

Roberto Meister Bernardi<sup>1</sup>, Larissa Constantino<sup>1</sup>,  
 Roberta Albino Machado<sup>1</sup>, Francieli Vuolo<sup>1</sup>,  
 Patricia Budni<sup>1</sup>, Cristiane Ritter, Felipe Dal-Pizzol<sup>1</sup>

## N-acetilcisteína e deferoxamina protegem contra insuficiência renal aguda induzida por isquemia/reperfusão em ratos

*N-acetylcysteine and deferoxamine protects against acute renal failure induced by ischemia/reperfusion in rats*

1. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC - Criciúma (SC), Brasil.

### RESUMO

**Objetivo:** Os antioxidantes são largamente utilizados em modelos animal para prevenir lesão renal após isquemia/reperfusão. Uma questão importante é se os benefícios dos antioxidantes são aditivos ou não. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos protetores da N-acetilcisteína com deferoxamina, em modelo animal, de isquemia renal/traumatismo por reperfusão.

**Métodos:** A isquemia renal bilateral foi mantida por 45 minutos. N-acetilcisteína, deferoxamina ou ambas foram administradas na aorta, acima das artérias renais, antes da isquemia. Cinco ratos de cada grupo foram sacrificados, entre 1, 6 ou 12 horas após reperfusão, para determinar a creatinina no sangue, os parâmetros

de danos oxidativos no rim e a atividade da mieloperoxidase.

**Resultados:** A associação de N-acetilcisteína e deferoxamina, mas não o uso isolado de cada uma, evitou o aumento da creatinina após isquemia/reperfusão. Tal evento foi seguido de diminuição consistente da atividade da mieloperoxidase e dos parâmetros de danos oxidativos, tanto no córtex como na medula renais.

**Conclusão:** O tratamento com N-acetilcisteína e deferoxamina mostrou-se superior ao uso de cada substância isoladamente em modelo animal de isquemia/reperfusão renal.

**Descritores:** Desferroxamina; Traumatismo por reperfusão; Insuficiência renal; Acetilcisteína; Espécies de oxigênio reativas; Ratos

Estudo realizado no Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC - Criciúma (SC), Brasil.

**Financiamento:** Esta pesquisa recebeu suporte financeiro da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM).

**Conflito de interesse:** Nenhum.

Submetido em 7 de Agosto de 2012  
 Aceito em 10 de Setembro de 2012

### Autor correspondente:

Felipe Dal-Pizzol  
 Laboratório de Fisiopatologia Experimental  
 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
 Unidade Acadêmica Ciências da Saúde  
 Universidade do Extremo Sul Catarinense  
 Avenida Universitária, 1.105  
 CEP: 88806-000 - Criciúma (SC), Brasil  
 E-mail: piz@unesc.net

### INTRODUÇÃO

A isquemia renal é observada em uma variedade de situações clínicas, como a recuperação de parada cardíaca, transplante de rim e de fígado e nefrectomia parcial. A insuficiência renal aguda (IRA) observada após isquemia é caracterizada pela diminuição glomerular da taxa de filtração, necrose tubular e aumento da resistência vascular renal.<sup>(1,2)</sup>

O processo de isquemia/reperfusão (I/R) envolve múltiplos mecanismos patofisiológicos, como o distúrbio na homeostase cálcica,<sup>(3)</sup> a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO),<sup>(4)</sup> a disfunção mitocondrial<sup>(5)</sup> e a infiltração neutrofilica.<sup>(6)</sup> A ERO tem sido demonstrada como principal componente patofisiológico da IRA durante a I/R renal,<sup>(4,7)</sup> e um componente que contribui para sua produção é o ferro. O ferro livre pode catalisar a conversão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para OH<sup>•</sup> ou formar espécie de ferril reativo ou perferril.<sup>(8)</sup> Além disso, após a I/R, observam-se ativação do endotélio e recrutamento de células neutrofilicas.<sup>(9)</sup> A migração de neutrófilos para o rim lesionado, seguida da reperfusão, leva ao aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) renal, sugerindo que substâncias cloradas desempenham um papel durante a lesão renal.<sup>(10)</sup>

Num esforço para minimizar esses eventos, alguns estudos usaram antioxidantes, como a N-acetilcisteína (NAC)<sup>(11)</sup> e a deferoxamina (DFX).<sup>(12)</sup> A NAC é um antioxidante que atua aumentando o nível intracelular de glutatona, melhorando a atividade da glutatona S-transferase e eliminando ERO.<sup>(13-15)</sup> Além disso, a sobrecarga prévia de animais com ferro<sup>(16)</sup> poderia acelerar o dano oxidativo, o que é evitado pelo uso de DFX,<sup>(17-21)</sup> sugerindo que esta poderia ter aplicação clínica na prevenção de dano oxidativo em IRA. Pelo fato de NAC e DFX conferirem proteção por meio de diferentes mecanismos, seus efeitos benéficos podem ser aditivos ou sinérgicos.<sup>(22,23)</sup>

Neste estudo, tomou-se como hipótese o fato de que NAC e DFX podem ter efeitos sinérgicos, quando administradas em modelo animal de lesão renal por I/R.

## MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (NIH) e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

### Procedimentos gerais

Ratos Wistar machos, com idades de 2 a 3 meses, pesando 300 a 350 g foram divididos em 5 grupos de tratamento, com 15 ratos cada: (1) animal submetido à cirurgia sham; (2) I/R mais solução salina; (3) I/R mais NAC (20 mg/kg); (4) I/R mais DFX (20 mg/kg); e (5) I/R mais NAC e DFX (mesmas doses dos grupos 3 e 4). Os medicamentos foram administrados em dose única antes da indução da isquemia. As doses de NAC e DFX foram baseadas em estudos anteriores do grupo do presente estudo.<sup>(24)</sup> Para o procedimento de I/R, os ratos foram anestesiados com quetamina (75 mg/kg). Realizou-se incisão mediana, sendo identificadas a aorta e as artérias renais. Os medicamentos foram administrados na aorta acima das artérias renais e, então, ambos os pedículos foram pinçados com pinças microvasculares não traumáticas. A isquemia foi mantida por 45 minutos. Após este período, a perda de fluido foi recompensada por meio da administração de 5 mL de solução salina isotônica morna, e foram removidas as pinças. Cinco ratos de cada grupo foram sacrificados entre 1, 6 e 12 horas após a reperfusão, sendo o sangue e o rim removidos e acondicionados a -80°C.

### Creatinina plasmática

A creatinina foi determinada utilizando-se um ensaio enzimático. O soro foi exposto a 2% de naftol e 0,05% de diacetil em volume final de 1 mL e calculado por espectrofotometria a 540 nm após 20 minutos. Os resultados foram expressos em miligramas por decilitros.

### Atividade da mieloperoxidase

A atividade da MPO, um índice de infiltração de leucócitos, foi calculada entre 1, 6 e 12 horas após a reperfusão, como descrito anteriormente.<sup>(25)</sup> Os rins foram homogeneizados em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugados em 15.000 g por 40 minutos. Uma alíquota de sobrenadante foi misturada a solução de 1,6 mM de tetrametilbenzidina e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade foi medida por espectrofotometria, com a variação na absorbância em 650 nm a 37°C.

### Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Os níveis teciduais de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados por um método baseado na reação com ácido tiobarbitúrico (ATB) a 90 a 100°C.<sup>(26)</sup> No teste, o malondialdeído (MDA) ou substâncias MDA-like reagiram com ATB, produzindo um pigmento rosa com absorção máxima de 532 nm.

### Dano proteico oxidativo

O dano oxidativo às proteínas foi avaliado pela determinação do conteúdo do grupo carbonil, com base na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), como descrito anteriormente.<sup>(27)</sup> As proteínas foram precipitadas pela adição de 20% de ATB e redissolvidas em DNPH; a absorbância foi monitorada em 370 nm.

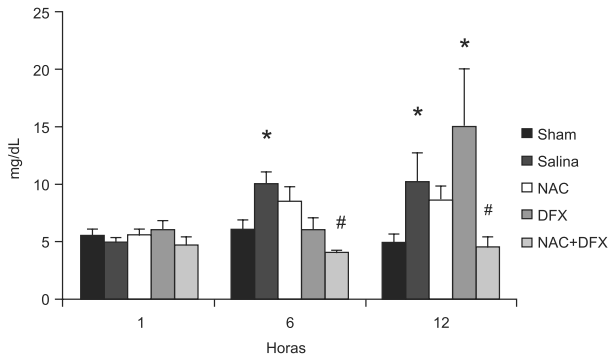
### Análises estatísticas

A diferença entre os grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA). Quando o valor de *F* foi significativo, realizaram-se comparações post hoc pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK).

## RESULTADOS

Os níveis de creatinina não diferiram entre os grupos 1 hora após reperfusão, mas aumentaram das 6 para as 12 horas, quando comparados com o grupo Sham (Figura 1). A associação de NAC e DFX, mas não o uso isolado delas, evitou esse aumento (Figura 1).

Os ratos submetidos à I/R tiveram aumento substancial na atividade de MPO no rim (Figura 2), tanto no córtex como na medula. O tratamento com NAC e DFX produziu uma maior atenuação da atividade da MPO no córtex (Figura 2A) e na medula (Figura 2B) quando comparado ao uso de uma delas isoladamente. Avaliou-se também o dano oxidativo renal (Figuras 3 e 4) e os níveis de TBARS foram, em geral, mais baixos quando a NAC e a DFX foram administradas associadas em relação à administração delas isoladamente (Figura 3). Esse efeito diferencial de NAC e DFX foi menos pronunciado quando o dano oxidativo foi avaliado utilizando carbonilas proteicas (Figura 4).

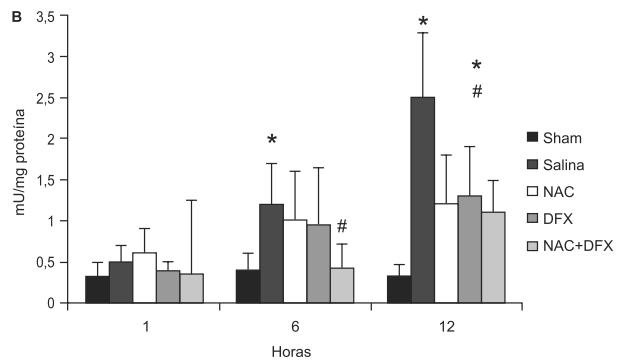
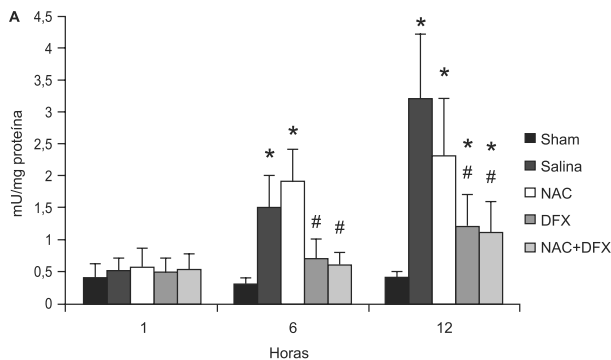


**Figura 1** - Níveis de creatinina no sangue 1, 6 e 12 horas após reperfusão. NAC - N-acetilcisteína; DFX - deferoxamina. Os dados são expressos em médias ± DP; n = 5 de cada grupo. \*p<0,05 em relação ao grupo Sham. #p<0,05 em relação ao grupo de solução salina.

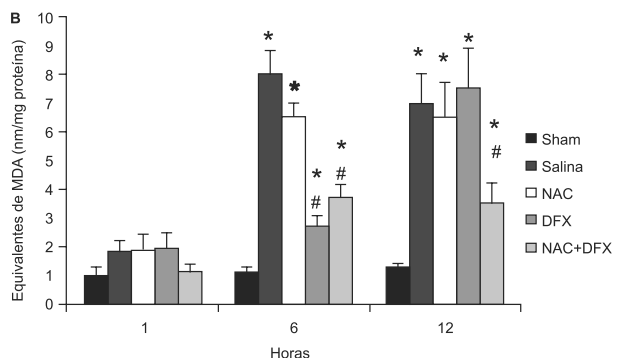
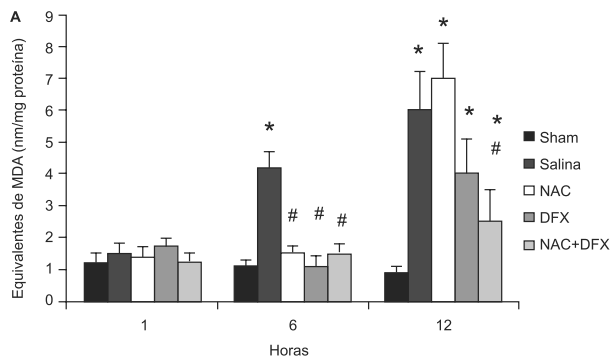
## DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se que a associação de NAC e DFX diminuiu o dano oxidativo e inflamatório nos rins após lesão por I/R em modelo animal. Uma resposta diferencial era esperada no córtex e na medula renais, dada a fisiologia hipoxêmica da medula; todavia, neste estudo, não foi possível demonstrar esse achado.

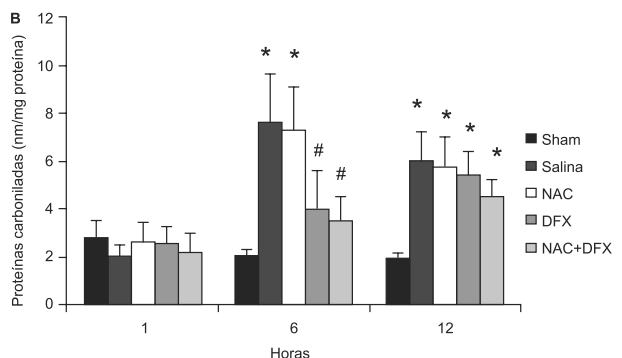
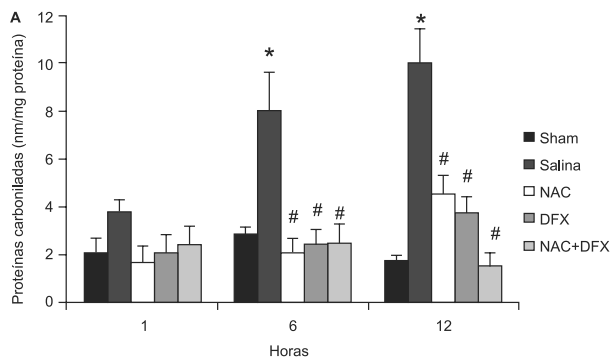
O peróxido de hidrogênio está presente em altos níveis após a reperfusão renal e é associado à produção de oxidantes derivados da MPO e à reação de Fenton. Os radicais ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio podem ser produzi-



**Figura 2** - Atividade de mieloperoxidase no córtex renal (A) e medula (B) 1, 6 e 12 horas após reperfusão. NAC - N-acetilcisteína; DFX - deferoxamina. Os dados são expressos em médias ± DP; n = 5 de cada grupo. \*p<0,05 em relação ao grupo Sham. #p<0,05 em relação ao grupo de solução salina.



**Figure 3** - Níveis de substâncias reativas a ácido tricloroacético no córtex renal (A) e medula (B) 1, 6 e 12 horas após reperfusão. MDA - malondialdeído; NAC - N-acetilcisteína; DFX - deferoxamina. Os dados são expressos em médias ± DP; n = 5 de cada grupo. \*p<0,05 em relação ao grupo Sham. #p<0,05 em relação ao grupo de solução salina.



**Figure 4** - Níveis de carbonilas proteicas no córtex renal (A) e medula (B) 1, 6 e 12 horas após reperfusão. AC - N-acetilcisteína; DFX - deferoxamina. Os dados são expressos em médias ± DP; n = 5 de cada grupo. \*p<0,05 em relação ao grupo Sham. #p<0,05 em relação ao grupo de solução salina.

dos via nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase ou pelo complexo desidrogenase mitocondrial NADPH em fagócitos (neutrófilos) ou nas células não fagócitas.<sup>(28-30)</sup> A formação de peróxido de hidrogênio pela atividade elevada de xantina oxidase ainda não se confirmou como relevante na lesão renal por reperfusão em humanos. Apesar disso, nos rins de roedores, a I/R induz a conversão de xantina desidrogenase, que utiliza a NAD oxidada como aceptor de elétrons, na xantina oxidase, na xantina oxidase, que, em contraste, utiliza o oxigênio como substrato.<sup>(31-33)</sup> Devido ao ATP ser consumido durante a isquemia, a xantina e a hipoxantina podem se acumular; na presença de oxigênio, o radical ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio poderiam ser produzidos durante a reperfusão.<sup>(34)</sup> A xantina oxidase encontrada em células endoteliais renais poderia contribuir, em parte, para lesão oxidativa microvascular que ocorre seguida da reperfusão.<sup>(35,36)</sup> Nesse contexto, os antioxidantes foram largamente utilizados em modelos experimentais na tentativa de evitar essas variações, porém poucos estudos consideraram o papel das associações antioxidantes. Shokeir et al. demonstraram que a associação de alfa-tocoferol e L-arginina tem maior efeito protetor e efeito sinérgico antioxidante em modelo animal de transplante de lesão por I/R.<sup>(37)</sup> Além disso, a associação de NAC e ebselen evita a dano renal mais do que o uso de cada droga separadamente,<sup>(38)</sup> e o mesmo padrão de proteção foi observado no uso da erdoesteína e do alfa-tocoferol.<sup>(39)</sup> Previamente, os autores deste estudo demonstraram, em diferentes modelos de doenças inflamatória, que a associação de NAC e DFX é superior ao uso isolado de antioxidante.<sup>(24,40-42)</sup> Neste estudo, é possível confirmar os resultados prévios em modelo de I/R renal. Provavelmente essas ações sinérgicas estão relacionadas à capacidade de remover mais de um tipo de radical ou por evitar a possível produção de antioxidantes de radicais livres. Na verdade, esses achados são de grande relevância para NAC, que pode produzir ra-

dicais thiyl na presença de ferro; assim, o efeito quelante de ferro DFX pode evitar o estresse oxidativo NAC-induzido.

## CONCLUSÃO

O tratamento com a associação de NAC e DFX foi superior ao uso isolado das substâncias em modelo animal de I/R renal, sugerindo que a disponibilidade de ferro pode representar um papel relevante no processo da doença ou na eficácia da NAC.

## ABSTRACT

**Objective:** Antioxidants are widely used in animal models to prevent renal injury after ischemia/reperfusion, but it is unknown if the benefits of antioxidants are additive. In this study, we aimed to investigate the protective effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in an animal model of kidney ischemia/reperfusion injury.

**Methods:** Bilateral kidney ischemia was maintained for 45 minutes. N-acetylcysteine, deferoxamine or both were administered into the aorta above the renal arteries immediately prior to induction of ischemia. Five rats from each group were sacrificed 1, 6 or 12 hours after reperfusion for the determination of blood creatinine, kidney oxidative damage parameters and myeloperoxidase activity.

**Results:** The combination of N-acetylcysteine and deferoxamine, but not their isolated use, prevented the increase in creatinine after ischemia/reperfusion. This prevention was followed by a consistent decrease in myeloperoxidase activity and oxidative damage parameters both in the kidney cortex and medulla.

**Conclusion:** Treatment with N-acetylcysteine and deferoxamine was superior to the isolated use of either compound in an animal model of kidney ischemia/reperfusion.

**Keywords:** Deferoxamine; Reperfusion injury; Renal insufficiency; Acetylcysteine; Reactive oxygen species; Rats

## REFERÊNCIAS

1. Biology of acute renal failure: therapeutic implications. *Kidney Int.* 1997;52(4):1102-15.
2. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med.* 1996;334(22):1448-60. Review.
3. Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. *Ann Thorac Surg.* 1996;61(4):1273-80.
4. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg.* 1996;83(2):162-70.
5. Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol.* 1983;244(6):H743-8.
6. Lauriat S, Linas SL. The role of neutrophils in acute renal failure. *Semin Nephrol.* 1998;18(5):498-504.
7. Paller MS, Jacob HS. Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(15):7002-6.
8. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85. Review.
9. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000;80(5):617-53.
10. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77(5):598-625.
11. Erbas H, Aydogdu N, Kaymak K. Effects of N-acetylcysteine on arginase, ornithine and nitric oxide in renal ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res.* 2004;50(5):523-7.
12. Huang H, He Z, Roberts LJ 2nd, Salahudeen AK. Deferoxamine reduces cold-ischemic renal injury in a syngeneic kidney transplant model. *Am J Transplant.* 2003;3(12):1531-7.

13. Spapen H. N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage. *Crit Care*. 2004;8(4):229-30.
14. Hsu BG, Lee RP, Yang FL, Harn HJ, Chen HI. Post-treatment with N-acetylcysteine ameliorates endotoxin shock-induced organ damage in conscious rats. *Life Sci*. 2006;79(21):2010-6.
15. Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31(11):2574-8.
16. Wu ZL, Paller MS. Iron loading enhances susceptibility to renal ischemia in rats. *Ren Fail*. 1994;16(4):471-80.
17. Paller MS, Hedlund BE. Extracellular iron chelators protect kidney cells from hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Biol Med*. 1994;17(6):597-603.
18. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int*. 1998;53(2):394-401.
19. de Vries B, Walter SJ, von Bonsdorff L, Wolfs TG, van Heurn LW, Parkkinen J, et al. Reduction of circulating redox-active iron by apotransferrin protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2004;77(5):669-75.
20. Shah SV, Walker PD. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. *Am J Physiol*. 1988;255(3 Pt 2):F438-43.
21. Paller MS. Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol*. 1988;255(3 Pt 2):F539-44.
22. Klebanoff SJ, Wallersdorff AM, Michel BR, Rosen H. Oxygen-based free radical generation by ferrous ions and deferoxamine. *J Biol Chem*. 1989;264(33):19765-71.
23. Zager RA, Foerster CA. Effects of inorganic iron and myoglobin on in vitro proximal tubular lipid peroxidation and cytotoxicity. *J Clin Invest*. 1992;89(3):989-95.
24. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med*. 2004;32(2):342-9.
25. Liaudet L, Mabley JG, Soriano FG, Pacher P, Marton A, Haskó G, et al. Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7):1213-20.
26. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31.
27. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994;233:346-57.
28. Maruyama Y, Lindholm B, Stenvinkel P. Inflammation and oxidative stress in ESRD-- the role of myeloperoxidase. *J Nephrol*. 2004;17 Suppl 8:S72-6.
29. González-Flecha B, Boveris A. Mitochondrial sites of hydrogen peroxide production in reperfusion rat kidney cortex. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1243(3):361-6.
30. Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 1):L897-902.
31. McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U, Jones HP. Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol*. 1988;254(5 Pt 1):G753-60.
32. Linas SL, Whittenburg D, Repine JE. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1990;258(3 Pt 2):F711-6.
33. Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces O<sub>2</sub><sup>-</sup> in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol*. 1992;263(2 Pt 2):F251-5.
34. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988;255(6 Pt 2):H1269-75. Review.
35. Kooij A, Schijns M, Frederiks WM, Van Noorden CJ, James J. Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues--a histochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1992;63(1):17-23.
36. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest*. 1999;79(8):967-74.
37. Shokeir AA, Barakat N, Hussein AA, Awadalla A, Abdel-Aziz A, Abo-Elenin H. Role of combination of L-arginine and -tocopherol in renal transplantation ischaemia/reperfusion injury: a randomized controlled experimental study in a rat model. *BJU Int*. 2011;108(4):612-8.
38. Kizilgun M, Poyrazoglu Y, Oztas Y, Yaman H, Cakir E, Cayci T, et al. Beneficial effects of N-acetylcysteine and ebselen on renal ischemia/reperfusion injury. *Ren Fail*. 2011;33(5):512-7.
39. Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Pi kin MM, Avunduk MC, Ertemli E, Gokçe G, et al. Combination antioxidant effect of -tocopherol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model. *Int Urol Nephrol*. 2010;42(3):647-55. Erratum in *Int Urol Nephrol*. 2010;42(3):657. Gokçe, Gürhan [added].
40. Ritter C, Cunha AA, Echer IC, Andrades M, Reinke A, Lucchiarri N, et al. Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med*. 2006;34(2):471-7.
41. Petronilho F, Constantino L, de Souza B, Reinke A, Martins MR, Fraga CM, et al. Efficacy of the combination of N-acetylcysteine and deferoxamine in the prevention and treatment of gentamicin-induced acute renal failure in male Wistar rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(7):2077-82.
42. Fraga CM, Tomasi CD, Biff D, Topanotti MF, Felisberto F, Vuolo F, et al. The effects of N-acetylcysteine and deferoxamine on plasma cytokine and oxidative damage parameters in critically ill patients with prolonged hypotension: a randomized controlled trial. *J Clin Pharmacol*. 2012;52(9):1365-72.