Med*, Boston, v. 331, n. 21, p. 1416-1451, 1994.

SOLOMON, R. Contrast-medium-induced acute renal failure. *Kidney Int*, New York, v. 53, n. 1, p. 230-242, 1998.

SPECTOR, N. *Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 150 p.

SPINLER, S. e GOLDFARB, S. Nephrotoxicity of contrast media following cardiac angiography: pathogenesis, clinical course, and preventive measures,

including the role of low-osmolality contrast media. *Ann Pharmacother*, Cincinnati, v. 26, n. 1, p. 56-64, Jan. 1992.

STEIN, W.D. *Channels, Carriers and Pumps: An introduction to membrane transport*, San Diego: Academic Press, 1990. 326 p.

STEIN, W.D. *Transport and diffusion across cell membranes*, San Diego: Academic Press, 1986. 685 p.

STERNER, G. et al. Iohexol clearance for GFR-determination in renal failure - single or multiple plasma sampling? *Nephrol Dial Transplant*, Berlin, v. 11, n. 3, p 521-525, 1996.

STEWART, G.W. e FRICKE, B. The curious genomic path from leaky red cell to nephrotic kidney. *Nephron Physiol*, Basel, v. 93, n. 2, p. 29-33, 2003.

SWAN, S. e BENNET, W. *Nephrotoxic acute renal failure*. In: LAZARUS, J. M e BRENNER, B. *Acute renal failure*, 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1993, p. 357-392.

TALIERCIO, C. et al. A randomized comparison of the nephrotoxicity of iopamidol and diatrizoate in high risk patients undergoing cardiac angiography. *J Am Coll Cardiol*, New York, v. 17, n. 2, p. 384-390, 1991.

TERLOUW, S.A. et al. Nephrotoxicants induce endothelin release and signaling in renal proximal tubules effect on drug efflux. *Mol Pharmacol*, New York, v. 59, p. 1433-1440, 2001.

TERLOUW, S.A. et al. Short- and long-term influences of heavy metals on anionic drug efflux from renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther*, Baltimore, v. 301, p. 578-585, 2002.

TERVAHARTIALA, P. et al. Structural changes in the renal proximal tubular cells induced by iodinated contrast media. *Nephron*, Basel, v. 76, p. 96-102, 1997

THATTE, L. e VAAMONDE, C. A. Drug-induced nephrotoxicity: the crucial role of risk factors. *Postgrad Med*, Minneapolis, v. 100, n. 6, p. 83-84, 87-8, 91, Dec. 1996.

THE COMPREHENSIVE resource for physicians, drug and illness information: hypaque parenteral. Disponível em: <[http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs-%20H\)/HYPAQUE.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS-%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs-%20H)/HYPAQUE.html)>. Acesso em: 22 jan. 2004.

TIZIANELLO, A. et al. Abnormalities in amino acid metabolism in patients with chronic renal failure. A pathophysiological approach to the nutritional

treatment. I. Studies in the postabsorptive state. *Contrib Nephrol*. Basel, v. 55, p. 1-10, 1987a.

TIZIANELLO, A. et al. Abnormal amino acid metabolism after amino acid ingestion in chronic renal failure. *Kidney Int Suppl*. Cambridge, Ma., v. 22, p. S181-185, Oct. 1987b.

TOME, L.A. et al. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant*, Berlin, v.14, n. 5, p. 1139-1145, May, 1999.

TOMMASO, C. L. Contrast-induced nephrotoxicity in patients undergoing cardiac catheterization. *Cathet Cardiovasc Diagn*, New York, v. 31, n. 4, p. 316-321, Apr. 1994.

WALDAY, P et al. Renal effects of iodixanol in experimental animals. *Acta Radiol*, Copenhagen, v. 36, p. 204-212, 1995.

WAYBILL, M.M. e WAYBILL, P.N. Contrast media-induced nephrotoxicity: identification of patients at risk and algorithms for prevention. *J Vasc Interv Radiol*, Reston, Va., v. 12, n. 1, p. 3-9, Jan. 2001.

WEISBERG, L.S. et al. Radiocontrast-induced nephropathy in humans: role of renal vasoconstriction. *Kidney Int*, New York, v. 41, p.1408-1415, 1992.

WELT, L.G. et al. An ion transport effect in erythrocytes from uremic patients. *Trans Assoc Am Physicians*, Philadelphia, v. 77, p.169-181, 1964.

WEST, I.C. *The Biochemistry of Membrane Transport*. New York, Chapman & Hall Ltd, 1983. 80 p.

WYCHERLEY, A. et al. Contrast media viscosity: a contributing factor in blood brain barrier damage following intracarotid contrast injection? *Australas Radiol*. Sidney, v. 30, n. 2, p. 96-98, May 1986.

YOSHIOKA, T. et al. Reduced activity of antioxidant enzymes underlies contrast media-induced renal injury in volume depletion. *Kidney Int*, New York, v. 41, p. 1008-1015, 1992.

YOUNATHAN, C.M. et al. Dialysis is not indicated immediately after administration of non-ionic contrast agents in patients with end-stage renal disease treated by maintenance dialysis. *Am J Roentgenol*, Springfield, Ill., v. 163, p. 969-971, Oct. 1994.

YOUNG, G.A. e PARSONS F.M. The effect of peritoneal dialysis upon the aminoacids and other nitrogen compounds in the blood and dialysates from patients with renal failure. *Clin Sci*, London, v. 37, n. 1, p. 1-10, Aug. 1969.

YOUNG, J.D. e ELLORY J.C. *Flux determinations*. In: YOUNG JD and ELLORY JC. *Red cell membranes - A methodological approach*, London: Academic Press, 1983, p. 119-133.

YU, L. et al. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington, v. 91, n. 5, p.1691–1695, Mar. 1994.

YU, L. Role of nitric oxide in acute renal failure. *Ren Fail*, New York, v.19, n. 2, p. 213-216. Mar.1997.

ZAGER, R. et al. Radiographic contrast media-induced tubular injury: evaluation of oxidant stress and plasma membrane integrity. *Kidney Int*, New York, v. 64, n. 1, p. 128-139, July 2003.

ZAGORIA, R. Iodinated contrast in neuroradiology. *Neuroimaging Clin N Am*, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 1-8, Feb. 1994.

ZEISEL S.H. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition*, Burbank, Los Angeles County, Calif., v. 6, n. 7-8, p. 669-671, July-Aug. 2000.

ZIEGLER, T.W. et al. Inhibition of active transport by radiographic contrast media. *Kidney Int*, New York, v. 7, n. 1, p. 68-76, 1975.

ZIEGLER T.W. e OLSEN L.S. Effects of radiocontrast media on ion transport in the toad urinary bladder. *Invest Radiol*, Philadelphia, v.15, n. 6, Suppl. p. S 51-53. Nov-Dec. 1980..

ANEXOS

Anexo 1 – Texto encaminhado para publicação

EFFECT OF RADIOCONTRASTS UPON SELECTED MEMBRANE TRANSPORT SYSTEMS

Rubens M. Oliveira, M.D., M.Sc.; Bartira E. Pinheiro da Costa, Ph.D.; Fernando C. Fervenza, M.D., Ph.D., Mário B. Wagner, M.D., Ph.D.; Domingos O. d'Avila, M.D., Ph.D.; Carlos E. Poli de Figueiredo, M.D., Ph.D.

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Faculdade de Medicina, Hospital São Lucas e Instituto de Pesquisas Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90610-000

Running head: Radiocontrasts and membrane transport

Contact Information:

Rubens M. Oliveira
Centro Clínico PUCRS C 414, Av. Ipiranga 6690
Porto Alegre - RS
Brazil
CEP 90610-000

E-mail: marona@pucrs.br

Phone and Fax: [55] (51) 3336-7700

Type of manuscript: original research

INTRODUCTION

Use of radiocontrast agents has been frequently associated with loss of renal function, being implicated in 5% to 32% of all in-hospital cases of acute renal failure (ARF). Patients with previously impaired renal function are at particularly high risk (1). The molecular mechanisms responsible for the disorder remain thus far unknown. Yet renal tubule cells injury, and changes in intrarenal hemodynamics appear to be factors playing major roles (2, 3, 4).

Altered membrane transport systems have been described in several clinical situations (5, 6, 7). Decreased Na^+/K^+ transport and increased lysine and choline membrane transport have been found in erythrocytes of uremic patients (8, 9, 10, 11). Epithelial Na^+/K^+ pump exposure to radiocontrasts resulted in inhibited activity (4, 12). Proximal tubule cells incubated with radiocontrast agents exhibited metabolic alterations and histological changes, besides the release of intracellular enzymes, indicating the presence of cell damage (13). Changes in morphology and in cell deformity characteristics of erythrocytes exposed to radiocontrasts have been previously verified (14, 15).

Clinical use of radiocontrasts appears to be associated with significant changes in intrarenal hemodynamics (1, 16, 17). Sustained medullary vasoconstriction and increased preglomerular arteriolar resistance follow a brief cortical hyperemic phase (16, 18). Also, reduced synthesis of vasodilatory substances seems to accompany radiocontrast nephrotoxicity in patients with vascular or kidney diseases (1, 19, 20).

Vasodilation is partly dependent on nitric oxide (NO) generation, having L-arginine as precursor. Evidences indicate that NO plays a major role in radiocontrast-induced ARF (3, 21). Experimentally, administration of L-arginine protected against radiocontrast-induced vasoconstriction and ARF (3, 19, 22). Agmon et al. (21) described a model of radiocontrast nephropathy induced by iothalamate in rats pre-treated with indomethacin and nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). The initial cortical hyperemic response was

blocked and replaced by a further decline in medullary blood flow, suggesting that prostanoids and NO exercise a protective effect on the renal response to radiocontrasts. A role for L-arginine in the intrarenal hemodynamic changes induced by radiocontrasts has not been evaluated. Choline is necessary for acetylcholine and phosphatidylcholine synthesis. Defective cell functioning has been associated with altered choline transport (10). The possibility of membrane choline transport being affected by radiocontrasts has not yet been probed.

Erythrocytes membrane transport systems have been shown to behave in a manner similar to those of more complex cells. The model has been considered a simple, reliable and, possibly, the ideal model to examine membrane transport (23).

The aim of this study was to examine the effect of radiocontrast agents on selective membrane transport systems, using the erythrocyte membrane as model.

MATERIALS AND METHODS

Normal volunteers and patients undergoing cardiac catheterization participated in the study. Informed consent was obtained, and the study was approved by the hospital Ethics Committee.

To evaluate the influence of radiocontrasts on membrane transport activity, erythrocytes were incubated with saline or radiocontrasts solutions - diatrizoate sodium (DS), diatrizoate meglumine (DM), or diatrizoate compound (DC). Additionally, Na^+/K^+ pump activity experiments were performed in erythrocytes isolated from patients undergoing cardiac catheterization - 15 minutes, prior to and following, radiocontrast administration [Hypaque M-76%[®] (Winthrop Inc. Malvern, PA, USA): 10% diatrizoate sodium (W/V), and diatrizoate meglumine, 66% (W/V) solution]. Volumes infused during the procedures ranged from 70 to 90 mL.

Individuals with diabetes, kidney, thyroid or liver disease, neoplasia, in use of digitalis, or having been blood-transfused in the last three months were excluded.

In all experiments, 10 mL of fasting blood was taken into heparinised tubes, centrifuged (3,000 g) for 10 minutes, plasma and buffy coat discarded. The erythrocytes remaining were washed three times by sequential centrifugation and resuspension in ice-cold saline solution (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, glucose 5 mM, MOPS 10 mM, pH 7.4) and kept in ice-cold saline solution, to a 10% hematocrit, until assayed. Subsequent cells washing, lysing, and protein precipitation were accomplished in ice-cold isotonic MgCl_2 solution (MgCl_2 107 mM, MOPS 10 mM, pH 7.4), 0.1% Triton-X 100 solution (0.5 ml), and 5% trichloroacetic acid (TCA) solution (0.5 ml), respectively.

Na⁺/K⁺ pump activity assay

The K⁺ influx was measured according to previously described methods (9). Briefly, triplicate tubes containing 1 mL of the erythrocytes suspension were incubated at 37°C for five minutes, either in presence or absence of ouabain (0.1 mM). To evaluate the influence of radiocontrasts on the Na⁺/K⁺ pump, erythrocytes were incubated for 15 minutes with solutions of DS (diatrizoate sodium 150 mM, KCl 5 mM, MOPS 10 mM, glucose 5 mM, pH 7.4), DM (diatrizoate meglumine 150 mM, KCl 5 mM, MOPS 10 mM, glucose 5 mM, pH 7.4), or DC (diatrizoate meglumine 11.42 mM, and diatrizoate sodium 2.08 mM) to approximately replicate the *in vivo* concentrations of Hypaque M-76%[®] achieved during cardiac catheterization, with or without ouabain. Tracer amounts of ⁸⁶Rb⁺ were added to each tube, and incubation for five minutes at 37°C was performed - fluxes started and stopped on ice-bath. Cooled for three minutes, each tube was rapidly centrifuged (2,000 g), and the supernatant (10 µL) was retrieved for ⁸⁶Rb⁺ counting. In sequence, erythrocytes were quickly centrifuged, washed three times, lysed, and the protein content precipitated. The cells suspension was pelleted down by centrifuging (3,000 g) for 10 minutes. The supernatant was collected by pipetting, and the intracellular ⁸⁶Rb⁺ content was counted in a β-scintillation spectrophotometer (Beckman LS 6500. Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA). The intracellular/extracellular ⁸⁶Rb⁺ counts ratio, hematocrits, and measured K⁺ concentrations were used to calculate total K⁺ influx rate and its ouabain-sensitive component (Na⁺/K⁺ pump). It has been previously established that ⁸⁶Rb⁺ is a valid congener for K⁺ (24).

Na⁺/K⁺ pumps number estimate

To identify the radiocontrasts effect on the number of Na⁺/K⁺ pumps, cells were incubated for 15 minutes, in presence or absence of DS. The Na⁺/K⁺ pumps number was

estimated according to techniques previously described (9). Tubes containing 1 mL of normal individuals erythrocytes suspension in saline or in DS were incubated at 37°C for 15 minutes, with or without 0.1 mM unlabelled ouabain. ³H-ouabain was then added to each tube, to a final concentration of approximate 440 nM. In sequence, the erythrocytes suspension was incubated at 37°C, for 2 hours. Cells were washed three times in ice-cold MgCl₂. Bound ³H-ouabain was solubilised by the sequential addition of Triton-X 100 and TCA, followed by pelleting down. The supernatant was retrieved for radioactivity counting. Specific ouabain binding was obtained by subtraction of the bound ³H-ouabain, in presence of excess cold ouabain.

L-arginine and choline transport

All the blood samples used in experiments of L-arginine and choline transport were taken from normal subjects, and processed within two hours.

The methods applied in erythrocytes transmembrane flux measurements have already been described (25). Total erythrocyte L-arginine - or choline - uptake was measured by incubating red blood cells at 10% hematocrit, for three minutes at 37°C in a water bath, in the presence of 500 μM L-arginine solution (or 250 μM choline). ¹⁴C-L-arginine - or ¹⁴C-choline - was used as tracer. Fluxes were started and interrupted in ice-cold water bath (3 minutes). Erythrocytes were washed free of extracellular radioactivity, resuspended in ice-cold saline and centrifuged (14,000 g) for three times, followed by lysis, protein precipitation, and pelleting down. The supernatant was added to scintillation fluid, and the intracellular radioactivity counted for five minutes.

Two series of flux experiments were performed. In the first (n=10), blood was previously incubated in Hypaque M-76[®] solutions of increasing concentration (0; 3.5; 7;

14; 28; 70; and 112 μM), for 15 minutes. In the second (n=6 for choline, and n=5 for L-arginine), blood was preincubated in 14 μM Hypaque M-76[®] solution - to approximate *in vivo* concentrations achieved during cardiac catheterization - for 0, 5, 15 and 30 minutes. Control fluxes were performed in saline solution.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between two groups were performed by two-tailed paired Student *t* test. Differences among multiple groups were analyzed by repeated measures analysis of variance (ANOVA); post-hoc comparisons performed by Dunnett's multiple comparisons test (comparison against control) or Tukey's multiple comparisons test (pairwise comparisons). The effect size for changes in Na^+/K^+ pump activity between experimental groups and control group was also determined (26). P values ≤ 0.050 were considered significant. GraphPad Prism 3.03 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) was used in statistical analyses.

RESULTS

Na⁺/K⁺ pump activity was examined in erythrocytes collected from eight normal individuals (female: 7; age: 55±11 years; range: 44-74 years), and from 15 patients undergoing cardiac catheterization (female: 9; age: 56±9 years; range: 44-74 years). Potassium influx was diminished in DS, DM, and DC, in comparison with the control group, yet significantly and with a large effect size (1.63) only in DC. The effect of different radiocontrast solutions on Na⁺/K⁺ pump activity is depicted in Table 1. Results of flux experiments performed in patients - before and after Hypaque M-76[®] infusions - were 1.40±0.36 and 1.27±0.40 mmol/L cell/h, respectively (P=0.039). Patients weight was 69±10 kg, and the radiocontrast dose was 1.03±0.16 mL/kg.

Enter Table 1

The number of Na⁺/K⁺ pumps was significantly reduced in presence of DS (156±36 vs. 143±34 pumps/erythrocytes for control and DS, respectively; P=0.015).

L-arginine influx was evaluated in erythrocytes obtained from 15 normal adult individuals (female: 6; age: 28±7 years; range: 23-50 years). L-arginine uptake, at increasing concentrations of Hypaque M-76[®], was significantly lower only at 70 and 112 μM, in comparison with saline incubation (P<0.001, repeated measures analysis of variance; P=0.010, post hoc Dunnett's multiple comparison test). Figure 1A depicts influx at 500 μM extracellular L-arginine. The influence of radiocontrast exposition time on L-arginine uptake was also evaluated in cells from normal individuals (n=5). Results are shown in Figure 1B. Progressively decreasing L-arginine uptake with time, and no difference between groups was observed (P=0.996, repeated measures analysis of variance).

Enter Figure 1A and Figure 1B

Choline transport assays were performed in erythrocytes from 10 normal adult individuals (female: 5; age: 29 ± 9 years; range: 24-50 years). Figure 2A depicts choline influx at 250 μM extracellular choline. A significant difference in choline uptake with increasing Hypaque M-76[®] concentrations, compared with saline incubation, appeared only at 112 μM ($P=0.001$, repeated measures analysis of variance; $P=0.010$, Dunnett's multiple comparisons test). The influence of radiocontrast exposition time on choline uptake was also evaluated ($n=6$). Results are depicted in Figure 2B. No significant differences were found between groups, or among different exposition times ($P=0.628$ and $P=0.122$, respectively; repeated measures analysis of variance).

Enter Figure 2A and Figure 2B

DISCUSSION

The study demonstrated decreased Na^+/K^+ pump activity and reduced number of Na^+/K^+ pumps in erythrocytes incubated with radiocontrasts. The effect was selective, as it did not affect other membrane transport systems. A similar reduction in pump activity took place in patients undergoing cardiac catheterization, after radiocontrast infusion. Data suggest that inhibition of the Na^+/K^+ pump may explain - at least in part - radiocontrast toxicity.

In presence of radiocontrast, rabbit erythrocyte membranes exhibited increased permeability (27), releasing potassium. Salts of diatrizoate and iohalamate reversibly inhibited the active sodium transport in the urinary bladder of Colombian toads - a model for renal distal tubule epithelium -, albeit the site of action was not identified (4). Bino et al. (12) recently suggested that inhibition of tubular cells ion transport by the Na^+/K^+ pump might represent an important mechanism in the pathophysiology of radiocontrast-induced ARF. Interestingly, digitalis-treated patients appear to be more susceptible to radiocontrast-induced ARF (28), suggesting that a synergistic toxic effect upon tubule cells Na^+/K^+ pump activity was under effect. Individuals with impaired renal function are at increased risk of developing ARF, following the use of radiocontrasts (16). Noteworthy, abnormalities in membrane transport systems - including the Na^+/K^+ pump - have been described in those patients (8, 10, 11). The risk for contrast nephropathy in patients with chronic renal failure may thus be dependent upon the additive effect of toxicity on previously altered tubule cell transport systems. Differently from findings in isolated chronic renal failure - where increased lysine and choline transport have been described -, radiocontrasts did not affect red blood cells membrane transport, save at concentrations at least five times above those attained during cardiac catheterization.

Inhibition of NO-synthase by competitive inhibitors added no protection, or caused even further deterioration of the renal function in salt depleted rats (3). There is suggestion that NO plays a major role in radiocontrast-induced ARF. L-arginine attenuated the reduction in urinary guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate and nitrate/nitrite excretion induced by radiocontrast administration, in rats (3).

The current results support the hypothesis that inhibition of Na^+/K^+ cell membrane transport may contribute to the cell dysfunctions of radiocontrast-toxicity. However, it does not endorse an effect mediated by altered L-arginine cell influx. The protection of L-arginine administration may be associated with nonspecific amino-acid effects on the renal circulation - enhanced blood flow - and not necessarily by changes on the L-arginine/NO pathway. Erythrocytes and tubular cells are differently exposed to radiocontrasts - other potentially damaging effects may take place in tubular cells, adding to the membrane dysfunction. It is conceivable that similar transport changes take place in tubular cells.

In conclusion, radiocontrasts present selective inhibitory effect on erythrocytes membrane transport systems - namely the Na^+/K^+ pump. A similar effect on kidney tubule cells may contribute in the pathophysiology of ARF induced by the use of radiocontrasts.

REFERENCES

1. Solomon R. Contrast-medium-induced acute renal failure. *Kidney Int* 1998; 53:230-242.
2. Erley CM, Heyne N, Burgert K, Langanke J, Risler T, Osswald H. Prevention of radiocontrast-induced nephropathy by adenosine antagonists in rats with chronic nitric oxide deficiency. *J Am Soc Nephrol* 1997; 7:1125-1132.
3. Schwartz D, Blum M, Peer G, et al. Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 1994; 267:F374-F379.
4. Ziegler TW, Ludens JH, Fanestil DD, Talner LB. Inhibition of active sodium transport by radiographic contrast media. *Kidney Int* 1975; 7:68-76.
5. Allen PD, Schmidt TA, Marsh JD, Kjeldsen H. Na,K-ATPase expression in normal and failing human left ventricle. *Basic Res Cardiol* 1992; 87 (Suppl. 1):87-94.
6. Aviv A, Lasker N. Defects in membrane transport of ions as possible pathogenic factors in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1992; 1:68-72.
7. Lijnen P, Fenyvesi A, Bex M, Bouillon R, Amery A. Erythrocyte cation transport systems and membrane lipids in insulin-dependent diabetics. *Am J Hypertens* 1993; 6:663-670.
8. Fervenza FC, Harvey CM, Hendry BM, Ellory JC. Increased lysine transport capacity in erythrocytes from patients with chronic renal failure. *Clin Sci* 1989; 76:419-422.
9. Fervenza FC, Hendry BM, Ellory JC. Effects of dialysis and transplantation on red cell Na pump function in renal failure. *Nephron* 1989; 53:121-128.
10. Fervenza FC, Meredith D, Ellory JC, Hendry BM. Abnormal erythrocyte choline transport in patients with chronic renal failure. *Clin Sci* 1991; 80:137-141.
11. Poli de Figueiredo CE, Ellory JC, Hendry BM. Erythrocyte choline uptake after renal transplantation. *Lancet* 1992; 339:146-148.

12. Bino FG, Costa ER, Burth P, et al. The effect of nonionic radiocontrast media on the activity of purified human kidney Na, K ATPase. In: Taniguchi K, Kaya S, ed. Na/K-ATPase and related ATPases. Amsterdam, the Neth: Elsevier, 2000; 413-416.
13. Humes HD, Hunt DA, White MD. Direct toxic effect of the radiocontrast agent diatrizoate on renal proximal tubule cells. *Am J Physiol* 1987; 252:F246-F255.
14. Aspelin P, Nilsson PE, Schmid-Schönbein H, Schröder S, Simon R. Effect of four non-ionic contrast media on red cells in vitro. I. Morphology. *Acta Radiol Suppl* 1987, 370:79-83.
15. Aspelin, P, Nilsson PE, Schmid-Schönbein H, Schröder S, Simon R. Effect of four non-ionic contrast media on red cells in vitro. III. Deformability. *Acta Radiol Suppl* 1987; 370:89-91.
16. Brezis M, Cronin R. Radiocontrast media-induced acute renal failure. In: Schrier R, Gottschalk C, ed. *Diseases of the kidney*. 2nd ed. Boston, Ma: Little & Brown, 1997; 1189-1202.
17. Weisberg LS, Kurnik PB, Kurnik BR. Radiocontrast-induced nephropathy in humans: role of renal vasoconstriction. *Kidney Int* 1992; 41:1408-1415.
18. Deray G. Nephrotoxicity of contrast media. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:2602-2606.
19. Andrade L, Campos SB, Seguro AC. Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: protective role of L-arginine. *Kidney Int* 1998; 53:1736-1742.
20. Tommaso CL. Contrast-induced nephrotoxicity in patients undergoing cardiac catheterization. *Catheter Cardiovasc Diagn* 1994; 31:316-321.
21. Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, Rosen S, Brezis M. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest* 1994; 94:1069-1075.

22. Campos SB, Ori M, Dórea EL, Seguro AC. Protective effect of L-arginine on hypercholesterolemia-enhanced renal ischemic injury. *Atherosclerosis* 1999; 143:327-334.
23. Stewart GW, Fricke B. The curious genomic path from leaky red cell to nephrotic kidney. *Nephron Physiol* 2003; 93:29-33.
24. Beaugé L, Lew VL. Passive fluxes of sodium and potassium across red cell membranes. In: Ellory C, Lew V, ed. *Membrane transport in red cells*. London, UK: Academic Press, 1977, 39-51.
25. Fervenza FC, Meredith D, Ellory JC, Hendry BM. A study of the membrane transport of aminoacids in erythrocytes from patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5:594-599.
26. Hopkins WG. A scale of magnitudes for effect statistics [Online]. <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html> [20 April 2002].
27. Hayakawa K, Shimizu Y. Do iodinated contrast media increase serum potassium levels? *Radiology* 1996; 200:407-411.
28. Gomes A, Baker JD, Martin-Paradero V, et al. Acute renal dysfunction after major arteriography. *Am J Roentgenol* 1985; 145:1249-1254.

Figures legends

Figure 1A:

Erythrocyte L-arginine influx at 500 μM extracellular L-arginine concentration. Cells were exposed to progressively increased concentrations of Hypaque M-76[®]. L-arginine uptake was significantly lower only at 70 and 112 μM , compared to saline incubation ($P=0.0001$, repeated measures analysis of variance. $P=0.010$, post hoc Dunnett's multiple comparison test).

Figure 1B:

Erythrocyte L-arginine influx in saline (open squares) or 14 μM Hypaque M-76[®] (solid circles), at 500 μM extracellular L-arginine concentration. Progressively decreased L-arginine uptake with time - in both groups - with no difference between groups ($P=0.996$, repeated measures analysis of variance). Each point represents mean and standard deviation.

Figure 2A:

Erythrocyte choline influx at 250 μM extracellular choline concentration. Cells were exposed to progressively increased concentrations of Hypaque M-76[®]. A significant difference in choline uptake was only apparent for fluxes performed at 112 μM , compared to saline incubation ($P=0.001$, repeated measures analysis of variance. $P=0.010$, Dunnett's multiple comparisons test).

Figure 2B:

Erythrocyte choline influx in saline (open squares), or 14 μM Hypaque M-76[®] (solid circles) at 250 μM extracellular choline concentration. No significant differences between

groups and exposition times (P=0.628, and P=0.122, respectively; repeated measures analysis of variance). Each point represents mean and standard deviation.

Tables

Table 1: Effect of radiocontrasts on erythrocytes Na⁺/K⁺ pump activity (n=8).

Na⁺/K⁺ pump activity (mmol/L.cell/h)			
Control	DS	DM	DC
1.50 ± 0.35*	1.32 ± 0.37	1.28 ± 0.30	1.01 ± 0.25*

Values are mean ± SD. DS: diatrizoate sodium; DM: diatrizoate meglumine; DC: compound of diatrizoate meglumine and diatrizoate sodium.

*: repeated measures analysis of variance. P=0.004, post hoc Tukey test. P<0.010.

Figures

Figure 1A

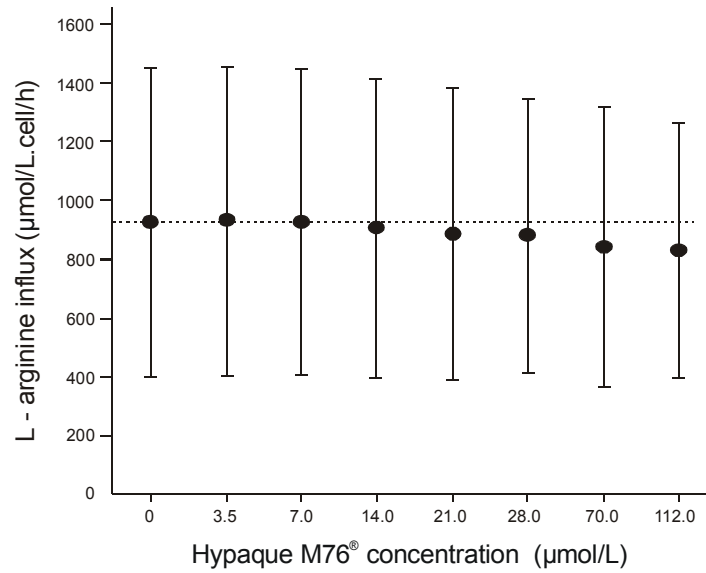


Figure 1B

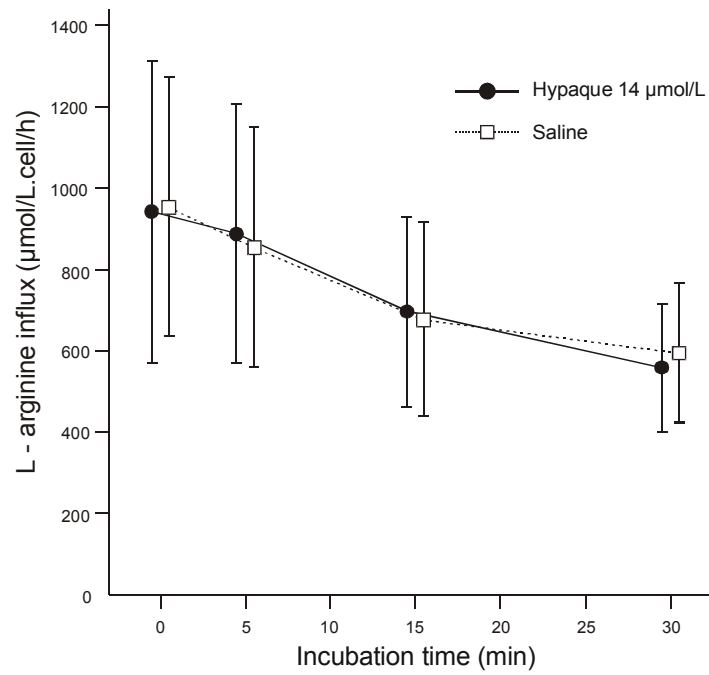


Figure 2A

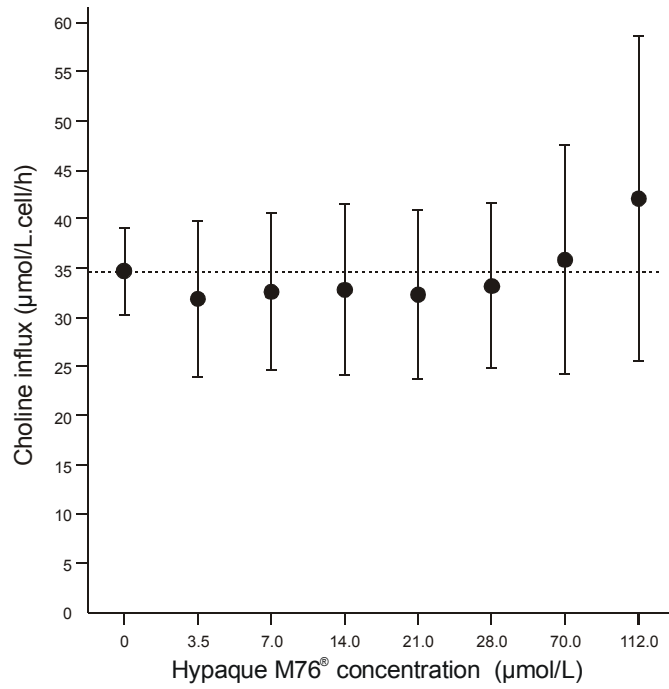
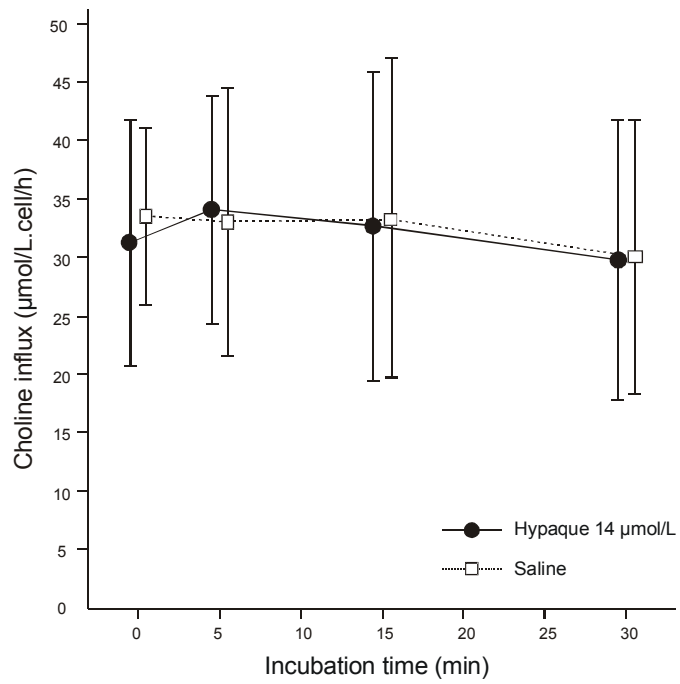


Figure 2B



Anexo 2 – Termos de consentimento informado

Termo de Consentimento Informado

Eu, _____, nascido em ___/___/___, natural de _____, aceito participar do estudo "UM ESTUDO DA BOMBA DE Na⁺/K⁺ EM PACIENTES EXPOSTOS A CONTRASTES RADIOLÓGICOS", a ser realizado em nível ambulatorial e de internação na investigação radiológica do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Estou ciente de que os procedimentos a serem realizados (coleta de sangue) destinam-se a uma avaliação para inclusão no estudo. Trabalhos científicos como este, realizados em especial nas Faculdades de Medicina, tem o intuito de buscar esclarecer os médicos sobre diferentes aspectos das doenças, permitindo o tratamento mais adequado dos pacientes.

Nome

Porto Alegre

Data

Eu, _____, fui informado sobre os objetivos e justificativa da pesquisa ESTUDO SOBRE O TRANSPORTE DE L-Arginina EM ERITRÓCITOS EXPOSTOS AOS RADIOCONTRASTES, de forma clara e detalhada pelo Dr. Rubens Marona de Oliveira. Sei que o presente estudo testa a hipótese da existência de alteração no transporte de L-Arginina, através da célula vermelha do sangue quando em contato com contraste radiológico, com o objetivo de avaliar as alterações que ocorrem na função das células de pessoas que fazem radiografias com contraste.

Sei que serei submetido à coleta de 10 ml de sangue venoso por punção do sistema venoso periférico do antebraço. Recebi informações sobre o procedimento no qual estarei envolvido, que poderei sentir dor no momento da punção, e que as chances de ocorrer maior incômodo são pequenas.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas claramente pelo Dr. Rubens Marona de Oliveira, médico responsável, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a ele, quando julgar necessário. Sei também que as informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas, e que terei liberdade de anular meu consentimento de participação na pesquisa a qualquer tempo.

O Dr. Rubens Marona de Oliveira cientificou-me de que as informações apresentadas por mim serão mantidas confidenciais.

Sei que caso ocorram danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme indica a lei vigente.

Também tomei conhecimento que, caso existam gastos adicionais, estes farão parte do orçamento da pesquisa.

Caso tenha novas perguntas sobre esta pesquisa, sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso esclarecê-las com o Dr. Rubens Marona de Oliveira.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome

Porto Alegre

Data

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____, fui informado sobre os objetivos e justificativa da pesquisa ESTUDO SOBRE O TRANSPORTE DE Colina EM ERITRÓCITOS EXPOSTOS AOS RADIOCONTRASTES, de forma clara e detalhada pelo Dr. Rubens Marona de Oliveira. Sei que o presente estudo testa a hipótese da existência de alteração no transporte de COLINA, através da célula vermelha do sangue quando em contato com contraste radiológico, com o objetivo de avaliar as alterações que ocorrem na função das células de pessoas que fazem radiografias com contraste.

Sei que serei submetido à coleta de 10 ml de sangue venoso por punção do sistema venoso periférico do antebraço. Recebi informações sobre o procedimento no qual estarei envolvido, que poderei sentir dor no momento da punção, e que as chances de ocorrer maior incômodo são pequenas. Todas as minhas dúvidas foram respondidas claramente pelo Dr. Rubens Marona de Oliveira, médico responsável, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a ele, quando julgar necessário. Sei também que as informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas, e que terei liberdade de anular meu consentimento de participação na pesquisa a qualquer tempo.

O Dr. Rubens Marona de Oliveira explicou-me de que as informações apresentadas por mim serão mantidas confidenciais.

Sei que caso ocorram danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme indica a lei vigente .

Também tomei conhecimento que, caso existam gastos adicionais, estes farão parte do orçamento da pesquisa.

Caso tenha novas perguntas sobre esta pesquisa, sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso esclarecê-las com o Dr. Rubens Marona de Oliveira.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome

Porto Alegre

Data