

## Impacto do gênero em alterações estruturais precoces da nefropatia induzida por contraste em ratos

Impact of gender in early structural changes of contrast induced nephropathy in rats

### Autores

José Carlos Carraro-Eduardo<sup>1</sup>  
Mariana Franco Ferraz Santino<sup>1</sup>  
Heloisa Werneck de Macedo<sup>1</sup>  
Licínio Esmeraldo da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Fluminense.

Data de submissão: 04/05/2016.  
Data de aprovação: 09/08/2016.

### Correspondência para:

José Carlos Carraro-Eduardo.  
Hospital Universitário Antônio Pedro.  
Av. Marquês do Paraná, nº 303, Centro, Niterói, RJ, Brasil.  
CEP: 24033-900  
E-mail: carraroeduardo@gmail.com

DOI: 10.5935/0101-2800.20160063

### RESUMO

**Introdução:** A nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma das principais causas iatrogênicas de lesão renal aguda. Estudos experimentais têm demonstrado que a injeção intravascular do agente de contraste provoca vacuolização intensa nas células dos túbulos renais proximais, que precede o aumento da creatinina sérica, e que a fêmea podem estar em maior risco de CIN. **Objetivo:** Estudar as primeiras mudanças histomorfométricas renais na nefropatia induzida por contraste de acordo com o gênero. **Métodos:** Vinte ratos Wistar anteriormente uninefrectomizados foram divididos em 4 grupos (n = 5): machos de controle; fêmeas de controle; machos expostos ao contraste e fêmeas expostas ao contraste. Os animais foram sacrificados imediatamente após a administração de contraste e amostras de tecido de rim foram coletadas para análise histomorfométrica. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense. **Resultados:** Houve presença mais intensa de microvacuolização em túbulos proximais nos ratos expostos ao contraste do que nos grupos de controle. Tal vacuolização tubular proximal foi mais intensa nos ratos do sexo feminino ( $p = 0,001$ ). **Conclusão:** Vacuolização do túbulo proximal é uma mudança precoce na CIN e é mais intensa em ratos fêmeas do que em ratos machos.

**Palavras-chave:** fatores de risco; lesão renal aguda; meios de contraste.

### INTRODUÇÃO

Contrastes são substâncias que têm grande capacidade para absorver o raio-X e, assim, possibilitar a visualização de estruturas que normalmente não podem ser observadas nos exames radiológicos.<sup>1</sup> Uma das consequências indesejáveis

### ABSTRACT

**Introduction:** Contrast-induced nephropathy (CIN) is a major iatrogenic cause of acute kidney injury. Experimental studies have shown that intravascular injection causes intense vacuolization of the contrast agent in the proximal renal tubules cells, preceding the increase in serum creatinine, and that the female may be at a higher risk for CIN. **Objective:** To study the early kidney histomorphometric changes in contrast-induced nephropathy according to the gender. **Methods:** Twenty previously uninephrectomized Wistar rats were divided into 4 groups (n = 5): control males; control females; contrast exposed males; and contrast exposed females. The animals were sacrificed immediately after contrast administration and kidney tissue samples were collected for histomorphometric analysis. The research project was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medicine of Universidade Federal Fluminense. **Results:** There was a more intense presence of microvacuoles in proximal tubules in the rats exposed to contrast than in the control groups. Such proximal tubular vacuolation was more intensive in the female rats ( $p = 0.001$ ). **Conclusion:** Proximal tubular vacuolation is a very early change in CIN and is more intensive in female than in male rats.

**Keywords:** acute kidney injury; contrast media; risk factors.

com o uso dos meios de contraste é a nefropatia induzida por contraste (NIC), com incidência de menos de 5%, em populações não selecionadas, e até > 20%, nas populações de alto risco.<sup>2</sup>

Esta é uma causa iatrogênica de insuficiência renal aguda que tem sido motivo

de inúmeros estudos clínicos e experimentais, na tentativa de melhor compreender os seus mecanismos fisiopatológicos e na busca por alternativas que possam preveni-la.<sup>2</sup>

Os achados histopatológicos na NIC se restringem ao túbulo proximal, tendo como característica a intensa vacuolização das células epiteliais.<sup>3,4</sup> Estas alterações são reversíveis após alguns dias do uso do agente de contraste.<sup>5</sup> A origem destes vacúolos pode ser devida à redução da diurese induzida pelo contraste, com consequente aumento da sua concentração urinária.<sup>6</sup>

Com a alta viscosidade, que ocorre especialmente com o uso de contrastes diméricos isomolares, poderá haver lentificação do fluxo intratubular e maior tempo de exposição celular a estas moléculas.<sup>7</sup> Nenhum dano ocorre nas organelas celulares vitais, que permanecem intactas.<sup>4</sup>

Na tentativa de evitar ou atenuar a ocorrência da NIC, diversas estratégias têm sido propostas. Embora a hidratação com cloreto ou bicarbonato de sódio seja a única medida de proteção inquestionável, dopamina,<sup>8</sup> antagonistas da adenosina,<sup>9</sup> antagonistas da endotelina,<sup>10</sup> prostaglandinas,<sup>11</sup> agonistas seletivos da dopamina<sup>12,13</sup> e antioxidantes como a n-acetil-cisteína<sup>14</sup> têm sido testados, com resultados conflitantes.

Wang *et al.*<sup>15</sup> demonstraram experimentalmente nefroproteção com Magnolin, principal componente ativo da erva *Magnolia fargesii*, que tem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Renalase, enzima monoaminaoxidase recentemente descoberta no rim, mostrou proteção contra a NIC através de mecanismos de antioxidação, antiapoptose e anti-inflamatório e parece ser uma promissora intervenção terapêutica para evitar a NIC.<sup>16</sup>

Alguns autores têm sugerido que o sexo feminino pode ser um fator de risco para a NIC.<sup>17,18</sup> Frequentemente, os estudos experimentais com contrastes radiológicos são realizados em animais do sexo masculino, embora estudos histoquímicos, autorradiográficos e ultraestruturais demonstrem diferenças ligadas ao gênero nos rins de ratos e outros roedores.<sup>19</sup>

Schiebler e Danner<sup>20</sup> observaram que existem diferenças lisossomais significativas nos três segmentos dos túbulos proximais, especialmente em S2 e S3, quando comparados animais machos e fêmeas. É possível que diferenças nestes segmentos

possam conferir variações na sensibilidade renal aos contrastes. Este estudo se propôs a avaliar as alterações histomorfológicas renais precoces da NIC em ratos Wistar machos e fêmeas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com normas de viviseção de animais descritas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto de pesquisa foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

Ratos Wistar adultos jovens, variante albina, machos e fêmeas, pesando entre 200 e 250 g, foram alojados em sala refrigerada com 12 horas de luz, temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa constantes. Os animais foram distribuídos de acordo com os grupos de tratamento, com cinco animais do mesmo sexo por gaiola de fundo de plástico com leito de maravalha esterilizada e recebendo água e ração padronizada (Nuvital®, Nutrientes SA) *ad libitum*. Para tornar os animais sensíveis à nefrotoxicidade pelo contraste, optamos pela nefrectomia unilateral e privação de água.<sup>4,21</sup>

Após permanecerem em período de adaptação por duas semanas, foram submetidos à nefrectomia esquerda sob anestesia com Ketamina 50 mg/kg de peso e Xilazina 8 mg/kg de peso por via intramuscular. No décimo quinto dia após a nefrectomia, os animais foram submetidos à privação de água por 12 horas e receberam as drogas conforme os seguintes grupos, todos constituídos por cinco animais: machos recebendo salina (G1); fêmeas recebendo salina (G2); machos recebendo diatrizoato (G3); fêmeas recebendo diatrizoato (G4).

Contraste iônico hiperosmolar, diatrizoato de sódio/meglumina (Urografina® Schering, Rio de Janeiro Brasil) foi injetado na veia caudal, na dose de 1,9 ml/kg (2,9 g de iodo/kg). Imediatamente após, os animais foram sacrificados com o uso de injeção intracardíaca de ketamina na dose de 80 mg/kg e necropsiados mediante abertura das cavidades abdominal e torácica. Amostras de tecido renal foram obtidas para estudo à microscopia ótica.

As amostras de tecido cortical renal foram fixadas em DuBosq Brasil (solução de Bouin alcoólica), processadas de acordo com a rotina histológica<sup>22</sup> para microscopia ótica para preparo de blocos de parafina e obtenção de cortes do tecido com 3 micra

de espessura. A coloração utilizada para análise foi a hematoxilina eosina (HE).

Os cortes histológicos dos rins dos grupos experimentais descritos, corados por HE, foram examinados em microscópio ótico Nikon Eclipse E400, utilizando-se condensador aplanático, objetiva 20 x 0,40 acroplan, com o objetivo de identificar áreas de tecido cortical para posterior análise morfométrica da lesão tubular proximal da NIC, caracterizada por vacúolos no epitélio de revestimento. Por meio da captura das áreas selecionadas pela câmera Evolution MP 5.0 acoplada ao computador, foram obtidas imagens para esta análise.

O estudo morfométrico foi realizado com o uso do programa de análise de imagem Image Pro-Plus 4.1 (Media Cybernetic, Silver Spring, EUA) selecionando-se “Manual Point Count”. De cada animal dos grupos selecionados para esta avaliação foram contados, no total, 100 túbulos em cortes tubulares transversais com delimitação de membrana basal tubular visível em torno da estrutura. Foram excluídos quaisquer cortes transversais que não preenchessem estes critérios. Destes 100 túbulos com a marcação determinada no sistema, foram também marcados e contados os vacúolos.

A análise estatística dos achados histopatológicos foi realizada pela técnica da Análise da Variância a dois fatores (*two-way ANOVA*): tratamento e sexo. O teste de Shapiro-Wilk avaliou a normalidade dos dados (*data normality*) nos grupos formados pelos níveis (*levels*) dos dois fatores e a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene.

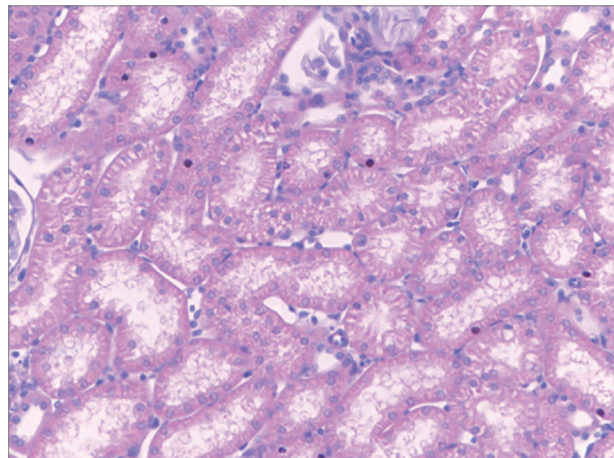
As comparações múltiplas (*pairwise comparisons*) para identificação de diferenças indicadas pela ANOVA foram realizadas pelo teste da menor diferença significativa (MDS) - *Least Significant Difference* (LSD). As decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância de 0,05 (5%).

## RESULTADOS

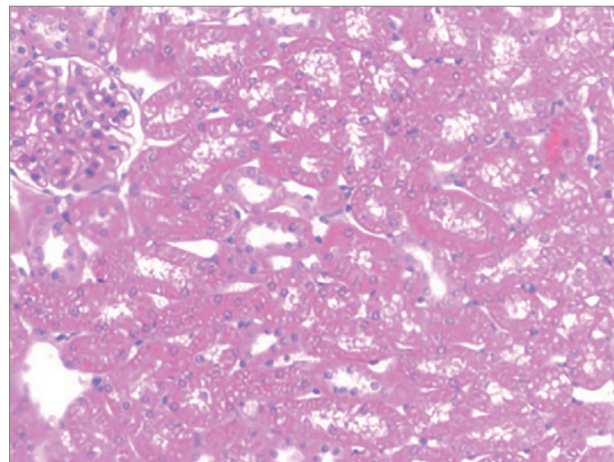
Os animais toleraram bem o tratamento e todos sobreviveram até a última etapa da experimentação. As amostras de tecido renal obtidas após a injeção do contraste mostraram grande presença de vacúolos nos túbulos proximais (Figuras 1 a 4). A ANOVA a dois fatores evidenciou diferenças estatisticamente significativas em função do tratamento: diatrizoato e

salina ( $p < 0.0001$ ), do sexo: maior em fêmeas ( $p < 0.0001$ ) e da interação entre esses dois fatores ( $p = 0.003$ ).

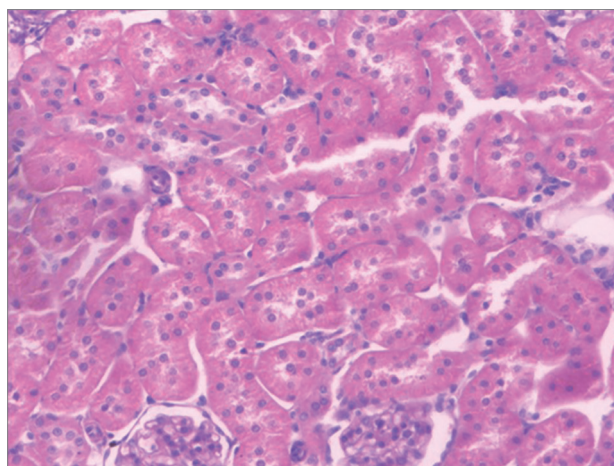
**Figura 1.** Microscopia ótica mostrando vacúolos nos túbulos proximais de ratos machos após uso de diatrizoato (HE, 20x).



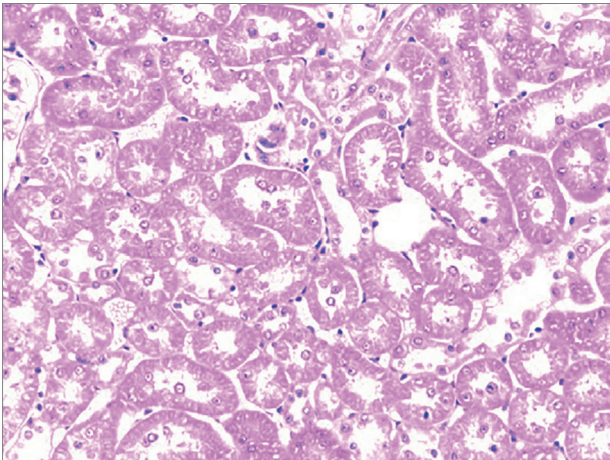
**Figura 2.** Microscopia ótica mostrando vacúolos nos túbulos proximais de ratos fêmeas após uso de diatrizoato (HE, 20x).



**Figura 3.** Microscopia ótica mostrando vacúolos nos túbulos proximais de ratos machos após administração de soro fisiológico (HE, 20x).

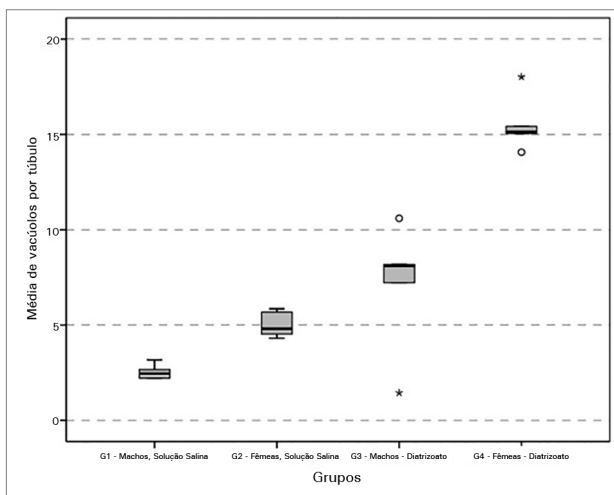


**Figura 4.** Microscopia óptica mostrando vacúolos nos túbulos proximais de ratos fêmeas após administração de soro (HE, 20x).



Os animais que receberam diatrizoato, independentemente do gênero, apresentaram significativamente maior número de vacúolos por túbulo ( $11,32 \pm 5,09$ ) do que os animais que receberam salina ( $3,78 \pm 1,42$ ),  $p < 0.0001$ . As fêmeas que receberam diatrizoato exibiram maior número médio de vacúolos por túbulo ( $15,54 \pm 1,48$ ) do que os machos ( $7,11 \pm 3,41$ ),  $p < 0.0001$  (Figura 5). Quanto à salina, machos e fêmeas não exibiram diferença estatisticamente significativa ( $2,54 \pm 0,40$  versus  $5,03 \pm 0,69$ ),  $p = 0,055$  (Figura 5).

**Figura 5.** Distribuição do número médio de vacúolos tubulares, de acordo com o tipo de tratamento e o gênero.



## DISCUSSÃO

O indicador clínico do comprometimento renal decorrente da exposição aos contrastes é a creatinina sérica, na qual se apoia a definição da NIC.<sup>2</sup> Estudos experimentais têm demonstrado que a injeção

intravascular do agente de contraste causa intensa vacuolização nos túbulos proximais, precedendo a elevação da creatinina.<sup>23</sup>

À microscopia óptica, todos os animais apresentaram intensa vacuolização das células tubulares proximais, em total concordância com os achados da literatura, que consideram a vacuolização tubular proximal uma característica da exposição ao contraste.<sup>5,21</sup>

Os animais que receberam diatrizoato mostraram média de vacúolos por túbulo três vezes maior do que a média encontrada nos grupos que receberam a solução salina. Houve diferença estatisticamente significativa do número de vacúolos na comparação entre os gêneros, com as fêmeas apresentando vacuolização 50% mais intensa que os machos.

Animais normais são resistentes à nefrotoxicidade dos meios de contraste.<sup>23</sup> A exposição aos múltiplos fatores de agressão renal, tais como uninefrectomia, depleção de sal, inibidores da ciclo-oxigenase e isquemia renal induzida, sensibiliza estes animais e permite que eles sejam utilizados como bons modelos experimentais da NIC.<sup>23</sup>

Em nosso estudo, a vacuolização epitelial tubular ocorreu em todos os animais que receberam o diatrizoato, confirmando que este protocolo foi capaz de induzir a nefrotoxicidade pelo contraste. Moreau *et al.*<sup>6</sup> analisaram material de biópsia renal de 211 pacientes, 10 dias após os mesmos terem sido submetidos à urografia venosa ou arteriografia renal. Encontraram vacuolização das células tubulares proximais em 47 casos<sup>6</sup>. Observaram que não havia, necessariamente, correlação da então denominada “nefrose osmótica” com o declínio funcional renal, o que foi confirmado em novo estudo 5 anos após.<sup>6,8</sup>

O aparecimento dos vacúolos pode ser demonstrado, experimentalmente, 5 a 15 minutos após a exposição aos contrastes.<sup>21</sup> Tervahartiala *et al.*<sup>24</sup> e Çağlar *et al.*<sup>7</sup> demonstraram vacuolização tubular após duas horas da exposição ao contraste, em protocolo bastante semelhante ao aqui apresentado. Além disso, é relatado que a vacuolização tubular é dose-dependente.<sup>6,25</sup> Batterfeld *et al.*<sup>26</sup> observaram que o processo de vacuolização induzida por doses elevadas de ioxaglato por si só não é suficiente para causar falência renal. Outros experimentos com ratos Wistar não submetidos aos vários procedimentos predisponentes de lesão renal necessitaram do uso de doses mais elevadas de contraste iodado, pelo menos

duas vezes a utilizada em nosso estudo, a fim de induzir com sucesso a nefropatia.

Embora os contrastes hiperosmolares estejam associados à maior incidência de NIC,<sup>25</sup> Tervahartiala *et al.*<sup>24</sup> relataram menor grau de vacuolização com o diatrizoato, um composto de alta osmolaridade, comparado ao iotrolan, um composto isosmolar. É possível que este achado esteja vinculado às outras propriedades físicoquímicas dos contrastes, especialmente a viscosidade, mais elevada nos compostos isoosmolares.<sup>25</sup> Nossos achados permitem supor que as alterações lisossomais não são dependentes, explicitamente, da osmolaridade dos meios de contraste.

Iakovou *et al.*,<sup>17</sup> em um estudo prospectivo envolvendo 8.628 pacientes submetidos a intervenções percutâneas com uso de contraste, concluíram que o sexo feminino é um preditor independente da NIC.<sup>7</sup> Outro estudo constatou uma maior incidência de NIC em mulheres após intervenção coronária percutânea, mas atribuiu esse fato principalmente às características de base menos favoráveis, incluindo menor taxa de filtração glomerular e maior incidência de hipertensão.<sup>18</sup> Gill *et al.*<sup>27</sup> observaram que o sexo feminino pode ser um fator de risco para a NIC e que as mulheres teriam menor proteção com a hidratação.

No entanto, um estudo mais recente não conseguiu demonstrar que o sexo, a presença de hipertensão ou o *diabetes mellitus*, o débito cardíaco e o tipo e quantidade de meio de contraste são fatores de risco significativos para a NIC em pacientes submetidos cateterização cardíaca.<sup>28</sup>

No presente estudo experimental, embora tenhamos nos limitado à avaliação precoce e apenas aos aspectos histomorfométricos, as fêmeas que receberam diatrizoato exibiram significativamente mais vacúolos por túbulo que os machos. A parte contorcida dos túbulos proximais desempenha importante papel na reabsorção de proteínas do filtrado glomerular, que são transferidas para os lisossomas, onde são degradadas e devolvidas para a circulação sanguínea.<sup>29</sup>

Silverblatt e Kuehn<sup>30</sup> demonstraram que os lisossomos são as principais organelas intracelulares para sequestro da gentamicina após captação pelas células tubulares proximais. Agentes estranhos e não digeríveis podem levar essa via à exaustão, com consequentes alterações e alargamentos do lisossomo.<sup>26</sup>

Os rins de ratos, machos ou fêmeas, possuem sítios livres de ligação para hormônios esteroides e as células dos túbulos proximais têm afinidade pelo estradiol, nas fêmeas, e pela testosterona, nos machos.<sup>19</sup> A administração de estrogênio causa alterações tubulares, especialmente lisossomais, no rato<sup>31</sup> e adenocarcinoma de túbulos proximais no hamster.<sup>31</sup>

Estas observações têm, ao nosso ver, especial interesse, já que todos os agentes de contraste induzem alterações lisossomais nas células dos túbulos proximais, e poderiam explicar nossos achados de maior intensidade da vacuolização nas fêmeas.<sup>24</sup>

O presente estudo experimental confirma a precocidade das alterações estruturais tubulares renais após administração de um meio de contraste venoso e demonstra maior intensidade do acometimento renal histológico no sexo feminino.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos a inestimável contribuição da Professora Doutora Maria Lucia Ribeiro Caldas, então Chefe do Serviço de Patologia Renal do Hospital Universitário Antônio Pedro, na avaliação histológica e morfométrica renal do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- Aspelin P, Aubry P, Fransson SG, Strasser R, Willenbrock R, Berg KJ. Nephrotoxicity in High-Risk Patients Study of Iso-Osmolar and Low-Osmolar Non-Ionic Contrast Media Study Investigators. Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *N Engl J Med* 2003;348:491-9. PMID: 12571256 DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa021833>
- Mehran R, Aymong ED, Nikolsky E, Lasic Z, Iakovou I, Fahy M, et al. A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1393-9. PMID: 15464318 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2004.06.068>
- Moreau JF, Droz D, Noel LH, Leibovitch J, Jungers P, Michel JR. Tubular nephrotoxicity of water-soluble iodinated contrast media. *Invest Radiol* 1980;15:554-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00004424-198011001-00014>
- Tervahartiala P. Contrast media-induced renal tubular vacuolization after dehydration. A light and electron microscopic study in rats. *Invest Radiol* 1992;27:114-8. PMID: 1601601 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00004424-199202000-00003>
- Tervahartiala P, Kivisaari L, Kivisaari R, Virtanen I, Standertskjöld-Nordenstam CG. Contrast media-induced renal tubular vacuolization. A light and electron microscopy study on rat kidneys. *Invest Radiol* 1991;26:882-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00004424-199110000-00009>
- Moreau JF, Droz D, Sabto J, Jungers P, Kleinknecht D, Hinglais N, et al. Osmotic nephrosis induced by water-soluble triiodinated contrast media in man. A retrospective study of 47 cases. *Radiology* 1975;115:329-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1148/115.2.329>

7. Çağlar Y, Mete UO, Kaya M. Ultrastructural evaluation of the effects of the contrast media on the rat kidney. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2001;33:443-51.
8. Gare M, Haviv YS, Ben-Yehuda A, Rubinger D, Bdoлах-Abram T, Fuchs S, et al. The renal effect of low dose dopamine in high-risk patients undergoing coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1682-8. PMID: 10577557 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00422-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00422-2)
9. Erley CM, Duda SH, Schlepckow S, Koehler J, Huppert PE, Strohmaier WL, et al. Adenosine antagonist theophylline prevents the reduction of glomerular filtration rate after contrast media application. *Kidney Int* 1994;45:1425-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1994.186>
10. Heyman SN, Clark BA, Kaiser N, Spokes K, Rosen S, Brezis M, et al. Radiocontrast agents induce endothelin release in vivo and in vitro. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:58-65.
11. 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;94:1069-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI117421>
12. Chamsuddin AA, Kowalik KJ, Bjarnason H, Dietz CA, Rosenberg MS, Gomes MD, et al. Using a dopamine type 1A receptor agonist in high-risk patients to ameliorate contrast-associated nephropathy. *AJR Am J Roentgenol* 2002;179:591-6. Erratum in: *AJR Am J Roentgenol* 2002;179:1645.
13. Kin A, Sharma SK. Managing the high-risk patient: experience with fenoldopam, a selective dopamine receptor agonist, in prevention of radiocontrast nephropathy during percutaneous coronary intervention. *Rev Cardiovasc Med* 2001;2:19-25.
14. Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 2000;343:180-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200007203430304>
15. Wang F, Zhang G, Zhou Y, Gui D, Li J, Xing T, et al. Magnolin protects against contrast-induced nephropathy in rats via antioxidation and antiapoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:203458. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/203458>
16. Zhao B, Zhao Q, Li J, Xing T, Wang F, Wang N. Renalase protects against contrast-induced nephropathy in Sprague-Dawley rats. *PLoS One* 2015;10:e0116583. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116583>
17. Iakovou I, Dangas G, Mehran R, Lansky AJ, Ashby DT, Fahy M, et al. Impact of gender on the incidence and outcome of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 2003;15:18-22.
18. Mueller C, Buerkle G, Perruchoud AP, Buettner HJ. Female sex and risk of contrast nephropathy after percutaneous coronary intervention. *Can J Cardiol* 2004;5:505-9.
19. Davidoff M, Caffier H, Schiebler TH. Steroid hormone binding receptors in the rat kidney. *Histochemistry* 1980;69:39-48. PMID: 7440259 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00508365>
20. Schiebler TH, Danner KG. The effect of sex hormones on the proximal tubules in the rat kidney. *Cell Tissue Res* 1978;192:527-49. PMID: 699030
21. Heyman SN, Brezis M, Reubinoff CA, Greenfeld Z, Lechene C, Epstein FH, et al. Acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *J Clin Invest* 1988;82:401-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI113612>
22. Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Técnicas histológicas. In: Molinaro E, Caputo LFG, Amendoeira MRR, orgs. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2*. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Instituto Oswaldo Cruz; 2010. p. 147-51.
23. Bhargava AS, Hofmeister R, Siegmund F, Schöbel C, Günzel P. Effect of tree non-ionic contrast media on rats and rabbits with regard to renal changes. *Interspecies comparison. Arzneimittelforschung* 1990;40:822-9.
24. Tervahartiala P, Kivisaari L, Kivisaari R, Vehmas T, Virtanen I. Structural changes in the renal proximal tubular cells induced by iodinated contrast media. *Nephron* 1997;76:96-102. PMID: 9171307 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000190147>
25. Gruberg L, Mintz GS, Mehran R, Gangas G, Lansky AJ, Kent KM, et al. The prognostic implications of further renal function deterioration within 48 h of interventional coronary procedures in patients with pre-existent chronic renal insufficiency. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1542-8. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)00917-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00917-7)
26. Batternfeld R, Khater A el-R, Drommer W, Guenzel P, Kaup FJ. Ioxaglate-induced light and electron microscopic alterations in the renal proximal tubular epithelium of rats. *Invest Radiol* 1991;26:35-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00004424-199101000-00007>
27. Gill NK, Piccione EA, Vido DA, Shannon RP. Gender as a risk factor for contrast nephropathy: effects of hydration and N-acetylcysteine. *Clin Cardiol* 2004;27:554-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/clc.4960271006>
28. Căldăraru CD, Dobreanu D, Dogaru M, Olariu OI, Dogaru G. Risk factors for contrast-induced nephropathy after coronary angiography. *Farmacia* 2014;4:711-20.
29. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 1966;28:435-92. PMID: 5322983 DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>
30. Silverblatt FJ, Kuehn C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 1979;15:335-45. PMID: 513493 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1979.45>
31. Lasser EC, Lyon SG, Berry CC. Reports on contrast media reactions: analysis of data from reports to the U.S. Food and Drug Administration. *Radiology* 1997;203:605-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1148/radiology.203.3.9169676>