

Rodrigo Frezzatti

**Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no reparo
de alterações renais induzidas por isquemia renal e
envenenamento crotálico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Toxinologia do Instituto Butantan, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

Rodrigo Frezzatti

**Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no reparo
de alterações renais induzidas por isquemia renal e
envenenamento crotálico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Toxinologia do Instituto Butantan, para a obtenção do título do Doutor em Ciências.

Orientador: Paulo Flavio Silveira

São Paulo
2017

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Rodrigo Frezzatti, aluno de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha tese por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta tese após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da tese após a data da defesa:

() Imediato

() 06 meses

(X) 12 meses

() Não autorizo a divulgação

Justifique: Prazo necessário para a publicação de artigo científico

São Paulo, de de

.....
aluno(a)

De acordo:.....

**POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN**

**RESULTADO DA DEFESA DE TESE
DOUTORADO**

NOME DO ALUNO:.....

DATA DO EXAME:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
_____	_____	()	()
(Presidente)			
_____	_____	()	()
_____	_____	()	()
_____	_____	()	()
_____	_____	()	()

DECISÃO FINAL: APROVADO () REPROVADO ()

Comentários da Banca (opcional):

Aos meus pais, familiares, amigos
e todas as pessoas que confiaram,
aconselharam, acalmaram, deram
força, me formaram e fizeram de
mim o que sou hoje.

O meu eterno agradecimento!

AGRADECIMENTOS

A Deus e todos os meus guias.

Aos meus pais Vera Lúcia Pradella e Moacir Frezzatti, pelo apoio incondicional, por nunca me deixarem desistir, por toda força, companheirismo, carinho, amor e dedicação que me deram ao longo de todo o trabalho, principalmente nos momentos difíceis, faltariam palavras para dizer o quanto sou grato e o quanto vos amo, sem vocês esse trabalho não seria concluído.

Ao meu orientador Dr. Paulo Flávio Silveira e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Toxinologia do Instituto Butantan por todo o apoio e permissão para realizar esse trabalho.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Toxinologia do Instituto Butantan Kimie Simokomaki e Rosana Coelho por todo o apoio.

A Dra. Catarina de Fátima Teixeira por ceder gentilmente sua sala de cultura para o desenvolvimento do trabalho.

A Dra. Mayana Zatz e Dr. Eder Zucconi pela ajuda na imunofenotipagem.

Ao grupo do Dr. Luiz Fernando Onuchic por ensinar a técnica de indução de isquemia renal.

Aos meus colegas de trabalho Dra. Rafaela Fadoni Alponi Vendrame, Ma. Mariana Trivillin Mendes, Ma. Patrícia Lúcio Alves, Me. Eduardo Frare, Dr. Elbio Leiguez Junior, Dra. Cristina Fernandes, Marcelo Florencio, Michele Marinho e tantos outros que não caberiam aqui, obrigado pelo companheirismo, paciência, inspiração e dedicação ao longo desses anos, todos sabemos o quão difíceis são os obstáculos para chegar até aqui, se eu consegui passar por eles, também foi graças a vocês meus amigos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) por outorgar a bolsa de doutorado que usufruí.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

“Quem tem medo assimila toda forma de expressão como protesto.”

Fernando Anitelli

RESUMO

Frezzatti, Rodrigo. Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no reparo de alterações renais induzidas por isquemia renal e envenenamento crotálico. 2017. 83f. Tese (Ciências - Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2017

O envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* pode levar à insuficiência ou injúria renal aguda (IRA), caracterizada pela incidência de 100% de hiperuricemia e 60% de hipercreatininemia, bem como estresse oxidativo no córtex e medula renal. Por sua vez, sabe-se que a isquemia diminui o suprimento de oxigênio e nutrientes e, quando ocorre no tecido renal, gera IRA. As células-tronco mesenquimais (CTMs) de tecido adiposo são genética e morfologicamente muito estáveis em cultura. Além disso, apresentam baixa senescência, altas capacidade proliferativa e propriedades imunomoduladoras, bem como certa eficácia no tratamento da IRA experimental induzida por isquemia. O presente estudo avaliou a hipótese da eficiência da terapia com CTMs sobre as sequelas renais em camundongos sobreviventes à IRA associada ao modelo experimental de hiperuricemia induzida pelo veneno de *C. d. terrificus* (*vCdt*), comparativamente àquelas associadas à isquemia bilateral induzida por clameamento dos pedículo renais. As CTMs foram isoladas a partir do tecido adiposo de camundongos. A imunofenotipagem das CTMs foi realizada com os marcadores de superfície celular CD13, CD29, CD44, CD90, CD105; CD31, CD34 e CD45, bem como por ensaio de diferenciação (adipócito, osteócito e condrócito). A função renal (ácido úrico, creatinina, ureia e proteína no plasma e urina) e o estresse oxidativo (glutaciona reduzida, glutaciona oxidada e malondialdeído no cortex e medula renal) foram medidos em intervalos de tempo ao longo de 96h, ou até 7 dias se não ocorreu melhora ou recuperação em 96h, em animais controles sadios e em animais envenenados com 80%DL50 *vCdt* i.p (*vCdt*), ou submetidos à isquemia bilateral (Isq bil), e nesses mesmos grupos animais tratados com 10^5 CTMs/0,2 mL /animal, administrados na veia da cauda, durante 3 dias consecutivos, em intervalos de 24 h após o procedimento de administração de PBS nos animais controle, ou indução da IRA nos demais. O *vCdt* induziu maior e mais prematura letalidade que a Isq bilateral, a qual é atribuível à hiperuricemia em *vCdt*, um fator diferencial desse modelo de indução de IRA em relação ao da Isq bil. Essa letalidade foi restrita a 24 h

e 72 h, respectivamente em *vCdt* e na *Isq bil*, sem ocorrências posteriores. As sequelas da indução de IRA isquêmica bilateral nos animais sobreviventes, após 48h da indução, foram hipercreatinemia, hiperuremia e hipercreatinúria graves, bem como estresse oxidativo. As sequelas da indução de IRA pelo *vCdt* nos animais sobreviventes, após 48 h da indução, foram hipercreatinemia grave, hiperuricosúria e hipercreatinúria leves, bem como estresse oxidativo. Após 96 h de indução da IRA, o tratamento com CTMs restaurou a uremia e o estresse oxidativo nos animais isquêmicos e restaurou o estresse oxidativo, a creatinemia e a creatinúria nos animais envenenados. As sequelas da indução de IRA isquêmica bilateral nos animais sobreviventes, após 7 dias da indução, considerado no presente estudo como um período máximo para a manifestação de algum efeito terapêutico das CTMs de suficiente interesse para a consolidação da função renal pós-IRA, foram leve degeneração e proliferação celular no glomérulo, bem como presença de infiltrado celular e severas degeneração e necrose tubulares, além da hipercreatinemia grave. As sequelas da indução de IRA pelo *vCdt* nos animais sobreviventes, após 7 dias da indução, foram leves degeneração e proliferação glomerulares, bem como moderada degeneração tubular. Após 7 dias de indução da IRA, o tratamento com CTMs melhorou o grau de degeneração e necrose glomerular e tubular nos animais envenenados, assim como melhorou a creatinemia e o grau de infiltração inflamatória nos animais isquêmicos. Essa eficiência terapêutica potencial das CTMs nas sequelas da IRA induzida pelo envenenamento crotálico oferece nova perspectiva para a abordagem clínica da IRA hiperuricêmica, bem como sugere a importância de futuros estudos sobre os mecanismos de ação indireta e/ou direta das CTMs nesse tipo de IRA e sobre o efeito da administração precoce das CTMs na letalidade das IRAs em geral.

Palavras-chave: Insuficiência renal aguda, Hiperuricemia, Isquemia e Reperfusão, Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo, *Crotalus*.

ABSTRACT

Frezzatti, Rodrigo. Mesenchymal stem cells from adipose tissue in the repair of renal changes induced by renal ischemia and *Crotalus* envenomation. 2017. 83p. Doctoral thesis (Science - Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2017.

Crotalus durissus terrificus envenomation may lead to acute renal insufficiency or failure (ARF) characterized by 100% hyperuricemia and 60% hypercreatininemia, as well as oxidative stress in the renal cortex and medulla. In turn, ischemia is known to decrease the supply of oxygen and nutrients and when occurs in the renal tissue it can generate ARF. Mesenchymal stem cells (MSCs) from adipose tissue are genetically and morphologically very stable under cell culture conditions. Furthermore, MSCs have low senescence and high proliferative capacity and immunomodulatory properties, as well as certain efficacy in the treatment of experimental ischemia-induced ARF. The present study evaluated the hypothesis that MSCs therapy could be efficient on renal sequelae in mice that survive to ARF associated with the experimental model of hyperuricemia induced by *C. d. terrificus* venom (*vCdt*), compared to ARF associated with bilateral ischemia induced by renal pedicle clamping. MSCs were isolated from mouse adipose tissue. The immunophenotyping of MSCs was performed using cell surface markers CD13, CD29, CD44, CD90, CD105; CD31, CD34 and CD45, as well as by differentiation assay (adipocyte, osteocyte and chondrocyte). Renal function (uric acid, creatinine, urea and protein in plasma and urine) and oxidative stress (reduced glutathione, oxidized glutathione and malondialdehyde in the cortex and renal medulla) were measured at intervals over 96 h, or up to 7 days if amelioration or restoration did not occur in 96 h, in healthy control mice and in mice envenomed with 80%LD50 *vCdt* i.p (*vCdt*), or subjected to bilateral ischemia (*Isq bil*), and in these same animal groups treated with 10^5 MSCs / 0.2 mL / animal, administered in the tail vein, for 3 consecutive days at 24 h intervals following the PBS administration procedure in the control animals, or ARF induction in the others. The *vCdt* induced higher and more premature lethality than bilateral *Isq*, which is attributable to hyperuricemia in *vCdt*, that is a differential factor of this ARF model in relation to *Isq bil* model. This lethality was restricted to 24 h and 72 h, respectively in *vCdt* and *Isq bil*, with no subsequent

occurrences. The sequelae of bilateral ischemic ARF induction in the survivors after 48 h of induction were severe hypercreatinemia, hyperuremia and hypercreatinuria, as well as oxidative stress. The sequelae of the induction of ARF by vCdt in the survivors after 48 h of induction were severe hypercreatinemia, mild hyperuricosuria and hypercreatinuria, as well as oxidative stress. After 96 h of ARF induction, the treatment with MSCs restored uremia and oxidative stress in the ischemic mice, as well as restored oxidative stress, creatinemia and creatinuria in the envenomed mice. The sequelae of bilateral ischemic ARF in survivors after 7 days of induction, considered in the present study as a maximum period for the manifestation of any therapeutic effect of MSCs with sufficient interest for the consolidation of renal function after ARF, were mild glomerular degeneration and proliferation, as well as the presence of cellular infiltrate and severe tubular degeneration and necrosis, in addition to severe hypercreatinemia. The sequelae of the induction of ARF by vCdt in survivors after 7 days of induction were mild glomerular degeneration and proliferation, as well as moderate tubular degeneration. After 7 days of induction of ARF, the treatment with MSCs ameliorated the level of glomerular and tubular degeneration and necrosis in the envenomed animals, as well as ameliorated creatinemia and the level of inflammatory infiltration in ischemic animals. This potential therapeutic efficacy of MSCs in the sequelae of ARF induced by crotalic envenomation offers a new perspective for the clinical approach of hyperuricemic ARF, as well as suggests the importance of future studies on indirect and / or direct mechanisms of MSCs action in this type of ARF and on the effect of early administration of MSCs on the lethality of ARF in general.

Keywords: Acute renal failure, Hyperuricemia, Ischemia and reperfusion, Mesenchymal stem cells from adipose tissue, *Crotalus*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Envenenamento por <i>Crotalus durissus terrificus</i> como problema de saúde pública e como modelo de insuficiência renal hiperuricêmica - doenças relacionadas com a hiperuricemia	8
1.2 Modelos experimentais de IRA induzida por isquemia renal e doenças relacionadas	12
1.3 Células-tronco mesenquimais (CTMs) do tecido adiposo: uso terapêutico	15
1.4 Justificativas do estudo	19
2. OBJETIVO	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
2.2.1. Diferenciar as peculiaridades dos efeitos renais e sobre a letalidade entre a isquemia bilateral e o envenenamento crotálico em intervalos de tempo até 7 dias	20
2.2.2. Diferenciar os efeitos renais e sobre a letalidade entre os tratamentos com CTMs do tecido adiposo nos indivíduos sobreviventes aos efeitos de curto prazo da IRA induzida pela isquemia bilateral e pelo	

envenenamento crotálico, em intervalos de tempo suficientes para a melhora ou recuperação em até 7 dias.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Reagentes	21
3.2 Animais	22
3.3 Tratamentos	22
3.4 Preparo da solução de vCdt	23
3.5 Indução de isquemia renal	24
3.6 Isolamento de CTMs do tecido adiposo	24
3.7 Marcadores de superfície celular	25
3.8 Diferenciação celular	25
3.9 Letalidade	26
3.10 Obtenção de rins, coleta de urina e plasma	26
3.11 Proteína total	27
3.12 Creatinina, ácido úrico e ureia	27
3.13 Estresse oxidativo	28

3.14 Histologia	29
3.15 Análise dos dados	29
4. RESULTADOS	31
4.1 Isolamento e cultura de CTMs aderentes do tecido adiposo ..	31
4.2 Caracterização e análise imunofenotípica das CTMs	32
4.3 Potencial de diferenciação em multilinhagens	34
4.4 Avaliação da letalidade, função renal, estresse oxidativo e histopatologia renal na isquemia bilateral e na hiperuricemia sem e com tratamento com CTM	36
5. DISCUSSÃO	54
5.1 Comparação da IRA induzida por isquemia bilateral e por hiperuricemia e suas implicações fisiopatológicas	54
5.2 Validação dos efeitos na função renal e no estresse oxidativo do tratamento com CTMs no modelo de indução de IRA por isquemia bilateral	61
5.3 As CTMs melhoram a função renal e o estresse oxidativo na IRA hiperuricêmica: possíveis implicações nas doenças relacionadas com a hiperuricemia e no tratamento do envenenamento crotálico	64

6.	CONCLUSÕES	68
7.	BIBLIOGRAFIA	69

Lista de abreviaturas

AKIN - Acute Kidney Injury Network

Ang – Angiotensina

ARF - Acute renal failure

AT – Receptor de angiotensina

BSA - Albumina sérica bovina

CDN - Células dendríticas

CTMs - Células-tronco mesenquimais

CXCL11 - Quimiocina CXC induzida por interferon gama

CXCR3 - Receptor de quimiocina CXC tipo 3

CXCR4 - Receptor de quimiocina CXC tipo 4

DMEM-low - Dulbecco's modified Eagle's medium low-glucose

DMSO - Dimetilsulfóxido

ECA - Enzima conversora de angiotensina

Erk1/2 - Quinases reguladas por sinal extracelular 1/2

EROS – Espécies reativas de oxigênio

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GSH - Glutathiona reduzida

GSSG - Glutathiona oxidada

i.p – Intraperitoneal

i.v – intravenosa

IDO - Indoleamina 2, 3-dioxigenase

IFN- γ - Interferon gama

IL - Interleucina

IRA - Insuficiência ou injúria renal aguda

Isq bil – Isquemia bilateral

Isq unil – Isquemia unilateral

JNK - c-Jun N-terminal quinase

LPA - Ácido lisofosfórico

MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MCP-1 - Proteína quimioatratadora de monócitos 1

MDA - Malondialdeído

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
NK - Células exterminadoras naturais ou "natural killers"
NO – Óxido nítrico
NOD - Receptores proteicos com domínio de oligomerização de nucleotídeos
OPT - ortofitaldealdeído
PA – Pressão Arterial
PBEDTA - Tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, contendo 0,005 M de EDTA
PBS - Solução salina fosfato tamponada estéril
PGE2 - Prostaglandina E2
PI3K - Fosfatidilinositol - 3 - quinase
RAAS - Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RAS - Sistema renina-angiotensina
RIFLE - Risco, lesão, falha, perda e estágio final da doença renal
RohA - Família de genes homólogos a Ras, membro A
SDF-1 - Fator 1 derivado da célula estromal
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro fetal bovino
STAT5 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TNF - Fator de necrose tumoral
TSG-6 - Proteína indutora do fator de necrose tumoral 6
vCdt - veneno de *Crotalus durissus terrificus*
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* como problema de saúde pública e como modelo de insuficiência renal hiperuricêmica - doenças relacionadas com a hiperuricemia

A Organização Mundial da Saúde estima que há cerca de 2,5 milhões de acidentes anuais envolvendo serpentes peçonhentas, dos quais decorrem 125 mil mortes em todo o mundo. De 1990 a 1993, o Ministério da Saúde do Brasil informou 81.611 acidentes ofídicos no país, com uma média de 20.000 casos por ano, sendo que em 2013 este número subiu para 25.302 (PINHO et al., 2000; KASTURIRATNE et al., 2008; CRUZ et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). As picadas por serpentes do gênero *Crotalus* são responsáveis por aproximadamente 10% destes acidentes - e são os acidentes relacionados com este gênero que causam a maior mortalidade (cerca de 2%) entre aqueles registrados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; CRUZ et al., 2009; BUCARETCHI et al., 2013). Dentre as espécies de *Crotalus*, a *Crotalus durissus terrificus* é a que causa o maior número de acidentes no Brasil (CRUZ et al., 2009). Uma complicação do envenenamento crotálico é a insuficiência, ou injúria renal aguda (IRA), geralmente de instalação nas primeiras 48 horas (AMARAL et al., 1986; RIBEIRO et al., 1998; MONTEIRO et al., 2001; AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; PINHO et al., 2005), caracterizada pela diminuição, ou perda aguda das funções renais (NEEDHAM et al., 2005). A IRA gerada por diferentes causas afeta, anualmente, cerca de 13 milhões de pessoas em todo o mundo, dela decorrendo cerca de 1,7 milhões de mortes (DUANN et al., 2016).

Estima-se que 10-15% das IRAs em geral, independentemente do agente indutor, são provocadas por rabdomiólise (MONTEIRO et al., 2001). Todavia, embora a miotoxidade do veneno crotálico certamente contribua com a IRA, não está claro se a consequente rabdomiólise (levando à obstrução tubular por cristais de mioglobina) é o fator patogênico primordial. Efeito tóxico direto da mioglobina, ou de produtos de sua decomposição, ou do ácido úrico, ou isquemia renal por ação de

substâncias vasoconstritoras estão entre os mecanismos propostos (AZEVEDO MARQUES et al., 2003; YAMASAKI et al., 2008; FREZZATTI & SILVEIRA, 2011). A literatura propõe 30 definições diferentes para a IRA, o que dificulta a sistematização de seu estudo e o desenvolvimento de tratamentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007). Até 2004, não haviam critérios padronizados para o diagnóstico de IRA. Naquele ano, o grupo AKIN (Acute Kidney Injury Network) desenvolveu o sistema chamado de RIFLE (risco, lesão, falha, perda e estágio final da doença renal), por meio de um consenso entre especialistas de todo o mundo, com o objetivo de padronizar a definição de IRA para fins clínicos e de pesquisa. Este sistema pressupõe que há três graus de gravidade da IRA, definidos com base nas alterações da creatinina sérica ou no volume de urina produzida, além de critérios definidos pela duração da perda da função renal (HOSTE & KELLUM, 2006; SRISAWAT & KELLUM, 2011; HUSI & HUMAN, 2015). A IRA tem sido classificada, segundo sua etiologia, em pré-renal, renal e pós-renal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA; NUNES et. al., 2010). Processos extra- e intra-renais estão envolvidos na IRA em geral, independentemente do agente indutor, causando o declínio da função renal (CHOUDHURY, 2010). Os processos intra-renais são os mais devastadores. Destes processos, os mais frequentes são lesão isquêmica por hipoperfusão renal, sepse, hemorragia, lesões nefrotóxicas por toxinas tubulares, assim como o risco de doenças vasculares. A letalidade associada à lesão renal aguda é cerca de 10 vezes maior que em indivíduos normais, o que ocorre pela dificuldade de tratamento específico quando a IRA já está instalada, visando manter o equilíbrio hidroeletrólítico e a volemia. A IRA manifesta-se por elevação aguda (início 24 a 48 horas), porém reversível (máximo de três a cinco dias, com reversão no decorrer de uma semana) dos níveis sanguíneos de ureia e creatinina (CHOUDHURY, 2010; NUNES et. al., 2010). Muitas drogas têm sido usadas para o tratamento e prevenção da IRA, como diuréticos, manitol, dopamina, peptídeo natriurético atrial e a n-acetil-L-cisteína (UCHINO, 2006). A IRA pré-renal é a etiologia mais comum, sendo uma resposta fisiológica à hipoperfusão renal, sem defeito estrutural nos rins. Um fator que pode levar a esta situação é o uso de fármacos, como anti-inflamatórios não-esteroidais e inibidores da enzima conversora de angiotensina. O diagnóstico é de suma importância, pois há reversibilidade do caso em um a dois dias, mas se a condição persistir pode levar à necrose tubular

aguda (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007; NUNES et. al., 2010). Na tentativa de manter o equilíbrio hidrossalino, a angiotensina (Ang) II aumenta a reabsorção de água e sódio pelo néfron proximal, a aldosterona aumenta a reabsorção de água e sódio no néfron distal e a vasopressina aumenta a reabsorção de água no néfron distal, induzindo oligúria, urina concentrada, com mínima quantidade de sódio (NUNES et. al., 2010). A IRA pós-renal é a que tem a menor prevalência dentre os três tipos classificados e denota a ocorrência de obstrução, com efeito renal bilateral ou unilateral, tal como ocorre na obstrução da uretra, do colo vesical e do ureter (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007; NUNES et. al., 2010). A obstrução do colo vesical é a causa mais comum e, em geral, é decorrente de doença prostática, bexiga neurogênica ou tratamento com anticolinérgicos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007; NUNES et. al., 2010). A obstrução aguda inicialmente produz vasodilatação arteriolar, com aumento da taxa de filtração glomerular. Em seguida, são produzidas substâncias vasoconstrictoras, reduzindo a taxa de filtração glomerular. Se a obstrução permanecer de duas a quatro semanas, pode ocorrer fibrose intersticial, atrofia tubular progressiva e nefropatia obstrutiva crônica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007; NUNES et. al., 2010). A IRA renal é caracterizada por necrose focal do epitélio tubular, com descolamento de sua membrana basal e oclusão da luz tubular por cilindros constituídos de células epiteliais íntegras ou em degeneração, restos celulares ou mucoproteínas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007; NUNES et. al., 2010), sendo que na maioria dos casos é desencadeada por isquemia ou nefrotoxinas. Na necrose tubular aguda por hipoperfusão, há lesão isquêmica das células intraparenquimatosas renais, principalmente do epitélio tubular, podendo ocorrer recuperação em uma a duas semanas após a reperfusão renal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007; NUNES et. al., 2010). Caso não ocorra recuperação da perfusão renal, pode haver evolução para necrose cortical renal bilateral e insuficiência renal irreversível. A IRA renal por nefrotoxinas é mais incidente em idosos e pacientes com doença renal pré-existente. As nefrotoxinas endógenas mais comuns são o cálcio, a mioglobina, a hemoglobina, o urato, o oxalato e as cadeias leves do mieloma (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007; NUNES et. al., 2010). Nesse sentido, o efeito nefrotóxico direto do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (vCdt) (na ausência de sinais de

miotoxicidade) em camundongos é um exemplo de IRA renal. Neste caso, sabe-se que há duas características marcantes: incidência de 100% de hiperuricemia e 60% de incidência de hipercreatininemia, sem aumento de malondialdeído (MDA), mas com aumento da relação glutatona oxidada (GSSG)/glutaciona reduzida (GSH) no córtex e medula renal, indicando a presença de estresse oxidativo (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010; FREZZATTI & SILVEIRA, 2011). Embora a hiperuricemia também tenha sido observada em humanos picados por *Crotalus durissus terrificus* (MAGALHÃES et al., 1986) e outras espécies de serpentes (KANJANABUCH & SITPRIJA, 2008), antes do relato de Frezzatti & Silveira (2011) este parâmetro não havia recebido atenção como um fator relevante na etiologia da IRA, principalmente porque, de acordo com as recomendações da AKIN, os principais parâmetros alterados que identificariam a IRA seriam os valores absolutos de creatinina sérica, ureia plasmática e volume urinário (PINHO et al., 2005; CERDÁ et al., 2008; DAVENPORT, 2008; MEHTA et al., 2007). No entanto, sabe-se que em muitas situações a IRA está associada a um aumento do ácido úrico plasmático, como resultado tanto do aumento na produção, como da diminuição na excreção (EJAZ et al., 2007). A hiperuricemia maior que o valor máximo da faixa normal (FEIG et al., 2008; SANCHEZ-LOZADA et al., 2008) conduz à IRA, principalmente pela deposição intra-renal de cristais de urato (STAVRIC et al., 1969; BRADLEY & CASKEY, 1994).

É amplamente conhecida a associação entre a elevação da pressão arterial (PA) e as disfunções renais, pois os rins desempenham um papel chave no balanço de eletrólitos, fluido extracelular e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (BADYAL et al., 2003; LERMAN et al., 2005). Assim sendo, a frequente presença de hiperuricemia em pacientes hipertensos (1 em cada 4 pacientes) geralmente reflete uma subjacente disfunção renal ou uma perfusão renal reduzida (ALDERMAN et al., 1999). Nestes pacientes, recentemente foi detectada uma deficiência na secreção tubular de ácido úrico, o que pode ser um sinal de envolvimento renal precoce devido à hipertensão (BORGES et al., 2009). A associação de ácido úrico sérico com doença cardiovascular tem sido cogitada há mais de um século. Durante os últimos 50 anos, pesquisas clínicas e epidemiológicas vêm demonstrando a associação do ácido úrico sérico com infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e vários outros eventos cardiovasculares na

população em geral e, mais particularmente, entre os hipertensos (ALDERMAN et al., 1999). Estes pacientes hipertensos podem apresentar isquemia glomerular, atrofia tubular e fibrose intersticial (CAETANO et al., 2001). Numa triagem feita entre 18.020 indivíduos com doença renal crônica, houve uma prevalência de 20,6% de hiperuricemia. Um estudo com 2.145 pacientes com hipertensão arterial encontrou uma prevalência de hiperuricemia de 35% nos homens e 43% nas mulheres, em ambos os gêneros associada com níveis elevados de creatinina sérica. De 9.375 participantes com rigidez arterial e hipertrofia cardíaca, escolhidos ao acaso, 14,5% eram hiperuricêmicos (RIEGERSPERGER et al., 2011).

1.2. Modelos experimentais de IRA induzida por isquemia renal e doenças relacionadas

A isquemia é uma queda no fluxo sanguíneo que, por sua vez, conduz a um fornecimento insuficiente de oxigênio e nutrientes ao tecido. A lesão renal de origem isquêmica corresponde a mais de 70% das lesões renais agudas. Trata-se de uma condição na qual a taxa de filtração glomerular se reduz rapidamente, causando súbita retenção de metabólitos endógenos (DE FÁTIMA FERNANDES VATTIMO et al., 2011).

Há diversos relatos de modelos de isquemia em roedores, nos quais se avalia as consequências fisiopatológicas da isquemia resultante dos clameamentos da artéria renal e/ou da veia renal, ou do pedículo renal (artéria e veia) (PARK et al., 2001; LI et al., 2011). Tais obstruções podem levar ao aumento das pressões intratubulares, causadas também por processos inflamatórios que liberam metabólitos tóxicos e proteases, favorecendo a lesão do tecido já afetado, causando congestão vascular, além de intensificar o desequilíbrio redox (DE FÁTIMA FERNANDES VATTIMO et al., 2011). Por exemplo, 24 h após clameamento vascular venoso ou arterial renal em camundongos, com duração de 30 min, constatou-se que tanto a função renal (aumento significativo de ureia e creatinina sérica), quanto características histopatológicas, são mais graves no clameamento vascular venoso. Por outro lado, a produção de quimiocinas é maior com o clameamento do pedículo renal (PARK et al., 2001; LI et al., 2011). Mais

comumente são utilizados dois modelos de isquemia e reperfusão por clampeamento, o unilateral e o bilateral, sendo que o tempo utilizado para cada modelo varia de acordo com o grau de lesão a ser estudado. Geralmente, são usados 45 a 60 min para induzir isquemia unilateral e 10 a 40 min para induzir isquemia bilateral (MURATA et al., 2017). Ambos os modelos provocam uma lesão renal aguda em 24 h, mas com características diferentes (MURATA et al., 2017). A isquemia unilateral causa um aumento de creatinina e ureia plasmática e proteinúria em 24 h, podendo levar ao atrofiamento do rim acometido em até 28 dias após a isquemia. Já a isquemia bilateral provoca um aumento de creatinina sérica, danos estruturais similares em ambos os rins e mortalidade proporcionalmente agravada com o tempo de isquemia (MURATA et al., 2017; TOGOE et al., 2014). O tempo de isquemia renal está associado ao aumento do risco de um dano crônico, observando-se que mesmo a isquemia unilateral por mais de 20 min pode levar ao desenvolvimento de doença renal crônica (MURATA et al., 2017; TOGOE et al., 2014). A isquemia unilateral pode até provocar um maior dano ao rim acometido que a isquemia bilateral, mas o rim contralateral que não foi acometido, mesmo sobrecarregado, consegue manter a homeostase, enquanto na isquemia bilateral isto não ocorre por conta do acometimento de ambos os rins (MURATA et al., 2017; BASILE et al., 2003).

Possíveis mudanças no fluxo sanguíneo, como as que ocorrem na hipertensão, podem levar a uma série de consequências, por conta de alterações produzidas na funcionalidade do endotélio vascular (TIMSIT et al., 2012). Neste âmbito, dentre as causas secundárias de hipertensão, 1 a 5% correspondem a uma estenose da artéria renal, levando ao processo de nefropatia isquêmica. Na hipertensão de origem renovascular, como a que ocorre em decorrência dos modelos de IRA induzida por glicerol, isquemia, gentamicina, cisplatina e radiocontraste, observa-se a ativação do RAAS, originando, por exemplo, uma característica típica deste tipo de hipertensão, que é um teor de renina cerca de 1,5 vezes superior em um dos rins, relativamente ao contralateral (CARNEVALE et al., 2006; SINGH et al., 2013). O RAAS é tradicionalmente conhecido como um sistema endócrino cuja substância ativa melhor estudada é a Ang II, a qual é formada por uma clivagem sequencial do angiotensinogênio produzido no fígado, pela renina liberada pelo aparelho justaglomerular nos rins, formando Ang I. Por sua vez, Ang I é

clivada em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Os principais componentes do sistema renina-angiotensina (RAS) são expressos ou presentes no rim, e existem evidências de que os níveis de Ang II no tecido renal são mais elevados que os do plasma (ZIFF et al., 2016). Ang II exerce seus efeitos por meio da ligação em dois receptores acoplados à proteína G denominados receptores de angiotensina tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) (DE MELLO, 2017). A Ang II participa da manutenção da homeostasia cardiovascular, por meio do controle do metabolismo de fluidos e eletrólitos, influenciando o tônus vascular, a liberação de aldosterona, a reabsorção de sódio no túbulo renal proximal e a liberação de vasopressina, além de mobilizar cálcio intracelular (KRIEGER et al., 1996; BOLIGNANO et al., 2014; DE MELLO, 2017). O aumento da estimulação do RAAS no rim pode resultar na expansão mesangial, fibroses túbulo intersticiais e esclerose glomerular com consequente perda da filtração glomerular (ZIFF et al., 2016). Classicamente, o RAS circulante desempenha um papel essencial na regulação da PA durante a hipertensão (KOMERS & PLOTKIN, 2016; ZIFF et al., 2016). Sabe-se que a Ang II estimula o receptor AT1, no túbulo renal, aumentando a atividade dos mecanismos de transporte envolvidos na reabsorção de sódio, levando à vasoconstrição e elevação da pressão intraglomerular, promovendo crescimento celular e produção de matriz extracelular, podendo resultar em glomerulosclerose, ações pró-oxidantes e inflamatórias, bem como efeitos com implicações na fisiopatologia podocitária e proteinúria (THETHI et al., 2012; TYLICKI et al., 2012; KOMERS & PLOTKIN, 2016). Têm sido identificadas novas enzimas, receptores e diversos mediadores ativos do RAAS, incluindo Ang (1-7), Ang III, Ang IV, Ang (1-9) e alamandina (SIMÕES E SILVA et. al., 2016). Essas Angs são formadas por hidrólises consecutivas por diversas enzimas, como a ECA 2, uma metaloprotease de zinco homóloga à ECA que converte Ang II diretamente em Ang (1-7), ou gera Ang (1-9) a partir da hidrólise de Ang I (SIMÕES E SILVA et. al., 2016). A Ang (1-9) também pode ser clivada pela ECA em Ang (1-7), a qual, por sua vez, liga-se a um receptor acoplado à proteína G transmembranar, denominado receptor Mas, ativando mecanismos intracelulares e eventos funcionais que, em geral, se opõem às ações desencadeadas pela Ang II, produzindo vasodilatação, inibição do crescimento celular, efeitos antitrombóticos, anti-inflamatórios e anti-fibróticos (SIMÕES E SILVA et. al., 2016). Sabe-se também, que a interação de Ang (1-9) com o receptor AT2 reduz a pressão arterial, podendo

até reverter a lesão cardiovascular em modelos animais de hipertensão (SIMÕES E SILVA et. al., 2016). Por conseguinte, a ativação de ambos os eixos contrarreguladores, ECA 2-Ang (1-7)-Mas e ECA 2-Ang (1-9)-AT2, atenua os efeitos causados pela ECA-Ang II-AT1, prevenindo lesões de órgãos em modelos experimentais de doenças renais e cardíacas (SIMÕES E SILVA et. al., 2016). Mais recentemente, foi isolado do plasma humano e de rato a Alamandina, um produto formado da descarboxilação do resíduo de aspartil N-terminal da Ang II formando Ang A, que subsequentemente é convertida em Alamandina pela ECA 2 (SIMÕES E SILVA et. al., 2016). A Alamandina liga-se a um receptor acoplado à proteína G relacionado ao receptor Mas, e exerce ações anti-hipertensivas, antifibróticas e cardiovasculares comparáveis a Ang (1-7) (SIMÕES E SILVA et. al., 2016). A Ang II também pode ser convertida em Ang III pela clivagem de sua aspartil N-terminal pela aminopeptidase A, que por sua vez é convertida em Ang IV pela clivagem de sua arginina pela aminopeptidase N (YUGANDHAR & CLARK 2013; WRIGHT et al., 2015). A Ang IV pode ser reduzida a Ang (3-7) pela carboxipeptidase P, por meio da clivagem da ligação Pro-Phe pela propil oligopeptidase (WRIGHT et al., 2015). Estes peptídeos participam ativamente do controle da pressão sanguínea, das funções cardiovasculares e da homeostase do equilíbrio de fluidos corporais (YUGANDHAR & CLARK 2013).

1.3. Células-tronco mesenquimais (CTMs) do tecido adiposo: uso terapêutico

As CTMs são definidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular por três critérios: (1) devem ser aderentes em plástico, (2) devem expressar CD73, CD90 e CD105 e não expressar CD45, CD34, CD11b, CD14, entre outros, e (3) devem ser capazes de se diferenciar, *in vitro*, em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (PITTINGER et. al., 1999; MOLINA et al., 2015; NAJAR et al., 2016). As CTMs de humanos e de camundongos têm a capacidade de se diferenciar em linhagens de tecidos, tais como músculo esquelético, ossos, tendões, cartilagem e gordura, sob condições de cultura adequadas, utilizando fatores de crescimento, mantendo suas características por um longo prazo, podendo ser isoladas de várias

fontes, como fígado, cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, ligamento periodontal, membrana sinovial, fluido menstrual e polpa dentária (MOLINA et al., 2015; VISWESWARAN et al., 2015; NAJAR et al., 2016). As CTMs isoladas desses diferentes tecidos possuem uma heterogeneidade fenotípica e diferentes capacidades de crescimento, sendo capazes de gerar linhagens mesenquimais clássicas (osteogênica, condrogênica e adipogênica) e possuindo marcadores de superfície em comum (AUGELLO et al., 2010).

O tecido adiposo é altamente complexo, contendo adipócitos maduros, que constituem menos de 50% (geralmente cerca de 20-30%) de todas as células desse tecido (pré-adipócitos, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células endoteliais, monócitos e macrófagos residentes) e, por isso, uma rica fonte de CTMs (STRIOGA et al., 2012). As CTMs de tecido adiposo são genética e morfológicamente mais estáveis em cultura, apresentam menor senescência, maior capacidade proliferativa, e um potencial de diferenciação com um período mais longo em cultura, quando comparadas com as CTMs de outras fontes (STRIOGA et al., 2012). Por essas características e pelos procedimentos de isolamento serem mais simples, este tecido é a fonte de CTMs mais usada em experimentos clínicos, como, por exemplo, em distúrbios musculares e nos tendões, incontinência urinária, disfunção da bexiga, disfunção erétil, doenças cardiovasculares, déficits neurológicos, feridas crônicas e doença de Crohn (SCHÄFFLER et al., 2007; STRIOGA et al., 2012). Vale mencionar que o acesso ao tecido adiposo subcutâneo, por meio de procedimento cirúrgico (anestesia local, com um mínimo de desconforto ao paciente) é simples, com possível repetição, se necessário (SCHÄFFLER et al., 2007).

Diversos estudos demonstraram que as CTMs podem ser usadas tanto para a regeneração de tecidos como para a modulação da resposta imune em doenças como a esclerose múltipla e rejeição de órgãos transplantados (MOLINA et al., 2015). As CTMs estão sendo investigadas terapêuticamente não apenas pela sua capacidade de diferenciação, mas principalmente por possuírem propriedades imunomoduladoras e oferecerem baixíssimo risco de rejeição e transmissão de doenças (YOKOMIZO et al., 2011; FRANQUESA et al., 2012). Isso acontece porque apresentam baixos níveis de expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)-1 e nenhuma expressão do MHC-2, bem como

apresentam marcação negativa para os marcadores de superfície CD40, CD80 e CD86, exercendo efeitos tanto no sistema imune inato, como no adquirido, com implicações não apenas na diferenciação de monócitos e resposta de macrófagos, mas também no comportamento dos linfócitos T e B, permitindo que estas células escapem do sistema imune do hospedeiro (MOLINA et al., 2015; NAJAR et al., 2016).

As células exterminadoras naturais ou "natural killers" (NK) são importantes para o sistema imune inato e constituem cerca de 10 a 15% dos linfócitos do sangue periférico (MOLINA et al., 2015). Estão envolvidas principalmente na destruição de tecidos danificados por ação viral ou de tumores e recebem esse nome porque fazem seu papel sem a ativação do MHC-1 (MOLINA et al., 2015; NAJAR et al., 2016). O cultivo de CTMs em conjunto com células NK mostra que as células NK são capazes de matar CTMs alogênicas, o que pode reduzir a eficácia de qualquer tratamento com CTMs, do mesmo modo que as CTMs inibem a proliferação de células NK mediada por interleucina (IL) 2 (MOLINA et al., 2015; GAO et al., 2016; NAJAR et al., 2016). A baixa expressão dos níveis de MHC-1, *in vivo*, permite que as CTMs evitem linfócitos T citotóxicos. No entanto, em resposta ao interferon gama (IFN- γ), as CTMs diminuem a expressão de receptores de NK e aumentam a expressão de MHC-1, a fim de evitar serem mortas pelas células NK (MOLINA et al., 2015). Isso demonstra a necessidade das CTMs serem ativadas em um ambiente inflamatório, para que ocorra a modulação do sistema imunológico. As complexas interações entre CTMs e células NK realçam a importância de compreender os efeitos dependentes do tempo da administração de CTMs *in vivo*, visto que inibem a proliferação de células NK em repouso, porém inibem parcialmente a proliferação de células NK que já foram ativadas por IL-2, o que ocorre devido à liberação de indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) pelas CTMs (MOLINA et al., 2015; NAJAR et al., 2016).

As células dendríticas (CDN) são derivadas de monócitos do sangue periférico e são especializadas em fagocitar antígenos, processar o material antigênico, devolvê-lo à superfície e apresentá-lo às células especializadas do sistema imune, servindo de ligação entre as imunidades inata e adaptativa em mamíferos, ajudando a ativação dos linfócitos T e B (MOLINA et al., 2015). As CTMs

exercem os seus efeitos sobre as CDN por meio de sinalização de contato, possivelmente envolvendo a via de sinalização Notch (NAJAR et al., 2016). As CTMs inibem a diferenciação de CD34+ e monócitos progenitores em CDN e estes efeitos são mediados por IL-6 e pelo fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófago (GM-CSF), e no caso da IL-6, podem mudar o potencial de diferenciação dos monócitos para o fenótipo de macrófagos (MOLINA et al., 2015; GAO et al., 2016; NAJAR et al., 2016). Pelo fato das CDN não serem as principais responsáveis pela fagocitose no sistema imune inato, os efeitos indiretos das CTMs sobre a estimulação de células T e B teriam mais relevância.

Os macrófagos são células fagocitárias derivadas de monócitos que funcionam como parte do sistema imune inato e servem para facilitar a recuperação e remodelação de tecidos danificados, além de atuarem na defesa contra antígenos insolúveis (MOLINA et al., 2015). As CTMs influenciam na morfologia e no perfil de marcadores de superfície dos macrófagos, aumentam a secreção das citocinas anti-inflamatórias PGE2 e proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG-6) e diminuem a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e proteína quimioatratora de monócitos 1 (MCP-1), além de diminuírem o fator de necrose tumoral (TNF) α e aumentarem a secreção de IL-10, podendo influenciar a migração dos macrófagos (MOLINA et al., 2015; GAO et al., 2016; NAJAR et al., 2016)

Pouco se sabe sobre os efeitos das CTMs em linfócitos B, e os resultados são controversos. Há estudos mostrando que as CTMs não afetam a proliferação de linfócitos B (KRAMPERA et al., 2006) e outros mostrando que inibem a proliferação e diferenciação, evidenciado pela diminuição da quimiotaxia e na produção de imunoglobulina (CORCIONE et al., 2006; TABERA et al., 2008; GAO et al., 2016; NAJAR et al., 2016).

O potencial terapêutico das CTMs na reparação de tecidos baseia-se em algumas propriedades intrínsecas, como a clonogenicidade, ou habilidade de perceber a baixa densidade das células e ativar sua capacidade de duplicação; a multipotencialidade, ou potencial de dar origem a um maior número de células mais especializadas; e a capacidade de auto-renovação, dando origem a novas células multipotentes (YOKOMIZO et al., 2011; FRANQUESA et al., 2012), substituindo células danificadas, servindo de progenitoras para células maduras, ou para secretar fatores tróficos que estimulam o ambiente local (MOLINA et al., 2015).

As CTMs têm sido usadas em diversos ensaios clínicos, como no tratamento de pacientes com órgãos transplantados (STRIOGA et al., 2012) ou com enxerto (STRIOGA et al., 2012), cirurgias plásticas (STRIOGA et al., 2012), lúpus eritematoso (STRIOGA et al., 2012), diabetes melito tipo 2 (ESTRADA et al., 2008), esclerose múltipla (STRIOGA et al., 2012), doença de Crohn (STRIOGA et al., 2012), colite ulcerativa (ZHAO & ZHANG 2016), doença cardíaca isquêmica (GNECCHI et al., 2009), osteoartrite (STRIOGA et al., 2012), sepse (GONZALEZ-REY et al., 2009) e, inclusive, na lesão renal isquêmica (LA MANNA et al., 2011; DONIZETTI-OLIVEIRA et al., 2012; AGGARWAL et al., 2013; ZHU et al., 2013; MOLINA et al., 2015). Segundo o National Institutes of Health (NIH) há mais de 1628 estudos explorando os efeitos terapêuticos das CTMs (consultar o nº atualizado de estudos em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=stem+cells&recr=Open>).

1.4. Justificativas do estudo

No caso da IRA, a maioria das terapias visa à prevenção e não um tratamento pós-traumático. Isto se deve ao fato de que é difícil o restabelecimento da função renal após uma lesão aguda. Uma terapia que reintegrasse as funções renais, assim como diminuísse os danos estruturais causados quando estes já estão consolidados, nos casos em que ocorre concomitantemente o aumento do ácido úrico (por sua vez interligado a muitas comorbidades), seria muito interessante e promissor. Considerando o caso do envenenamento crotálico, a terapia sorológica geralmente mais bem sucedida é a iniciada em até 4 horas após o acidente (AMARAL et al., 1997). Após esse período, pode haver acometimento mais grave, levando ao óbito, ou remissão aparente com sobrevida. No entanto, possíveis sequelas geralmente não têm sido sistematicamente acompanhadas ou relatadas ao longo do tempo nesses pacientes ((ZABELL et al., 2017; KHAN et al., 2016).

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Avaliar a hipótese da eficiência da terapia com CTMs do tecido adiposo nas sequelas da disfunção renal aguda associada ao modelo experimental de hiperuricemia induzida pelo veneno crotálico, comparativamente àquela associada à isquemia. Essa avaliação contribuirá para ampliar o conhecimento sobre alternativas de tratamento do próprio envenenamento crotálico e do rol de comorbidades relacionadas à hiperuricemia e que têm em comum a possibilidade de culminarem na falência funcional dos rins.

2.2. Específicos

2.2.1. Diferenciar as peculiaridades dos efeitos renais e sobre a letalidade entre a isquemia bilateral e o envenenamento crotálico em intervalos de tempo até 7 dias.

2.2.2. Diferenciar os efeitos renais e sobre a letalidade entre os tratamentos com CTMs do tecido adiposo nos indivíduos sobreviventes aos efeitos de curto prazo da IRA induzida pela isquemia bilateral e pelo envenenamento crotálico, em intervalos de tempo suficientes para a melhora ou recuperação em até 7 dias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

1,1,3,3-tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich, EUA), ácido acético (Merck, Brasil), ácido pícrico (Sigma-Aldrich, Brasil), ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich, EUA), albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Brasil), anticorpo anti-CD105 de camundongo feito em rato (Biolegend, EUA), anticorpo anti-CD44 PE de camundongo feito em rato (Abcam, EUA), anticorpo anti-CD90 PE de camundongo feito em rato (Abcam, EUA), anticorpo monoclonal anti-CD13 PE de camundongo feito em rato (BD Biosciences, Brasil), anticorpo monoclonal anti-CD29 PE de camundongo feito em hamster (Biolegend, EUA), anticorpo monoclonal anti-CD31 PE de camundongo feito em rato (Abcam, EUA), anticorpo monoclonal anti-CD34 PE de camundongo feito em rato (BD Biosciences, Brasil), anticorpo monoclonal anti-CD45 PE de camundongo feito em rato (BD Biosciences, Brasil), azul de toluidina (Sigma-Aldrich, Brasil), Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, EUA), cloridrato de xilazina (Syntec, Brasil), cloridrato de cetamina (Syntec, Brasil), colagenase tipo IA (Sigma-Aldrich, Brasil), dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, EUA), dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma-Aldrich, EUA), EDTA (Merck, EUA), eosina (Sigma-Aldrich, Brasil), etanol (Sigma-Aldrich, Brasil), fucsina (Synth, Brasil), HPO_3 (Sigma-Aldrich, Brasil), hematoxilina (Sigma-Aldrich, Brasil), KCl (Merck, EUA), kit Ácido Úrico UOD-PAD (Laborlab, Brasil), kit creatinine Fast (Laborlab, Brasil), kit Ureia UOD-PAD (Laborlab, Brasil), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Nuclear, Brasil), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Synth, Brasil), NaOH (Sigma-Aldrich, Brasil), n-etilmaleimida (Sigma-Aldrich, EUA), ortofitaldealdeído (Sigma-Aldrich, EUA), Oil Red O (Sigma-Aldrich, EUA), paraformaldeído (Merck, EUA), penicilina/estreptomicina (Gibco, Brasil), soro fetal bovino (Gibco, Brasil), tetraborato de sódio (Merck, USA), tripsina-EDTA (Atena, Brasil), xilol (Merck USA).

3.2. Animais

Camundongos Swiss, machos, adultos, pesando entre 18-20g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, foram mantidos em caixas de polietileno (tamanho interno comprimento x largura x altura de 56 x 35 x 19 cm), com no máximo 10 animais por caixa, com comida e água *ad libitum*, em estante climatizada (Alesco Indústria e Comércio Ltda, Brasil) a 25°C, umidade relativa 65,3±0,9% e fotoperíodo claro-escuro de 12h:12h (com início do período claro às 6:00 h AM). Os animais e os protocolos utilizados neste estudo estão de acordo com o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan sob os protocolos 951/12 e 6613041215. A linhagem Swiss é heterogênea e assim mimetiza a variabilidade individual da população humana.

3.3. Tratamentos

Os animais foram divididos em 9 grupos, quais sejam: (1) administrados com solução salina fosfato tamponada estéril (PBS) 0,2 mL, via intraperitoneal (i.p) (grupo controle); (2) administrados com PBS 0,2 mL i.p e CTMs intravenosa (i.v) (grupo controle + CTMs); (3) administrados com vCdt i.p (grupo vCdt); (4) administrados com vCdt i.p e CTMs i.v (grupo vCdt + CTMs); (5) grupo Sham (controle cirúrgico), animais submetidos a cirurgia sem o clampeamento dos pedículos; (6) com isquemia bilateral (grupo Isq bil); (7) com isquemia bilateral e tratados com CTMs i.v (Isq bil + CTMs). O vCdt foi administrado na dose de 1,024 µg/0,2 mL de PBS/20 g de massa corporal, i.p, correspondente a 80%DL50 (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010; FREZZATTI & SILVEIRA, 2011). As CTMs (células da passagem 3-5, na concentração de 10⁵ / 0,5 mL de PBS) foram administradas na veia da cauda, nos dias 0, 1 e 2, tomando-se como dia "0" o tempo de 24 h após o procedimento de administração de PBS, ou veneno, ou indução de isquemia, com a finalidade de avaliar os efeitos tardios (pós-traumáticos) das CTMs sobre a IRA (instalada); Para avaliar a progressão e se os danos causados pelos modelos de indução de IRA e seu tratamento com CTMs persistem no decurso temporal, os grupos foram

subdivididos em animais sacrificados após 24 h, 48 h, 96 h e, conforme o caso, 7 dias após a indução.

A Figura 1 ilustra, esquemática e sumariamente, os procedimentos experimentais que foram realizados no presente estudo.

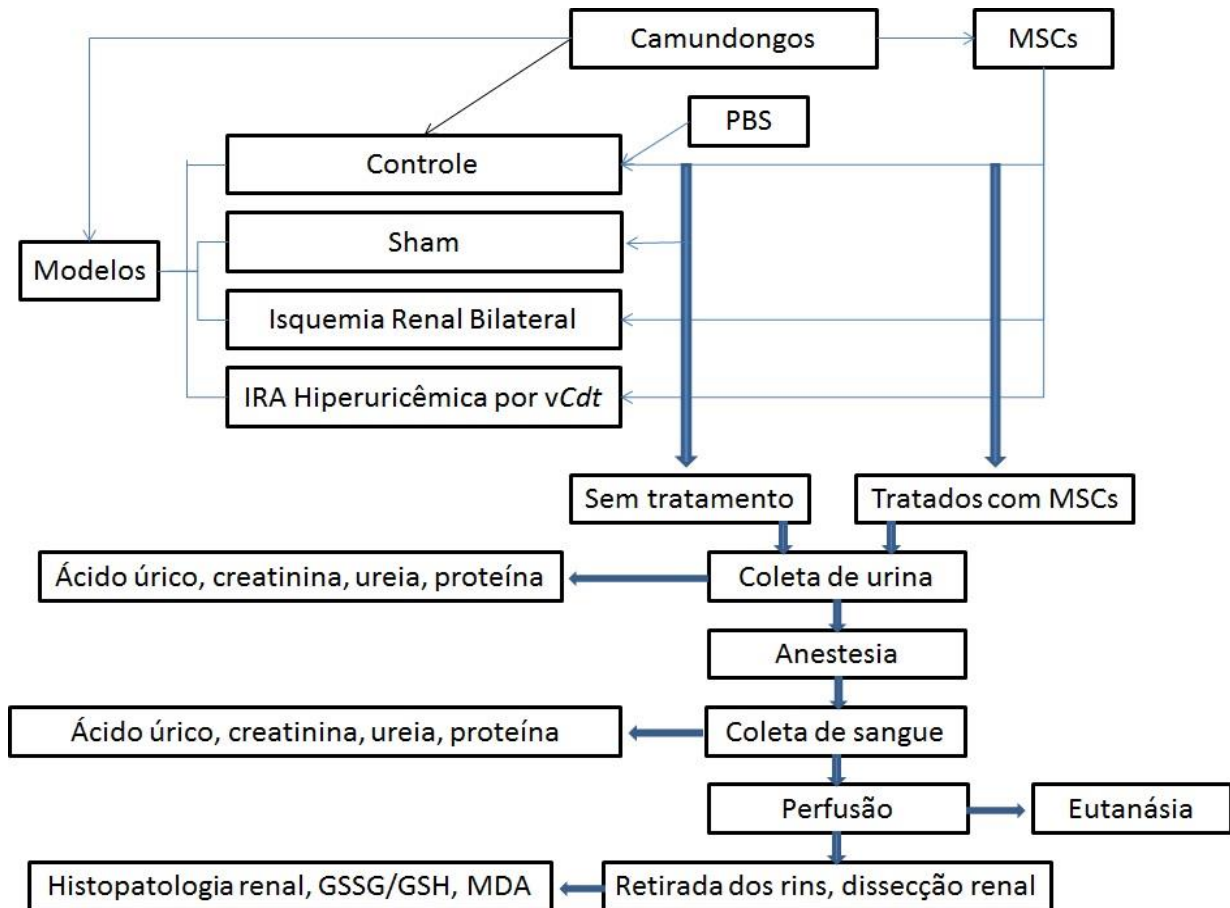


Figura 1. Sumário ilustrativo dos procedimentos experimentais do presente estudo.

3.4. Preparo da solução de vCdt

1,0 mg de veneno liofilizado (fornecido pelo Instituto Butantan, lote do ano de 2001) foi suspenso em 1,0 mL de PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 19,3 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,9 g/L de NaCl, 8,77 g/L, pH 7,4), sob leve agitação, por 10 min, a 4°C e, em seguida, centrifugado a $10.192 \times g$ por 20 min a 4°C (microcentrífuga CT-14000R, Cientec Equipamentos para Laboratório. Brasil). O precipitado foi descartado e o sobrenadante aliqotado e estocado a -20°C por tempo máximo de uma semana e administrado por via i.p., para promoção de IRA hiperuricêmica (YAMASAKI et al.,

2008; ALEGRE et al., 2010; FREZZATTI & SILVEIRA, 2011). O mesmo lote de veneno foi usado ao longo de todo o estudo.

3.5. Indução de isquemia renal

A indução de isquemia foi feita bilateralmente, conforme Park et al. (2001), tal como resumidamente descrito a seguir, sob anestesia com solução de 5,75% de cloridrato de xilazina (0,02 mg/mL) e 10% de cloridrato de cetamina (0,1mg/mL) em água, da qual foi aplicada 10 mL/kg (1,15 mg de cloridrato de xilazina/kg e 100 mg de cloridrato de cetamina/kg) i.p. Após a laparotomia, os pedículos renais direito e esquerdo foram clampeados durante 40 min (grupo isquêmico bilateral). Para o controle cirúrgico (sham operados), foi executada a laparotomia sem o clampeamento dos pedículos renais.

3.6. Isolamento de CTMs do tecido adiposo

O isolamento das CTMs localizadas no tecido adiposo foi baseado no método de Danoviz et al. (2011). O tecido adiposo da região inguinal foi coletado individualmente de camundongos eutanasiados por deslocamento cervical. O tecido (0,5 g aproximadamente) foi lavado com PBS estéril para retirar a maior parte dos interferentes, sendo depois cortado com tesoura em pedaços de aproximadamente 3 mm. Após esse procedimento, o tecido foi enzimaticamente dissociado usando 1 mg de colagenase tipo IA/mL de meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium low-glucose (DMEM-low, Gibco, Brasil), suplementado com 1% de albumina sérica bovina (BSA), durante incubação por 45 min, em estufa a 37°C, sob leve agitação (agitador Biosan MR-1, Letônia). Esse incubado de tecido dissociado foi misturado em igual volume de meio de cultura DMEM-low suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para inibir a reação e centrifugado a 400 X g por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em DMEM-low com 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/10000 µg por mL), transferido para frasco de cultura (25 cm²) e mantido em incubadora (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) com 5% de CO₂ a 37°C. Em intervalos de 24 h, durante 3 dias, o meio de

cultura foi trocado e a cultura celular lavada com PBS. As células derivadas de tecido adiposo tiveram suas características morfológicas monitoradas até a quarta geração. Após esse período, as células (com 70-80% de confluência) foram colhidas com 0,25% de tripsina-EDTA e suspendidas em DMEM com 10% de SFB na concentração de 1×10^6 células, para avaliação de marcadores de superfície e diferenciação. Uma vez estabelecido o tipo celular, as células foram congeladas em solução contendo 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) para armazenagem. Foras utilizadas 1×10^5 células para a administração nos animais.

3.7. Marcadores de superfície celular

As CTMs foram incubadas no escuro, por 30 min, a temperatura ambiente, com os marcadores positivos (CD13, CD29, CD44, CD90 e CD105) e negativos (CD31, CD34 e CD45), sendo que para o grupo controle as CTMs foram avaliadas somente na presença de PBS. Após a incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformoldeído 1%. A aquisição dos dados foi realizada no equipamento de citometria de fluxo Guava (Guava® easyCyte, Merck Millipore Corporation, Alemanha) e analisados com o software FlowJo (Tree Star, Inc. EUA). Os procedimentos de marcação supramencionados foram realizados segundo descrito por Nitta et al. (1997), Economopoulou et al. (2005), Frank et al. (2005), Banas et al. (2007) e Furuichi et al. (2012).

3.8. Diferenciação celular

A diferenciação e coloração foram realizadas seguindo o protocolo de kits para cada tipo celular e todos os procedimentos foram feitos em placas de 12 poços. Em suma, para induzir a diferenciação osteogênica, após estarem confluentes, as células-tronco foram incubadas com o meio de cultura (Gibco A10069-01) e suplemento para osteogênese (Gibco A10066-01) por até duas semanas. A diferenciação osteogênica foi avaliada com coloração de Von Kossa, pela incubação com 1% de nitrato de prata em ultravioleta por 45 min. Após esse tempo, o nitrato de prata foi retirado e lavado com água destilada para adicionar tiosulfato de sódio 3%

e incubar por 5 min. Após a incubação com tiosulfato de sódio, as células foram lavadas novamente com água destilada e incubadas por mais 5 min para coloração de Van Gieson (1% de fucsina, 12,3% de ácido pícrico e completar com H₂O destilada). Após a incubação de 5 min, a solução foi retirada e os poços foram lavados uma vez com etanol P.A. Para a diferenciação em adipócitos, após estarem confluentes, as CTMs foram incubadas com meio de cultura (Gibco A10410-01) e suplemento para adipogênese (Gibco A10065-01), por uma semana. A coloração Oil Red O foi utilizada para determinar o acúmulo de gotículas de óleo no citoplasma. Para a diferenciação em condrócitos, após estarem confluentes, as células-tronco foram incubadas com meio de cultura (Gibco A10066-01) e suplemento para condrogênese (Gibco A10084-01), por até duas semanas. A diferenciação de condrócitos foi avaliada com coloração azul de toluidina.

As imagens das células diferenciadas foram obtidas através de um microscópico de inversão (Nikon eclipse Ti, Japão), e analisadas pelo software NIS-Elements C.

3.9. Letalidade

A letalidade foi avaliada em intervalos de 6 h, 24 h, 72 h, 96 h e 7 dias após a administração de PBS, ou vCdt, ou indução de isquemia.

3.10. Obtenção de rins, coleta de urina e plasma

Imediatamente após os tratamentos, cada grupo foi colocado em gaiola metabólica (Harvard Apparatus, EUA) apropriada para a coleta de urina, a qual foi realizada durante as 24 h subsequentes. O *pool* de urina coletado foi centrifugado a 2564 x *g*, por 5 min, a 4°C (microcentrífuga CT-14000R, Cientec, Brasil); o sobrenadante foi armazenado a -80°C para os procedimentos seguintes e o *pellet* foi descartado. Após coleta de urina, foi coletado o sangue e retirados os rins. Os grupos de animais tratados, sob anestesia, no mesmo esquema, via e dose já citados anteriormente, tiveram o sangue coletado com uma pipeta Pasteur com heparina, após corte no plexo axilar direito. Então, a cavidade torácica foi aberta

para realização da perfusão cardíaca com PBS 50 mM, durante um período de 5 min, com um fluxo de 8-10 mL/min. Imediatamente após a perfusão, os rins foram retirados, congelados em gelo seco e armazenados por um período máximo de 10 dias, a -80°C , até a utilização nos procedimentos seguintes. Após estes procedimentos, os animais foram eutanasiados por exsanguinação, sob anestesia, mediante secção dos vasos cervicais.

Para a obtenção de plasma, o sangue foi centrifugado individualmente em $5232 \times g$ por 5 min, a 4°C (microcentrífuga CT-14000R).

Considerando, como tempo inicial, o momento da administração de PBS, ou de *vCdt*, ou a indução de isquemia, as medidas e análises de todos os parâmetros sorológicos, plasmáticos, urinários e teciduais foram realizadas como segue: após 24 h, 48 h, 96 h e, conforme o caso, 7 dias, nos grupos não tratados com CTMs; após 48 h, 96 h e, conforme o caso, 7 dias, nos grupos tratados com CTMs. A avaliação em 7 dias foi realizada apenas naqueles parâmetros em que não ocorreu a melhora ou recuperação de determinado parâmetro até 96h, quer espontaneamente, quer em função do tratamento com CTMs.

3.11. Proteína total

Foi medida fotometricamente (Bio-Tek Power Wave espectrofotômetro XR. BioTek Instruments, Inc. EUA), a 630 nm, em triplicatas de amostras de plasma (diluídos 500 vezes) e pool de urina (diluída 75 vezes), pelo método de Bradford (1976), usando reagente Bio-Rad Protein Assay. O teor de proteína foi interpolado numa curva padrão de BSA no mesmo diluente.

3.12. Creatinina, ácido úrico e ureia

As medições foram realizadas conforme descrito por Frezzatti & Silveira (2011). Resumidamente, a creatinina foi quantificada por fotometria a 500 nm, em triplicatas de 20 μL de plasma individual e *pool* de urina, com o kit creatinine Fast. O ácido úrico foi quantificado por fotometria a 505 nm, em triplicatas de 5,4 μL de plasma individual e *pool* de urina, com kit Ácido Úrico UOD-PAD. A ureia foi

quantificada por fotometria a 340 nm, em triplicatas de 3 μL de plasma individual e *pool* de urina, com kit Ureia UOD-PAD.

3.13. Estresse oxidativo

Foi avaliado no córtex e na medula de rins dissecados e armazenados -80°C , por meio da medida dos teores de GSSG, GSH e MDA, como descrito por Frezzatti & Silveira (2011).

Para as medidas de GSSG e GSH, o córtex e a medula foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, contendo 0,005 M EDTA (PBEDTA) acrescido de 5,26% HPO_3 (0,1 g de tecido/1,5 mL PBEDTA e 0,4 mL de HPO_3 25%), a 800 rpm por 3 min com homogeneizador (Tecnal, modelo Te-099, Brasil). Estes homogenatos foram ultracentrifugados (Hitachi modelo HIMAC CP60E, Japão) a 100.000 x g por 30 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado imediatamente, conforme descrito abaixo. Todas as etapas foram realizadas a 4°C . O GSH foi avaliado da seguinte forma: 100 μL do sobrenadante foi diluído em PBEDTA (1:10) e homogeneizado por inversão dos tubos. Assim, 100 μL desta solução foi misturada com 170 μL de PBEDTA e 30 μL de ortofitalaldeído (OPT) (OPT 0.003 g/60 μL de etanol PA), e incubados por 15 min a 25°C . Então, a leitura foi realizada. Valores do branco para GSH foram obtidos pela leitura de 270 μL de PBEDTA mais 30 μL de OPT. O GSSG foi avaliado da seguinte forma: 56,7 μL do sobrenadante foi incubado com 22,7 μL de n-etilmaleimida 0,1 M por 30 min a 25°C . Após esta incubação, 300 μL de NaOH 0,1 M foi adicionado em 50 μL da última mistura, que foi homogeneizada por inversão dos tubos. Assim, 100 μL do homogenato foi incubado por 15 min a 25°C com 170 μL de NaOH 0,1 M e 30 μL OPT e, após isso, a leitura foi realizada. Os valores do branco para GSSG foram obtidos. As medidas fluorimétricas de GSH e GSSG foram estimadas em 460/40 nm de emissão e 360/40 nm de excitação. Os valores de fluorescência foram convertidos para $\mu\text{g/mL}$, por interpolação em uma curva padrão.

Para a medida de MDA, a solução de reação foi preparada com 90 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 675 μL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5 ajustado com NaOH), e 675 μL de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (TBA)

0,8%. 90 µL de tecido homogeneizado (10% [0,1 g/mL] preparado em 1,15% de KCl), homogeneizado por 3 min a 11000 rpm (homogeneizador Polytron PT-MR 2100, Kinematica AG. EUA), foi adicionado a esta solução e, em seguida, o volume foi completado até 1,8 mL com água destilada. Esta mistura foi mantida em um banho seco a 98°C por cerca de 1 hora, e subsequentemente centrifugada a 2500 X *g* durante 10 min a 4°C (microcentrífuga CT-14000R). O sobrenadante foi medido a 532 nm. O padrão utilizado para a curva padrão foi o 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

3.14. Histologia

Os rins foram fixados em solução de paraformaldeído a 10% em NaOH 0,1 M e tetraborato de sódio 0,1 M por 48 h e submetidos à desidratação, passando por banhos sequencias de 1 h em porcentagens crescentes de etanol (70%, 96% e P.A). Em seguida, as amostras foram submetidas a um banho de 2 h em xilol P.A e emblocadas, por meio de um banho em parafina por, no mínimo, 3 h. Concluído esse processo, foram realizados os cortes histológicos em secções sagitais de 3 a 4 µm de espessura, os quais foram posicionados em lâminas de vidro, em seguida colocadas em uma estufa a 60^o-70^oC por aproximadamente 30 min. Para a coloração dos cortes, as lâminas passaram por uma bateria de 3 banhos de xilol P.A., seguidos por 5 banhos de etanol P.A, cada banho com duração de 5 min. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 min e mergulhadas em uma cuba com corante hematoxilina por 1 min e contra coradas com eosina por 1 min. Para finalizar o processo de coloração é necessário fazer algumas passagens em etanol P.A. e em xilol P.A, até a retirada do excesso de corante. O exame histopatológico dessas lâminas foi realizado sob microscopia de campo claro.

3.15. Análise dos dados

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente utilizando os programas computacionais Instat™ e GraphPad Prism™. A análise de regressão foi realizada para calcular as curvas-

padrão de proteína, creatinina, ácido úrico, ureia, GSH, GSSG e 1,1,3,3-tetraetoxipropano. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida, quando detectadas diferenças, pelo teste Student-Newman-Keuls para comparar mais de dois valores. Foi utilizado o teste exato de Fisher bicaudal para a comparação da letalidade. Em todos os cálculos foi fixado o nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e cultura de CTMs aderentes do tecido adiposo

Após o isolamento, diferentes tipos celulares foram observados em cultura. Com um dia de cultura já foi possível observar células aderidas. As CTMs de tecido adiposo aderidas possuem uma morfologia semelhante a fibroblastos, como mostra a Figura 2, com uma grande facilidade de expansão, tornando-se confluentes de 5 – 7 dias em garrafas com superfície de 75 cm². O número de células diminuiu após o congelamento a -80°C, armazenagem e posterior descongelamento para cultivo, sendo que as células remanescentes tiveram sucesso no cultivo e expansão até pelo menos a décima passagem, tempo máximo em que foram observadas.

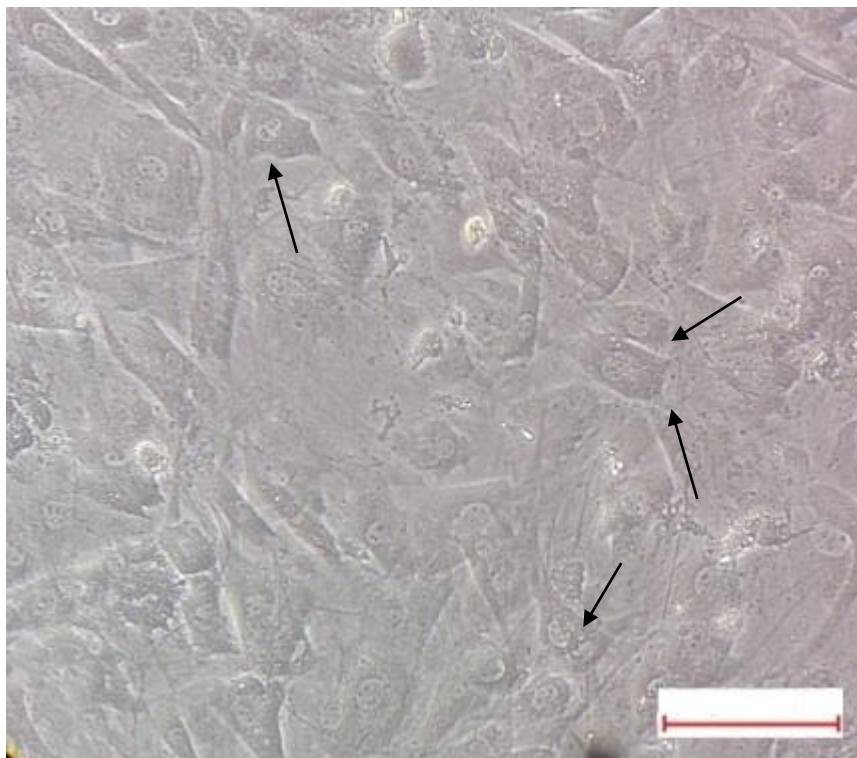


Figura 2. Morfologia das células-tronco mesenquimais (indicadas pelas setas) de tecido adiposo aderidas, em segunda passagem, sem coloração e em campo claro. Barra = 500 μm

4.2. Caracterização e análise imunofenotípica das CTMs

A Figura 3 mostra que as CTMs isoladas de tecido adiposo, provenientes da cultura celular, não expressaram marcadores celulares de células hematopoiéticas (CD34 e CD45) e células endoteliais (CD31) e marcaram positivamente para os marcadores de adesão específicos para CTMs (CD90, CD29, CD105, CD13, CD44 e Sca-1), mostrando que a cultura celular está homogênea.

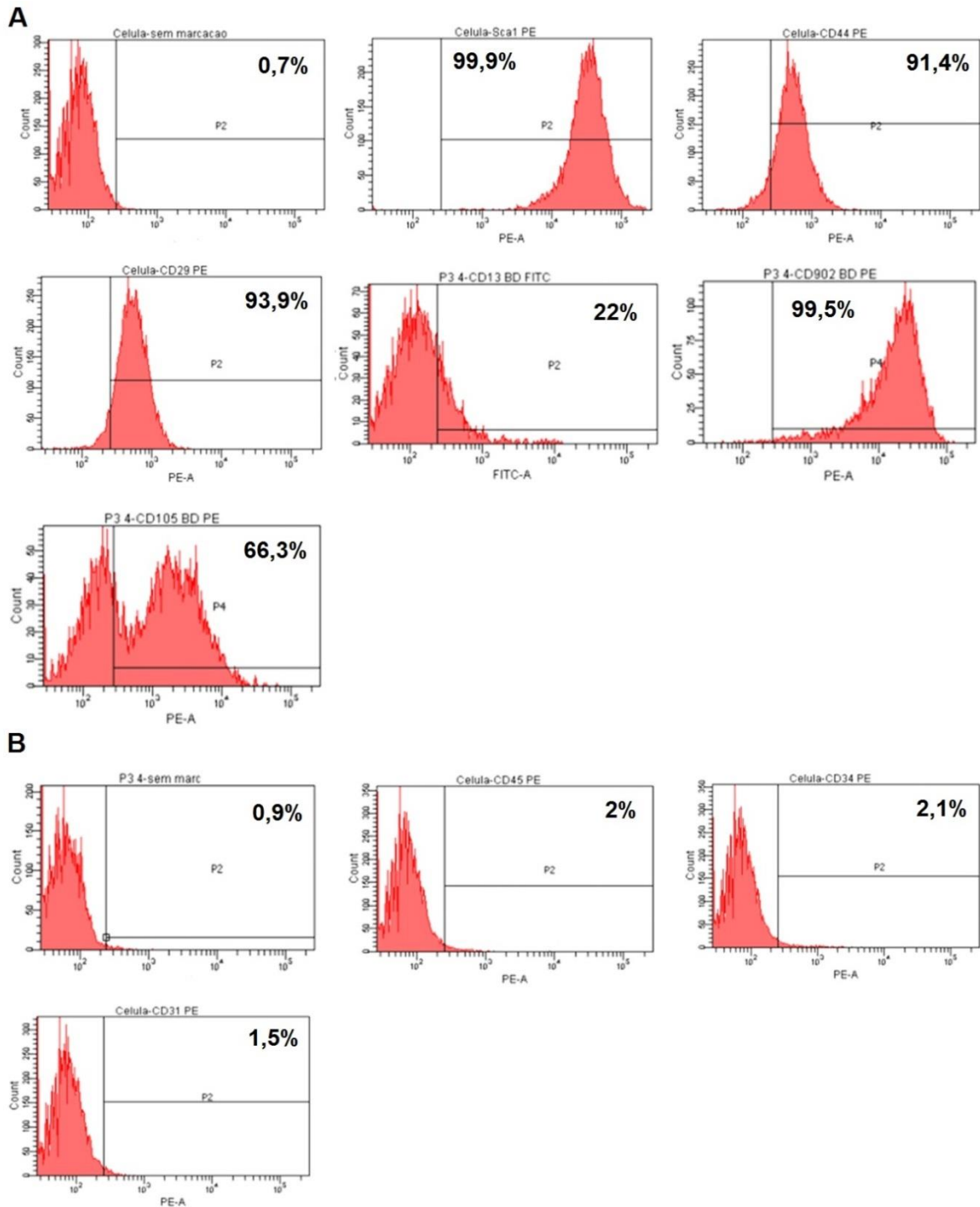


Figura 3. Imunofenotipagem das CTMs de tecido adiposo na quarta passagem. Os valores representam a percentagem média de células coradas positivamente, analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos mostram o tamanho de células *versus* a intensidade de fluorescência. (A): Marcadores positivos analisados em 10000 eventos. (B): Marcadores negativos analisados em 10000 eventos.

4.3. Potencial de diferenciação em multilinhagens

As CTMs foram monitoradas durante 3 semanas após a incubação com os meios de cultura de diferenciação específicos para cada tecido e DMEM-low suplementado com 10% de SFB para o controle. As diferenciações adipogênica, condrogênica e osteogênica e seus respectivos controles foram demonstradas, respectivamente, pela presença de vacúolos lipídicos, matriz extracelular com depósito de mucopolissacarídeos e formação de estruturas poligonais e nodulares mineralizadas com depósito de cálcio. A Figura 4 mostra que as CTMs isoladas do tecido adiposo possuem potencial de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos, bem como mostra a ausência de diferenciação nos controles.

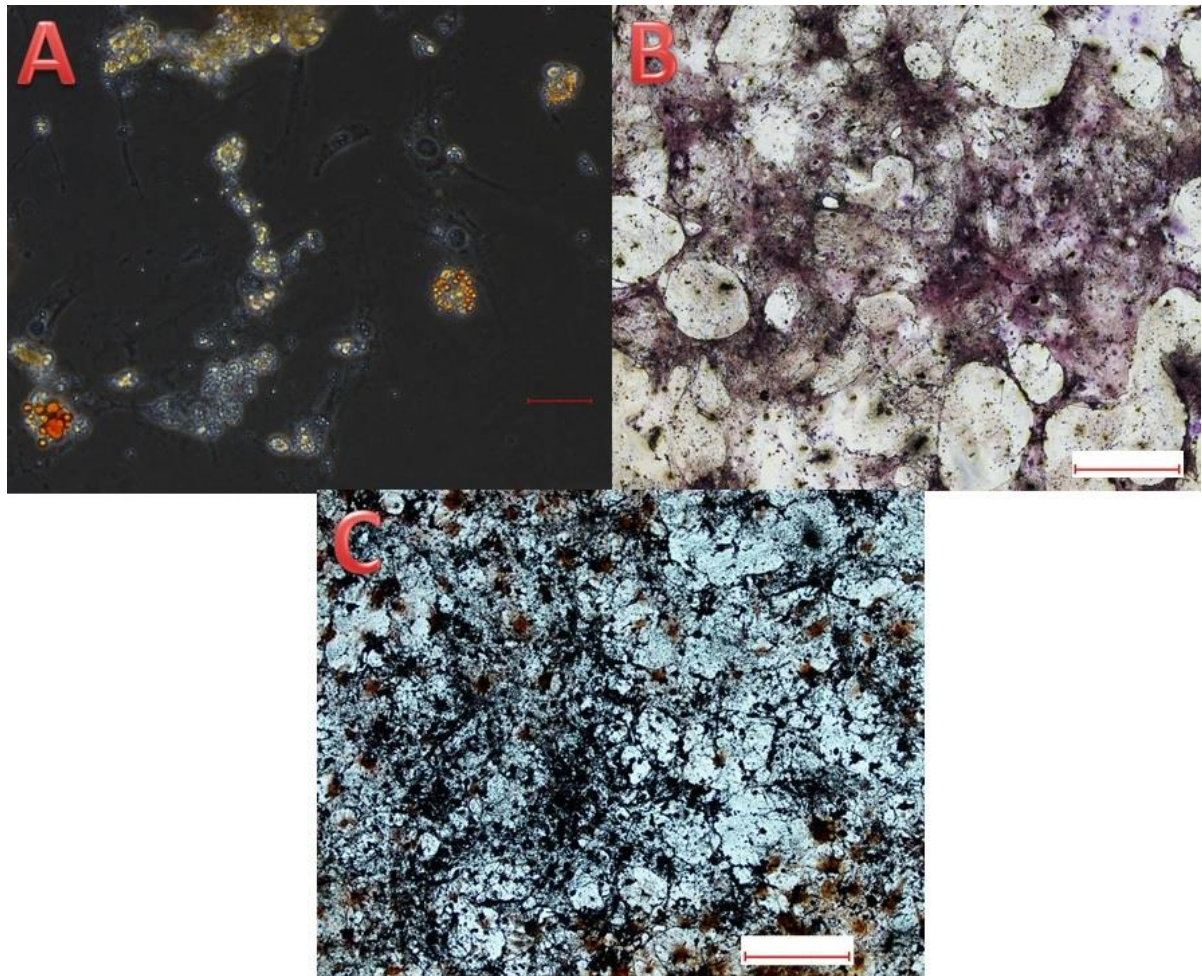


Figura 4. Potencial de diferenciação das CTMs de tecido adiposo. **(A):** Diferenciação adipogênica demonstrada pela formação intracitoplasmática de depósitos de lipídeos corados com Oil Red O. **(B):** Diferenciação condrogênica demonstrada pela coloração rosada de depósitos de mucopolissacarídeos na matriz extracelular, marcada com azul de toluidina. **(C):** Diferenciação osteogênica demonstrada pelo depósito de cálcio e mostrada pela coloração de Van Kossa, em preto. **A** Barra = 50 μm ; **B e C** Barra = 500 μm .

4.4. Avaliação da letalidade, função renal, estresse oxidativo e histopatologia renal na isquemia bilateral e na hiperuricemia sem e com tratamento com CTMs

A Figura 5 mostra que a letalidade (42,8%) de 80% DL50 *vCdt* i.p foi próxima ao valor teoricamente esperado. A maior incidência de morte na isquemia bilateral (72 h) foi menor que a maior incidência de morte no envenenamento (nesta dose e via) (24 h). Considerando que a predominância de letalidade de ambos os grupos foi nos primeiros 3 dias após os procedimentos e que após o terceiro dia e até o sétimo dia de acompanhamento não ocorreram mais mortes, o período de 24 h foi evidenciado como o mais apropriado para o conjunto de análises e procedimentos posteriores da situação dos indivíduos sobreviventes da IRA. Por outro lado, não houve mortalidade em ambos os grupos controles (controle e sham-operado), validando as padronizações. O tratamento com CTMs não causou morte no controle e nem em cada um dos dois modelos até 7 dias após a indução de IRA.

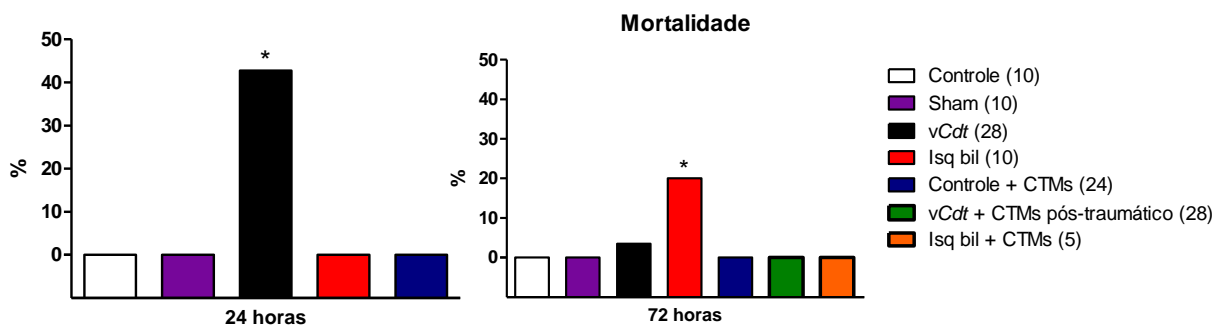


Figura 5. Decurso temporal da mortalidade em animais controle, envenenado (*vCdt*), controle tratado com CTMs (Controle + CTMs) e *vCdt* tratado com CTMs (*vCdt* + CTMs) observada após a indução de IRA em intervalos de 24h e 72h. Número de animais por grupo entre parênteses ao lado na legenda. Não houve ocorrência de morte nos tempos de 6h, 48h, 96h e 7 dias. Teste exato de Fisher bicaudal, $p < 0,05$ (asterisco indica valor diferente dos demais grupos em cada gráfico e entre *vCdt* 24h vs isq bil 72h).

Como mostra a Figura 6, os efeitos renais ao longo do tempo de tratamento com as CTMs de tecido adiposo sobre animais sadios (grupo controle) foram avaliados 24 h após o primeiro dia de administração das CTMs (Controle + CTMs 48 h), 24 h após a última dose ou terceiro dia de administração das CTMs (Controle + CTMs 96 h) e 7 dias após da primeira administração de CTMs (Controle + CTMs 7 dias).

Para avaliar os efeitos renais do tratamento com as CTMs de tecido adiposo sobre animais envenenados (grupo *vCdt*) (Figura 6) ou isquêmicos (grupo *Isq bil*) (Figura 7), a primeira administração de CTMs foi feita 24 h após as induções de ambos os modelos, ou seja, nos animais sobreviventes de cada grupo. Assim como no grupo controle, a coleta e análise das amostras foram realizadas 24 h após o primeiro dia de administração das CTMs (*vCdt* + CTMs 48 h e *Isq bil* + CTMs 48 h), 24 h após a última dose ou terceiro dia de administração das CTMs (*vCdt* + CTMs 96 h e *Isq bil* + CTMs 96 h) e 7 dias após a primeira administração de CTMs (*vCdt* + CTMs 7 dias e *Isq bil* + CTMs 7 dias).

A Figura 6 mostra a hiperuricemia 24 h após o envenenamento em relação ao controle, o qual foi remitido em 48 h no plasma, permanecendo sem alteração até 96 h. As CTMs induziram hiperuricemia no grupo Controle + CTMs 96 h. Apesar de ter induzido hiperuricemia nos animais sadios, as CTMs induziram hipouricemia nos animais envenenados nos tempos 48 h e 96 h. Hipercreatinemia foi detectada no grupo *vCdt* 24 h, 48 h e 96 h. Houve também hipercreatinemia no grupo Controle tratado com CTMs em 96 h. O tratamento com as CTMs restaurou ao nível normal a creatinemia dos animais envenenados em 48 h e 96 h. Houve hipoproteinemia no grupo *vCdt* em 48 h e 96 h com remissão após 7 dias da indução de IRA. O tratamento com CTMs diminuiu a proteinemia nos grupos Controle + CTMs 48 h, Controle + CTMs 96 h e Controle + CTMs 7 dias. As CTMs não influenciaram o padrão de resposta da proteinemia causado pelo envenenamento em todos os tempos avaliados. O *vCdt* produziu hipoureemia em 24 h e 48 h, com remissão após 96 h. O tratamento com CTMs não alterou a uremia nos animais Controle em todos os tempos avaliados. O tratamento com as CTMs produziu hiperuremia nos animais envenenados em 48h, com discreta melhora em 96 h.

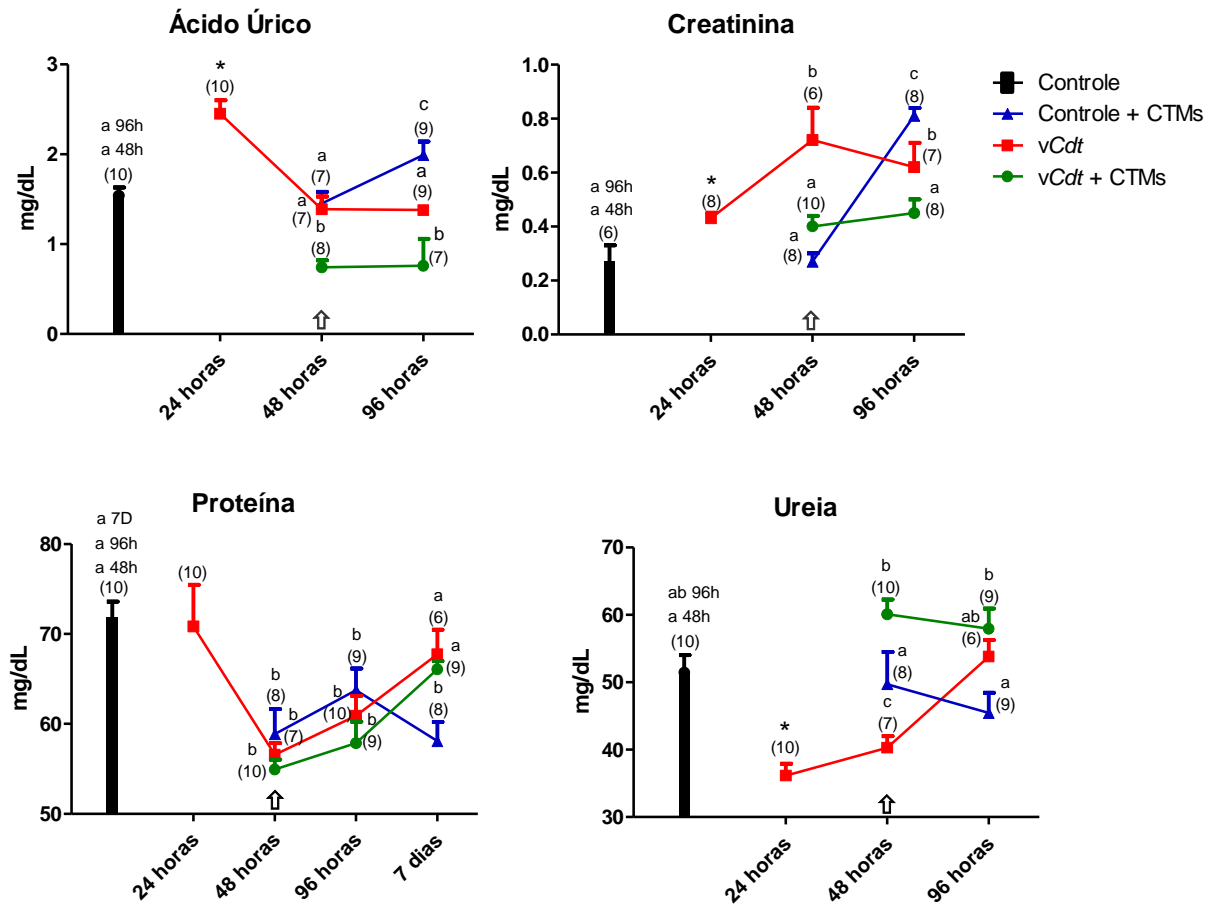


Figura 6. Decurso temporal das medidas de parâmetros plasmáticos da função renal de camundongos controle, controle tratados com CTMs (Controle + CTMs), envenenados sem tratamento (vCdt) e tratados com CTMs (vCdt + CTMs) após a indução da IRA. Valores são médias \pm E.P.M. de medidas feitas em triplicata. N = número de animais (entre parênteses na curva). Comparação de cada parâmetro a cada tempo entre os grupos: Controle vs vCdt (teste t de Student bicaudal asterisco indica diferença): 24 h - ácido úrico ($p < 0,0001$), creatinina ($p = 0,0148$), proteína ($p = 0,8521$) e ureia ($p = 0,0001$); Controle vs Controle + CTMs vs vCdt + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença entre os grupos a cada tempo, $p < 0,05$): 48 h - ácido úrico ($p < 0,0001$), creatinina ($p = 0,0001$), proteína ($p < 0,0001$) e ureia ($p = 0,0010$); 96 h - ácido úrico ($p < 0,0001$), creatinina ($p < 0,0001$), proteína ($p = 0,0006$) e ureia ($p = 0,0270$); 7 dias - proteína ($p = 0,0001$). Setas indicam o início do tratamento com CTMs.

A Figura 7 mostra que o envenenamento produziu hiperuricosúria em 24 h, a qual melhorou ao longo do tempo até a remissão em 96 h. Houve hipouricosúria no grupo Controle + CTMs em 48 h, com remissão em 96 h. Assim como no plasma, as CTMs promoveram hipouricosúria nos animais envenenados em todos os tempos. O envenenamento induziu hipercreatinúria após 24 h, agravada até 96 h. As CTMs induziram hipercreatinúria nos animais controle em 96 h. O tratamento com CTMs melhorou a creatinúria no envenenamento em 48h e restaurou em 96h. A proteinúria diminuiu nos animais envenenados em 48 h, 96 h e 7 dias da indução de IRA. As CTMs induziram diminuição da proteinúria nos animais controle em 48 h, a qual voltou ao nível normal em 96 h, permanecendo sem alteração até 7 dias. O tratamento dos envenenados com CTMs aumentou a proteinúria, diminuída pelo envenenamento em 48 h, a qual voltou ao nível do controle em 96 h e diminuiu em 7 dias, o que não pode ser interpretado como um efeito deletério das CTMs. O *vCdt* não alterou a ureia urinária em 24h, 48 h e 96 h. O tratamento com CTMs não alterou os níveis urinários de ureia nos animais controle. O tratamento com CTMs aumentou a ureia urinária dos animais envenenados em todos os tempos avaliados.

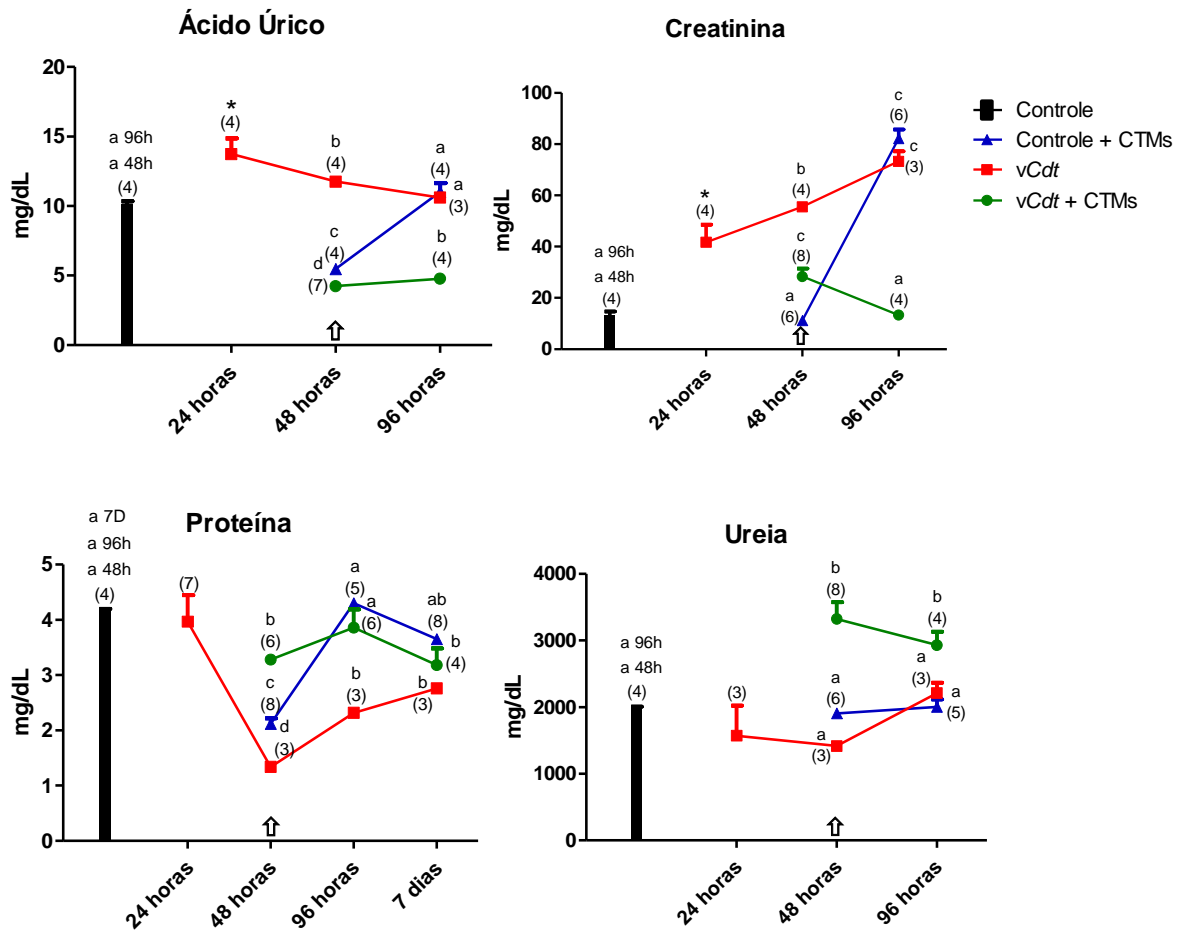


Figura 7. Decurso temporal das medidas de parâmetros urinários da função renal de camundongos controle, controle tratados com CTMs (Controle + CTMs), envenenados sem tratamento (vCdt) e tratados com CTMs (vCdt + CTMs) após a indução da IRA. Valores são médias \pm E.P.M. de medidas feitas em triplicata de *pools* de urina provenientes de 6-10 animais. N = número de *pools* (entre parênteses na curva). Comparação de cada parâmetro a cada tempo entre os grupos: Controle vs vCdt (teste t de Student bicaudal, asterisco indica diferença): 24 h - ácido úrico ($p=0,0206$), creatinina ($p=0,0073$), proteína ($p=0,7540$) e ureia ($p=0,3339$); Controle vs Controle + CTMs vs vCdt vs vCdt + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre os grupos a cada tempo, $p<0,05$): 48 h- ácido úrico ($p<0,0001$), creatinina ($p<0,0001$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p<0,0001$); 96 h- ácido úrico ($p<0,0001$), creatinina ($p<0,0001$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p=0,0009$); 7 dias - proteína ($p=0,0241$). Setas indicam o início do tratamento com CTMs.

A Figura 8 mostra que a isquemia bilateral induziu hipouricemia em 48 h, com remissão em 96 h. O grupo Sham operado apresentou hipouricemia, hipouremia e hipercreatinemia. O tratamento com as CTMs não alterou a uricemia dos animais isquêmicos em 96 h. Os grupos Isq bil 24 h, 48 h, 96 h e 7 dias apresentaram hipercreatinemia. O tratamento com as CTMs não alterou a hipercreatinemia causada pela isquemia em 96 h, mas esse parâmetro melhorou após 7 dias. Houve hipoproteinemia no grupo Sham e nos animais isquêmicos em 48 h e 96 h, com remissão em 7 dias. O tratamento da isquemia bilateral com as CTMs não alterou a hipoproteinemia em 96 h, a qual remitiu em 7 dias. A isquemia aumentou a uremia em 24 h 48 h e 96 h. O tratamento da isquemia com CTMs induziu uma diminuição da uremia para nível abaixo daquele do controle em 96 h. As alterações causadas pelas CTMs nos parâmetros plasmáticos da função renal dos animais controle já foram descritas anteriormente na Figura 6.

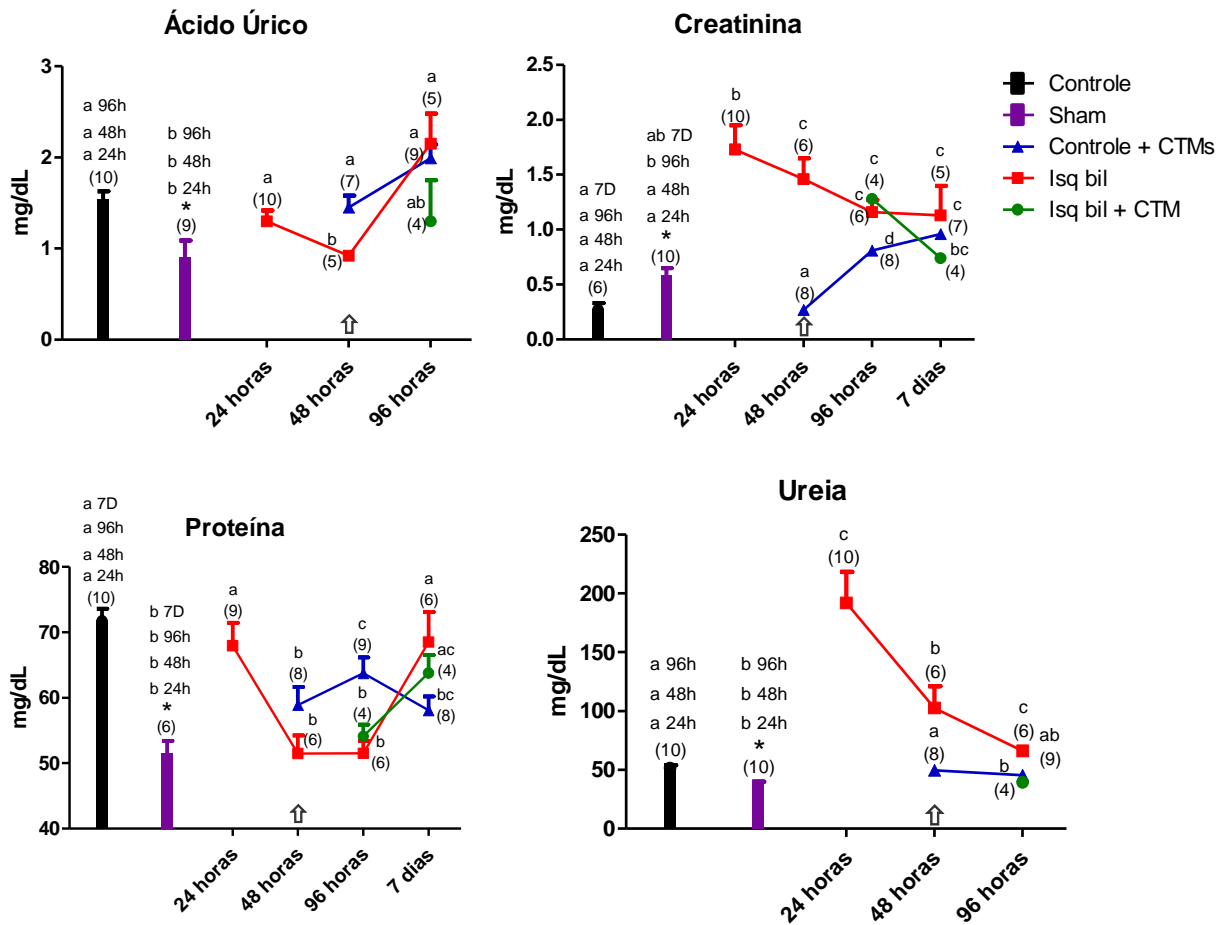


Figura 8. Decurso temporal das medidas de parâmetros plasmáticos da função renal de camundongos controle, controle tratados com CTMs (Controle + CTMs), controle cirúrgico (Sham), com isquemia bilateral sem tratamento (Isq bil) e tratados com CTMs (Isq bil + CTMs) após a indução da IRA. Valores são médias \pm E.P.M. de medidas feitas em triplicata. N = número de animais (entre parênteses na curva). Comparação de cada parâmetro a cada tempo entre os grupos: Controle vs Sham (teste t de Student bicaudal, asterisco indica diferença estatística): 0 h - ácido úrico ($p=0,0059$), creatinina ($p=0,0071$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p=0,0002$); Controle vs Sham vs Isq bil (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 24h - ácido úrico ($p=0,0100$), creatinina ($p=0,0004$), proteína ($p=0,0001$) e ureia ($p<0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 48h - ácido úrico ($p=0,0027$), creatinina ($p<0,0001$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p<0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs vs Isq bil + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 96h - ácido úrico ($p=0,0007$), creatinina ($p<0,0001$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p<0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs vs Isq bil + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 7 dias - creatinina ($p=0,0002$) e proteína ($p<0,0001$). Setas indicam o início do tratamento com CTMs.

A Figura 9 mostra que a uricosúria diminuiu no grupo Sham, e nos animais isquêmicos em 48 h, normalizando-se em 96 h. O tratamento com CTMs diminuiu a uricosúria dos animais isquêmicos em 96 h. Houve aumento de creatinúria no grupo Sham, assim como nos animais isquêmicos em 48 h e 96 h, sendo restaurada em 7 dias. O tratamento dos animais isquêmicos com CTMs não melhorou o aumento de creatinúria em 96 h e ainda causou aumento adicional em 7 dias. Houve diminuição de proteinúria no grupo Sham, e aumento nos animais isquêmicos em 24 h, bem como diminuição em 48 h, 96 h e 7 dias. O tratamento com CTMs causou diminuição da proteinúria nos animais isquêmicos em 96 h e 7 dias, o que não pode ser interpretado como um efeito deletério das CTMs. A ureia urinária aumentou no grupo Sham. Houve diminuição de ureia urinária nos animais isquêmicos em 24 h, 48 h e 96 h. O tratamento com CTMs restaurou a diminuição de ureia urinária causada pela isquemia em 96 h. As alterações causadas pelas CTMs nos parâmetros urinários da função renal dos animais controle já foram descritas anteriormente na Figura 7.

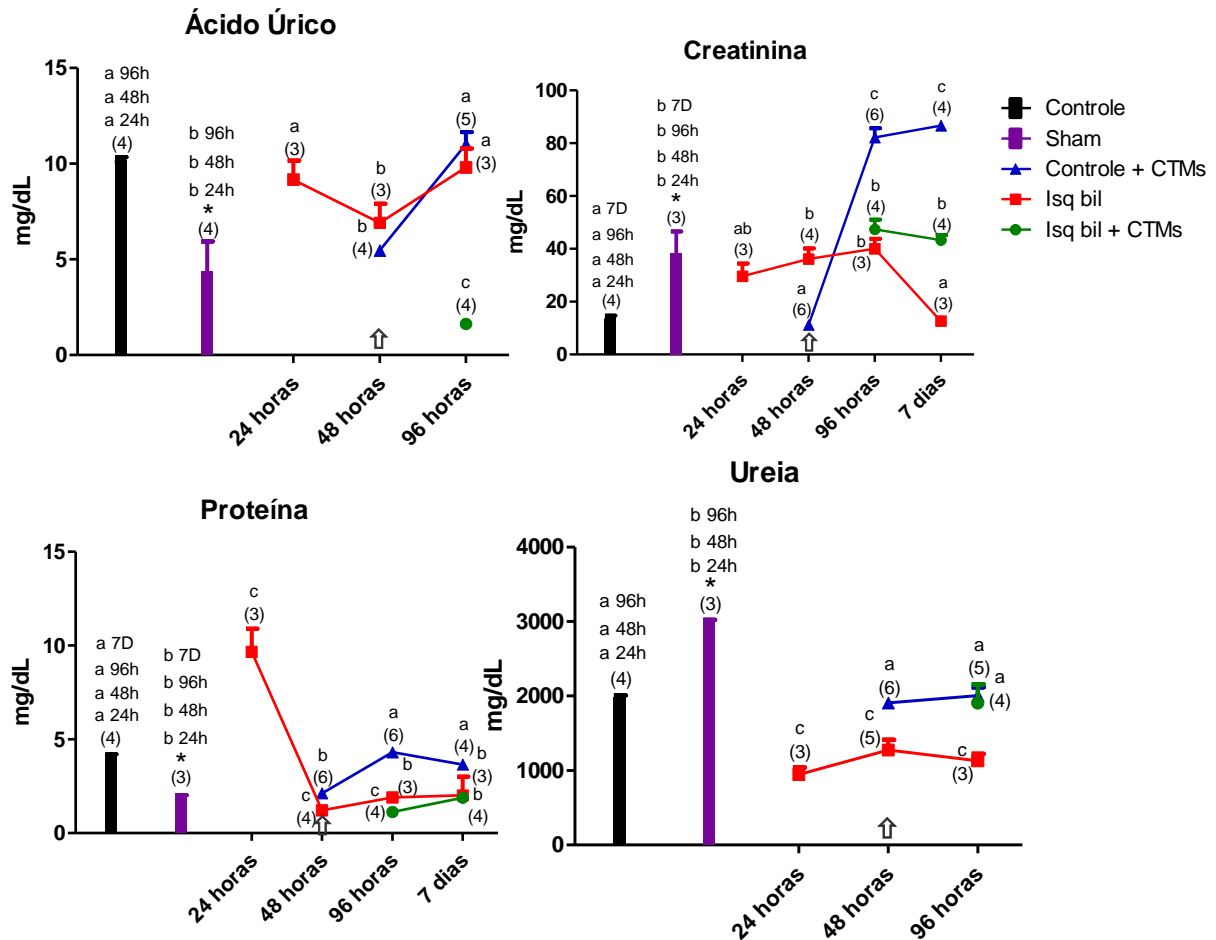


Figura 9. Decurso temporal das medidas de parâmetros urinários da função renal de camundongos controle, controle tratados com CTMs (Controle + CTMs), controle cirúrgico (Sham), com isquemia bilateral sem tratamento (Isq bil) e tratados com CTMs (Isq bil + CTMs) após a indução da IRA. Valores são médias \pm E.P.M. de medidas feitas em triplicata de *pools* de urina provenientes de 6-10 animais. N = número de *pools* (entre parênteses na curva). Comparação de cada parâmetro a cada tempo entre os grupos: Controle vs Sham (teste t de Student bicaudal, asterisco indica diferença): 0 h - ácido úrico ($p=0,0074$), creatinina ($p=0,0174$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p<0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 24h - ácido úrico ($p=0,0484$), creatinina ($p=0,0224$), proteína ($p=0,0002$) e ureia ($p<0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 48h - ácido úrico ($p=0,0018$), creatinina ($p=0,0001$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p<0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs vs Isq bil + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 96h - ácido úrico ($p<0,0001$), creatinina ($p<0,0001$), proteína ($p<0,0001$) e ureia ($p<0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs vs Isq bil + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p<0,05$): 7 dias - creatinina ($p<0,0001$) e proteína ($p=0,0007$). Setas indicam o início do tratamento com CTMs.

A Figura 10 mostra que o envenenamento causou aumento da razão GSSG/GSH no córtex e na medula em todos os tempos avaliados. O tratamento com CTMs não alterou a razão GSSG/GSH nos animais controle e restaurou o aumento causado pelo envenenamento em ambas as porções do rim em 48 h e 96 h. O envenenamento diminuiu os níveis de MDA no córtex e na medula em 24 h, os quais remeteram em 48 h, mantendo-se assim no córtex, mas aumentando na medula em 96 h. O tratamento com CTMs diminuiu o MDA no córtex e na medula dos animais controle e envenenados em todos os tempos avaliados.

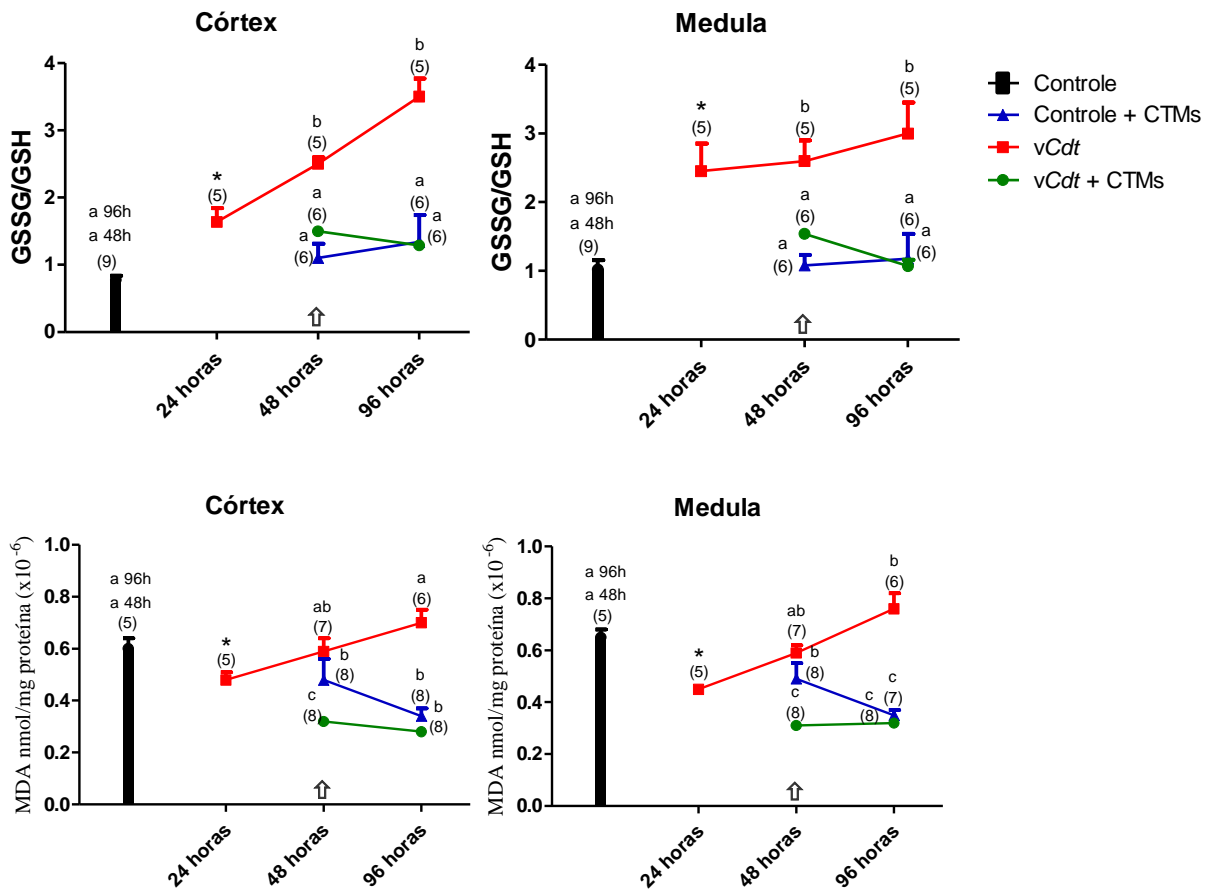


Figura 10. Decurso temporal das medidas de parâmetros do estresse oxidativo no córtex e medula renal de camundongos controle, controle tratados com CTMs (Controle + CTMs), envenenados sem tratamento (*vCdt*) e tratados com CTMs (*vCdt* + CTMs) após a indução da IRA. Valores são médias \pm E.P.M. de medidas feitas em triplicata. N = número de animais (entre parênteses na curva). Comparação de cada parâmetro a cada tempo entre os grupos: Controle vs *vCdt* (teste t de Student bicaudal, asterisco indica diferença): 24 h – GSSG/GSH Córtex ($p=0,0002$), GSSG/GSH Medula ($p=0,0014$) MDA Córtex ($p=0,0432$); MDA Medula ($p=0,0002$); Controle vs Controle + CTMs vs *vCdt* vs *vCdt* + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre os grupos a cada tempo, $p<0,05$): 48 h- GSSG/GSH Córtex ($p<0,0001$), GSSG/GSH Medula ($p<0,0001$); MDA Córtex ($p=0,0041$); MDA Medula ($p<0,0001$); 96 h- GSSG/GSH Córtex ($p<0,0001$), GSSG/GSH Medula ($p<0,0001$); MDA Córtex ($p<0,0001$); MDA Medula ($p<0,0001$). Setas indicam o início do tratamento com CTMs.

A Figura 11 mostra que a isquemia aumentou a razão GSSG/GSH no córtex e na medula em todos os tempos avaliados. O tratamento com CTMs diminuiu a razão GSSG/GSH do córtex e da medula de animais isquêmicos abaixo dos níveis do Controle em 96 h. A isquemia diminuiu o MDA em 96 h no córtex e na medula, e em 48 h na medula. O tratamento com CTMs não restaurou a diminuição de MDA causada pela isquemia no córtex e na medula em 96 h, permanecendo abaixo dos níveis dos animais Controle. Houve diminuição da razão GSSG/GSH e de MDA no córtex e na medula dos animais do grupo Sham em 24 h.

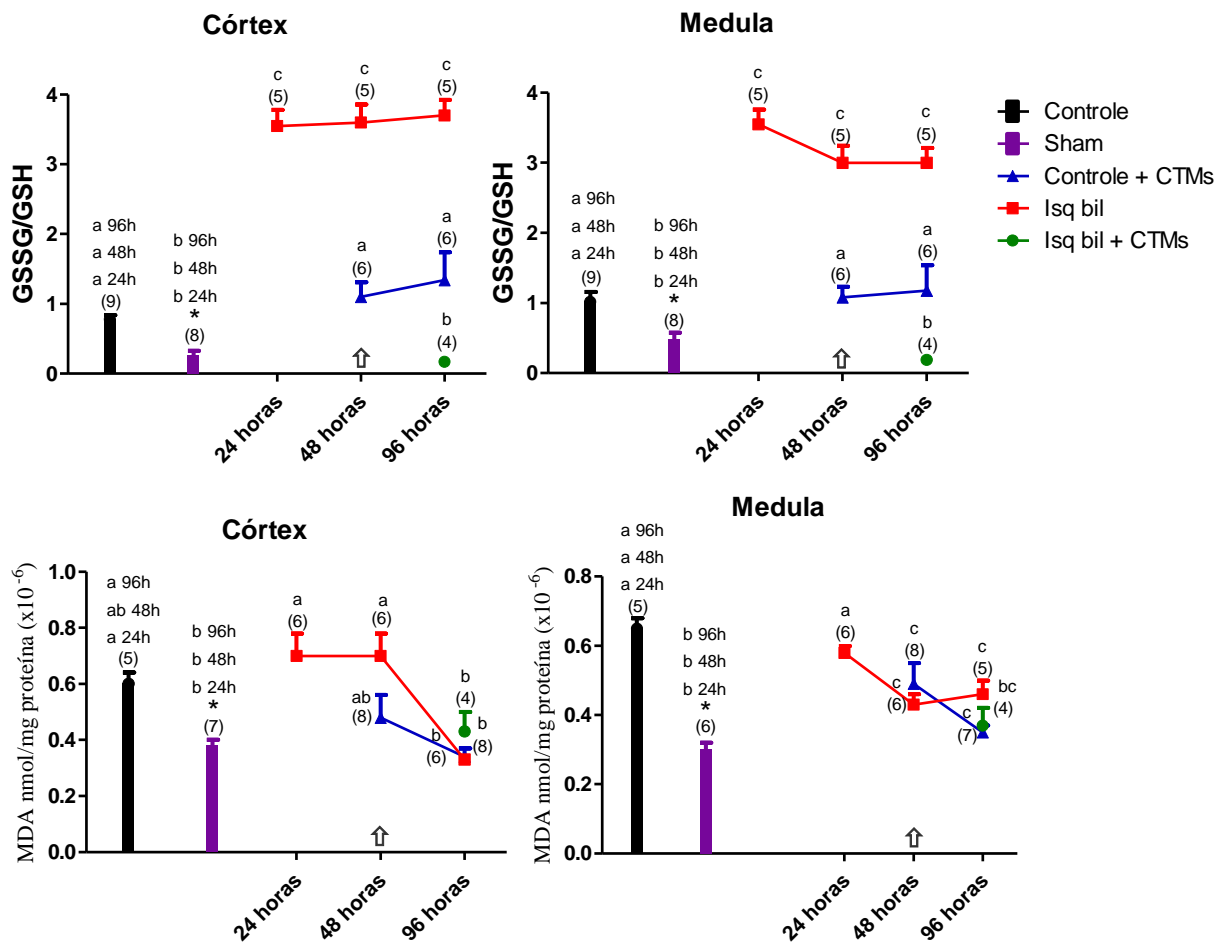


Figura 11. Decurso temporal das medidas de estresse oxidativo no córtex e medula renal de camundongos controle, controle tratados com CTMs (Controle + CTMs), controle cirúrgico (Sham), com isquemia bilateral sem tratamento (Isq bil) e tratados com CTMs (Isq bil + CTMs) após a indução da IRA. Valores são médias \pm E.P.M. de medidas feitas em triplicata. N = número de animais (entre parênteses na curva). Comparação de cada parâmetro a cada tempo entre os grupos: Controle vs Sham (teste t de Student bicaudal, asterisco indica diferença estatística); 0 h – GSSG/GSH Córtex ($p < 0,0001$), GSSG/GSH Medula ($p = 0,0078$); MDA Córtex ($p = 0,0003$), MDA Medula ($p < 0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letras indicam diferença estatística entre esses grupos, $p < 0,05$): 24h - GSSG/GSH Córtex ($p < 0,0001$), GSSG/GSH Medula ($p < 0,0001$); MDA Córtex ($p = 0,0012$), MDA Medula ($p < 0,0001$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letra indicam diferença estatística entre esses grupos, $p < 0,05$): 48h - GSSG/GSH Córtex ($p < 0,0001$), GSSG/GSH Medula ($p < 0,0001$); MDA Córtex ($p = 0,0121$), MDA Medula ($p = 0,0002$); Controle vs Sham vs Isq bil vs Controle + CTMs vs Isq bil + CTMs (ANOVA, p entre parênteses, seguido de teste post hoc Student-Newman-Keuls, diferentes letra indicam diferença estatística entre esses grupos, $p < 0,05$): 96h - GSSG/GSH Córtex ($p < 0,0001$), GSSG/GSH Medula ($p < 0,0001$); MDA Córtex ($p < 0,0001$), MDA Medula ($p = 0,0001$). Setas indicam o início do tratamento com CTMs.

A Figura 12 mostra que não ocorreram alterações histopatológicas estruturais ou comprometimento intersticial renal no grupo controle. O grupo vCdt 24 h não apresentou alterações estruturais nos glomérulos e no interstício, mas houve discreta degeneração tubular. Após 7 dias da indução, o quadro histopatológico do grupo vCdt piorou, com os glomérulos apresentando proliferação celular, discreta degeneração glomerular multifocal, túbulos com moderada degeneração e interstício sem comprometimento.

A Figura 13 mostra que, comparativamente ao controle, a indução de IRA por isquemia bilateral causou discreta degeneração multifocal glomerular, severa degeneração tubular e necrose multifocal com infiltrado inflamatório predominantemente de neutrófilos em 24 h. Após 7 dias da indução de IRA por isquemia bilateral ocorreu um aumento da proliferação celular nos glomérulos, com o mesmo quadro de discreta degeneração glomerular multifocal e degeneração tubular severa com necrose multifocal.

A Figura 14 mostra morfologias semelhantes entre os grupos controles com e sem tratamento com CTMs. As CTMs não causaram alterações glomerulares, mas causaram moderada degeneração e necrose tubular multifocal sem alteração intersticial em 24 h no grupo controle. Porém, as CTMs não causaram nenhuma alteração estrutural nos demais tempos e sim um aumento da proliferação celular nos glomérulos em 96 h e 7 dias nos animais controle.

As CTMs não restauraram as alterações causadas pelo envenenamento, mas melhoraram o grau de degeneração e necrose glomerular e tubular em 48 h, 96 h e 7 dias. Também houve um aumento de proliferação celular progressiva nos glomérulos dos animais envenenados em 48 h, 96 h e 7 dias.

A Figura 15 mostra que mesmo com o tratamento com as CTMs, os animais isquêmicos continuaram com o quadro de discreta degeneração glomerular multifocal, moderadas a severas degenerações e necrose tubular sem alterações no interstício em 96 h. Em 7 dias os animais isquêmicos tratados com CTMs apresentaram uma atenuação no infiltrado e na proliferação celular sem alterar o grau de degeneração glomerular e tubular, assim como melhora na necrose tubular causada pela isquemia.

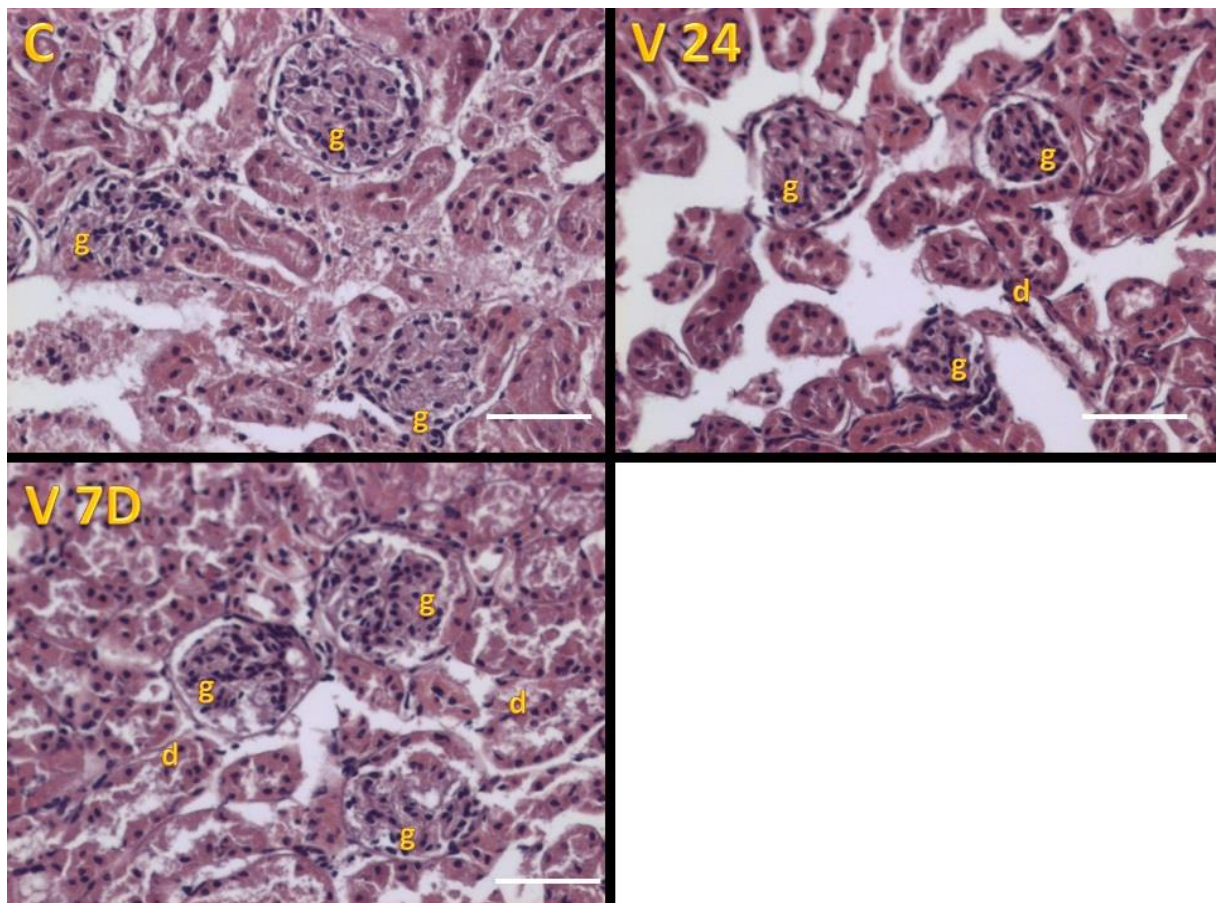


Figura 12. Histopatologia renal de animais controle (C) e envenenados, após 24 h (V 24), 48 h (V 48), 96 h (V 96) e 7 dias (V 7D) após a indução da IRA. As lâminas com corte sagital foram coradas com hematoxilina-eosina. Glomérulo (g), degeneração (d). Barras = 100 μ m.

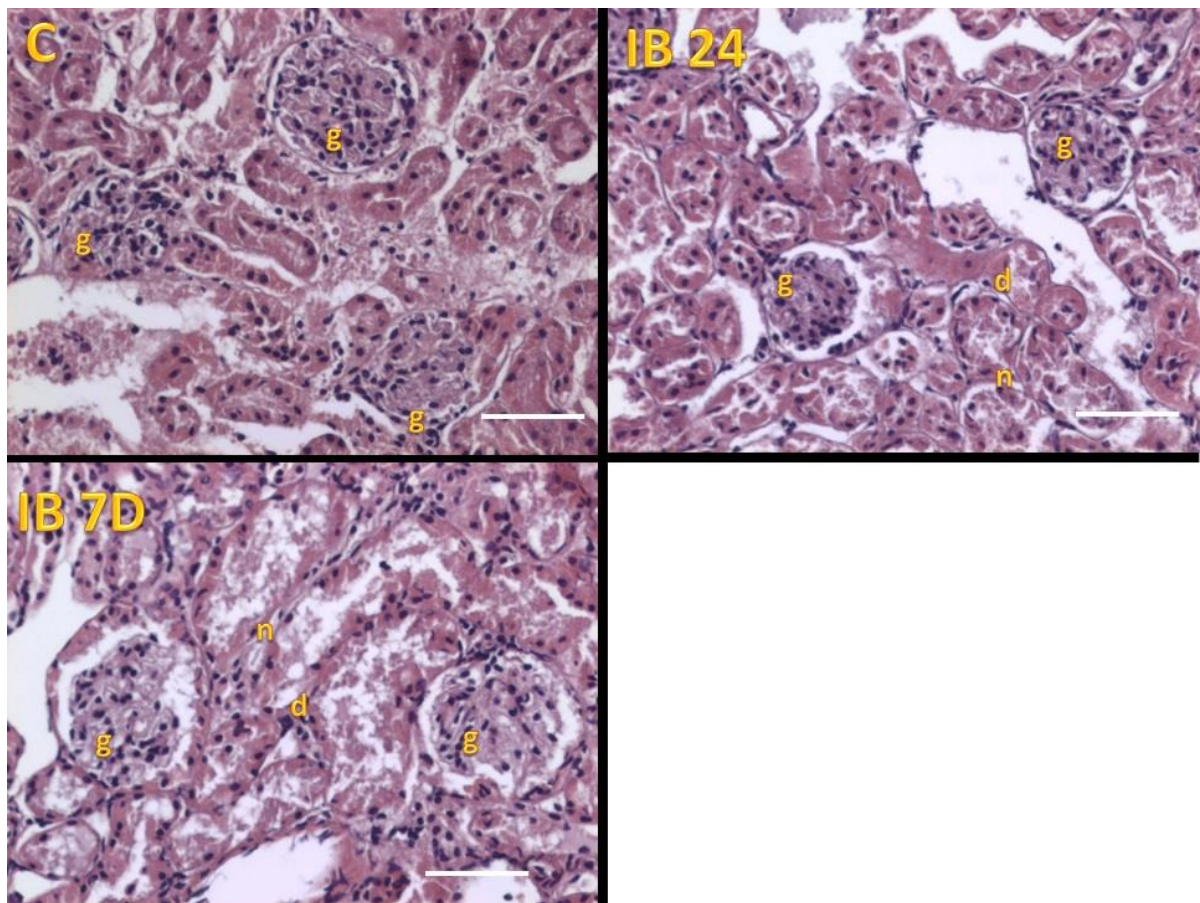


Figura 13. Histopatologia renal de animais controle (C) e envenenados, após 24 h (V 24), 48 h (V 48), 96 h (V 96) e 7 dias (V 7D) após a indução da IRA. As lâminas com corte sagital foram coradas com hematoxilina-eosina. Glomérulo (g), degeneração (d), necrose (n). Barras = 100 μm.

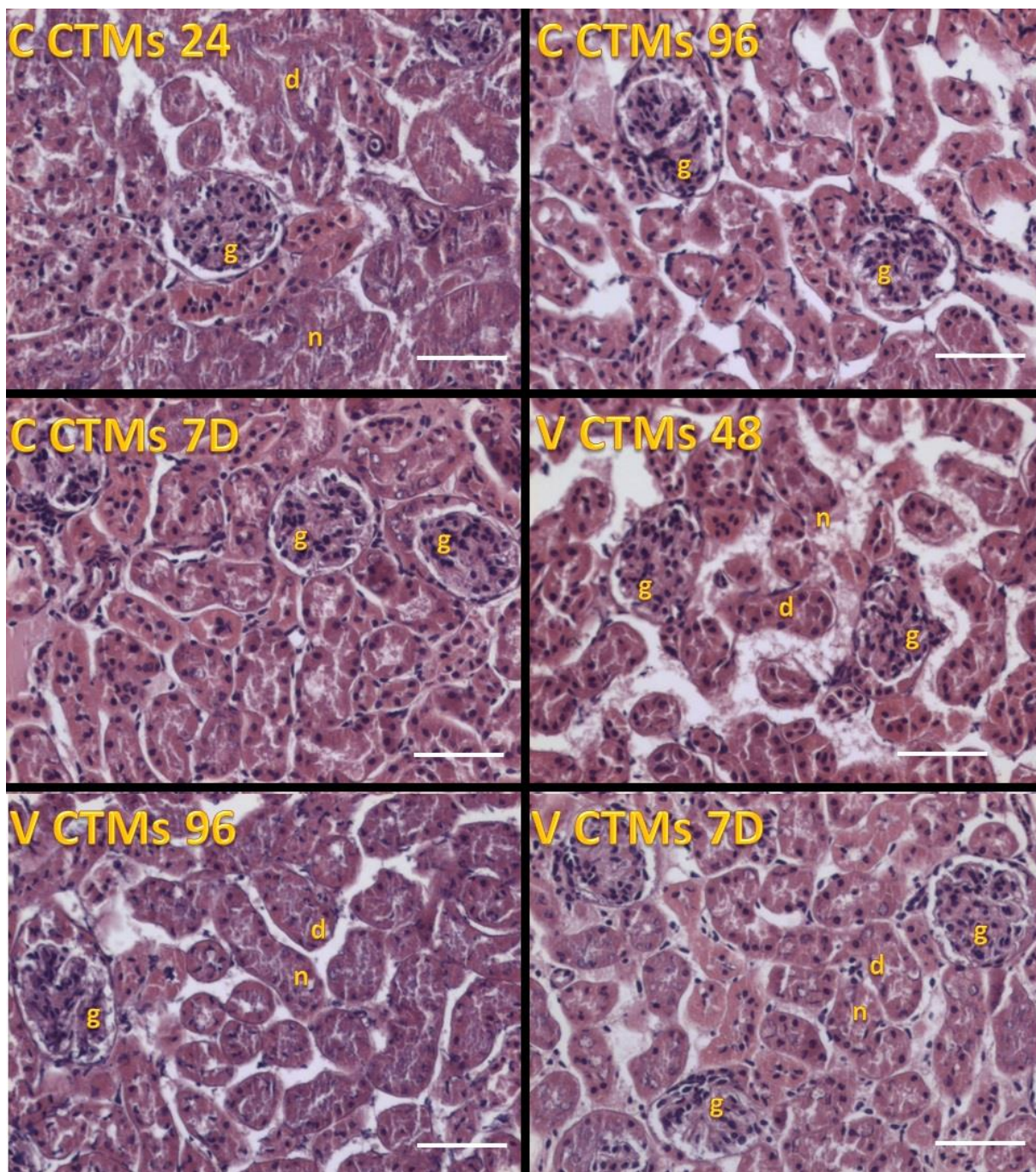


Figura 14. Histopatologia renal de animais controle tratados com CTMs em 24 h (C CTMs 24), 96 h (C CTMs 96) e 7 dias (C CTMs 7D) após a administração de PBS, bem como de animais envenenados tratados com CTMs 48 h (V CTMs 48), 96 h (V CTMs 96) e 7 dias (V CTMs 7D) após a indução de IRA. As lâminas com corte sagital foram coradas com hematoxilina-eosina. Glomérulo (g), degeneração (d), necrose (n). Barras = 100 μm.

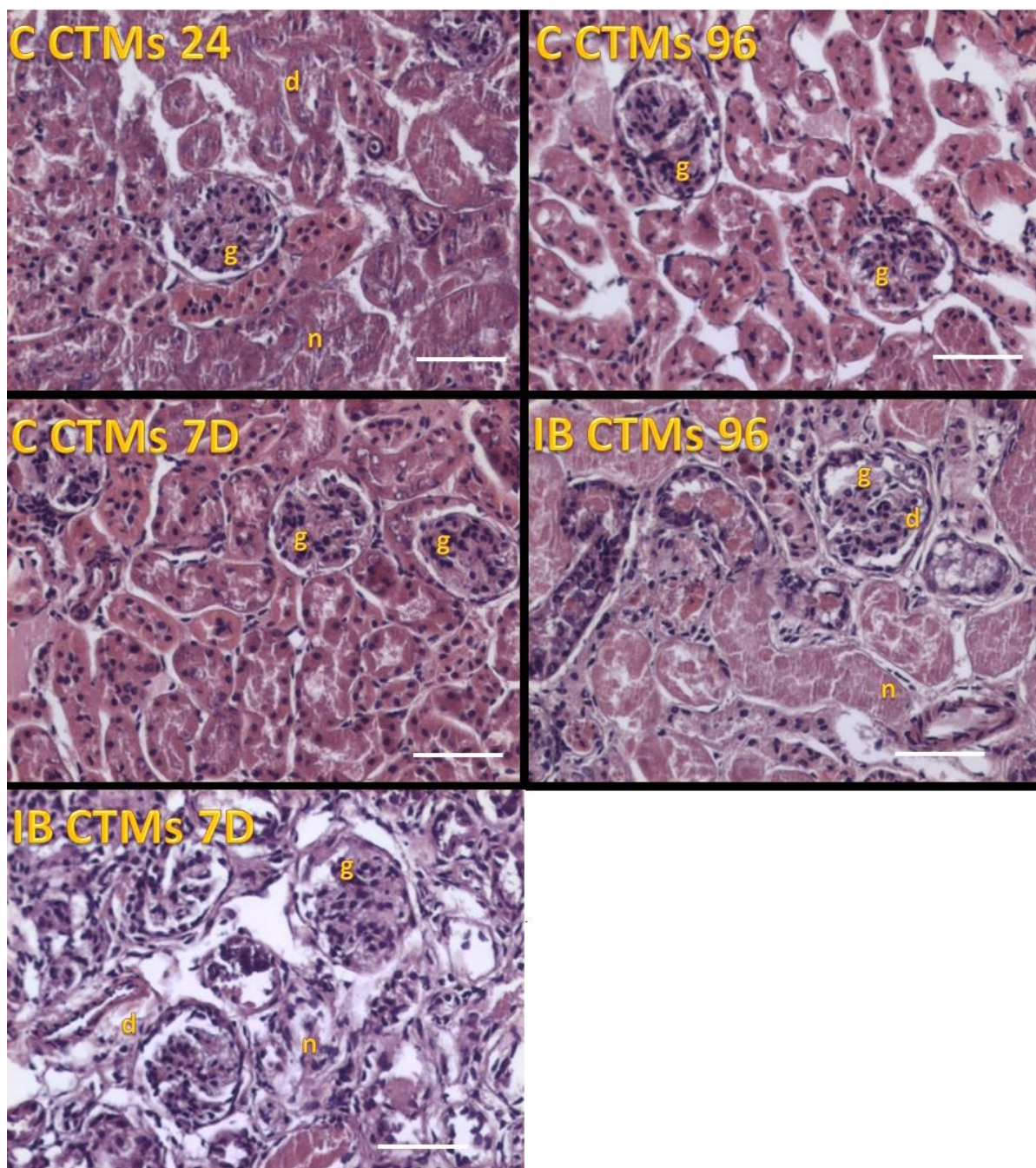


Figura 15. Histopatologia renal de animais controle tratados com CTMs em 24 h (C CTMs 24), 96 h (C CTMs 96) e 7 dias (C CTMs 7D) após a administração de PBS, bem como de animais isquêmicos tratados com CTMs 96 h (IB CTMs 96) e 7 dias (IB CTMs 7D) após a indução de IRA. As lâminas com corte sagital foram coradas com hematoxilina-eosina. Glomérulo (g), degeneração (d), necrose (n). Barras = 100 μm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Comparação da IRA induzida por isquemia bilateral e por hiperuricemia e suas implicações fisiopatológicas

Sabe-se que na isquemia ocorre um pico de elevação de creatinina e ureia plasmática, 24 h e 72 h após a indução, seguido de declínio e remissão 7 ou 8 dias após a indução (SAFIRSTEIN et al., 1998; PARK et al., 2001), tal qual é constatado no presente estudo. Com base nisso, o período de 7 dias após a indução de IRA foi aqui considerado como suficiente para a consolidação da função renal pós-IRA e dos efeitos das CTMs, já que não há dados anteriores de acompanhamento da função renal após sobrevivência ao envenenamento crotálico.

A coleta das amostras no presente estudo nas primeiras 24 h após a indução da IRA por envenenamento baseia-se na constatação de que os níveis séricos de veneno estão mais elevados neste período (AMARAL et al., 1997). Além disso, a instalação de IRA ocorre nas primeiras 48 h após o envenenamento (AMARAL et al., 1986; RIBEIRO et al., 1998; MONTEIRO et al., 2001; AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; PINHO et al., 2005). Por outro lado, como a terapia sorológica geralmente é iniciada em até 4 h após o acidente ofídico e, geralmente, é bem sucedida (AMARAL et al., 1997), decorre a premissa de que o tratamento do envenenamento por CTMs, até pelo risco inerente que representa, seria somente aplicável em uma fase posterior a esse período, focando as possíveis sequelas dos sobreviventes do acometimento inicial mais grave, já submetidos ao tratamento sorológico e outros cuidados convencionais. A redução do número de óbitos decorrentes de acidentes ofídicos é proporcional à rapidez do atendimento, uma vez que 60% dos acidentes que evoluem para óbito recebem atendimento em período igual ou superior a 6 h após o acidente. Por isso, é muito importante a precocidade no tratamento do envenenamento crotálico com soro antiveneno para a neutralização do maior teor possível de veneno, o qual sabe-se que é maior na circulação sanguínea durante as primeiras horas decorridas do acidente (AMARAL et al., 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

No caso da isquemia, o momento da coleta das amostras e o início do tratamento com CTMs estão baseados no conhecimento do elevado potencial de regeneração renal por meio de mecanismos autócrinos e parácrinos. No entanto, em alguns casos já é conhecido que a lesão isquêmica é irreversível, ainda que sob tratamento convencional (SALLUSTIO et al., 2015; ZABELL et al., 2017), levando a doença renal terminal (KHAN et al., 2016). O tempo de isquemia é proporcionalmente relacionado aos danos causados e, por isso, assim como no envenenamento crotálico, há a necessidade de terapia imediata (ZABELL et al., 2017). Estima-se que cada minuto adicional em um quadro isquêmico está associado a um aumento de 6% na incidência de um dano crônico (ZABELL et al., 2017). O tempo em que os danos causados pela isquemia se tornam irreversíveis ainda é controverso, mas a maioria dos estudos indica que esses danos começam de 25 a 35 min após a isquemia (ZABELL et al., 2017).

A análise histológica do presente estudo mostra que houve necrose e degeneração tubular tanto nos animais isquêmicos, quanto nos animais envenenados em 24 h após a indução da IRA, piorando em 7 dias. As células tubulares são particularmente suscetíveis à isquemia por algumas razões. Em primeiro lugar, este tipo de célula tem uma elevada taxa metabólica para a mediação do transporte de íons. Em segundo lugar, por conta da hipoperfusão microvascular nesta região, após a lesão, e que persiste mesmo quando o fluxo sanguíneo cortical retorna ao normal, há formação de edema intersticial, levando a um maior comprometimento no fluxo sanguíneo. (SHARFUDDIN et al., 2011; ZUK & BONVENTRE, 2016). A regulação do fluxo sanguíneo afeta o metabolismo da célula endotelial e, no rim, a regulação deste fluxo é fundamental, especialmente para a normalidade da filtração glomerular. Em condições fisiológicas, o córtex renal, onde estão os glomérulos, recebe a maior parte do fluxo sanguíneo, enquanto a medula recebe cerca de 10%. Durante a isquemia, a redução do fluxo sanguíneo não é uniforme, sendo maior na medula que no córtex, tendo como primeiro efeito justamente uma lesão endotelial (MUNSHI et al., 2011). O estresse oxidativo causado pelo modelo de isquemia aqui estudado proporciona liberação de EROS tanto no córtex quanto na medula, mas a análise histológica evidencia um maior comprometimento tubular do que glomerular. A redução do suprimento de oxigênio (hipóxia tecidual) que foram causados pela isquemia podem ter reduzido os níveis

de ATP, aumentando a degradação de AMP, acumulando hipoxantina e exacerbando a produção de EROS que, pelo excesso, gera desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e as reservas de antioxidantes endógenos que podem ter levado a danos progressivos nas estruturas renais e ocasionado a proteinúria (COCA et al., 2009). As EROS aumentadas no córtex e medula renal e a proteinúria, ocasionadas pela indução de isquemia bilateral em 24 h são sinais de comprometimento da vitalidade celular. O aumento da razão GSSG/GSH nos animais envenenados e isquêmicos pode estar contribuindo para a apoptose e morte celular, alterando a ação de fatores de crescimento e a proliferação celular, que são essenciais para o reparo e regeneração tecidual dos processos inflamatórios e imunológicos, além da regulação dos sistemas hemodinâmico, hemostático e vascular (DE FÁTIMA FERNANDES VATTIMO et al., 2011; MALEK & NEMATBAKHSI, 2015). Do ponto de vista fisiopatológico, a doença isquêmica renal é considerada como resultante da hipóxia tecidual (REQUIÃO-MOURA et al., 2015). Como mencionado anteriormente, em resposta a esse efeito o organismo utiliza mecanismos compensatórios para regular a perfusão glomerular. No presente estudo, foi observado que há presença de células polimorfonucleares no tecido renal dos animais isquêmicos, e esse infiltrado inflamatório é predominantemente de neutrófilos, o qual é o tipo de infiltrado característico de lesão isquêmica (DE FÁTIMA FERNANDES VATTIMO et al., 2011; HADI et al., 2011). A maior expressão de moléculas de adesão e de células polimorfonucleares pelo endotélio tubular pode ser resultado da diminuição da pressão glomerular e da taxa de filtração glomerular, diminuindo abruptamente a produção renal de prostaglandinas, calicreína, cininas e óxido nítrico (NO), prejudicando a vasodilatação, levando ao bloqueio da síntese de Ang II pelos inibidores da ECA, assim alterando o equilíbrio do tônus vascular entre a arteríola aferente e eferente, o que é crucial para a hemodinâmica glomerular (SHARFUDDIN et al., 2011). A adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular é o primeiro passo no extravasamento destas células no tecido (AKCAY et al., 2009). Após a adesão e a quimiotaxia, os neutrófilos infiltrantes podem liberar espécies reativas de oxigênio que danificam as células tubulares (AKCAY et al., 2009), o que pode ter causado a degeneração e necrose tubular. Esse aumento da expressão de neutrófilos aqui observado pode estar causando obstrução das vasa recta e congestão medular, piorando a isquemia tecidual mesmo após a restauração do fluxo sanguíneo. Este

processo de infiltração e adesão de neutrófilos depende da ativação e/ou expressão de receptores, presentes tanto na membrana, como na superfície das células endoteliais (QUINTAES & NORONHA 1998; AKCAY et al., 2009). Acredita-se que no processo de isquemia-reperfusão ocorra liberação de moléculas pró-inflamatórias, como citocinas e quimocinas, dentre as quais se destacam o fator de necrose tumoral (TNF) alfa e a interleucina (IL) 1 (QUINTAES & NORONHA 1998; AKCAY et al., 2009; HADI et al., 2011; JANG & RABB 2015). O processo de adesão pode ser dividido em três etapas distintas. Num primeiro momento, a célula circulante aproxima-se da parede vascular e rola sobre o endotélio. Numa segunda fase, o leucócito, em contato com o vaso, sofre a ação de quimocinas e passa a expressar moléculas ativadas que vão determinar uma ligação firme à superfície endotelial. Somente então, o leucócito é capaz de migrar através do vaso em direção ao tecido (QUINTAES & NORONHA 1998; AKCAY et al., 2009; JANG & RABB 2015). Todos os segmentos do néfron podem estar sendo afetados durante o processo isquêmico, ou outros tipos de lesões que podem levar a IRA, mas as células do túbulo proximal parecem ser as mais atingidas (LA MANNA et al., 2011; ZHU et al., 2013). No que se refere à necrose e degeneração tubular nos animais envenenados, vários fatores causais podem estar associados.

O grau de severidade e mortalidade da IRA tem sido estimado com base no aumento da creatinemia, sendo que há relato mostrando que até mesmo um ligeiro aumento nos níveis de creatinina pode ser relacionado com o aumento do risco de morte (COCA et al., 2007). Por exemplo, quando comparado com uma situação controle (creatinemia entre 0,7 a 1,30 mg/dL), indivíduos com aumento entre 0,3 a 0,4 mg/dL sobre o limite superior da faixa de normalidade de creatinina sérica são considerados com uma IRA leve, enquanto aqueles com aumento entre 0,5 a 0,9 mg/dL são considerados com IRA moderada e aqueles com aumento a partir de 1mg/dL são considerados com uma IRA grave (COCA et al., 2007). No presente estudo, com base nessa relação supracitada, convencionou-se que o aumento de cada um dos parâmetros renais aqui avaliados teria o mesmo critério de classificação de gravidade, ou seja, entre 1,2 a 1,3 vezes do valor superior da faixa de normalidade seria considerado leve, enquanto entre 1,4 a 1,7 vezes seria considerado moderado e a partir de 1,8 vezes seria considerado grave. Sendo assim, relativamente a creatinemia dos animais controle ($0,27 \pm 0,05$ mg/dL), em 24

h o vCdt causa uma IRA moderada ($0,43 \pm 0,02$ mg/dL) e a isquemia bilateral ($1,73 \pm 0,22$ mg/dL) causa uma IRA grave. No entanto, o vCdt causa uma mortalidade maior e mais precoce, demonstrando que não é recomendável, nesse caso, tomar como base somente o aumento de creatinina circulante, mesmo sendo esta considerada um biomarcador "padrão ouro" para o diagnóstico de IRA. Quando a taxa de filtração glomerular é normal, a creatinina é filtrada através do glomérulo no interior dos túbulos e então excretada (NEEDHAM et al., 2005). Considerando que a creatinina também é secretada pelas células tubulares, quando há uma lesão ou falha na filtração renal ocorre uma inibição da secreção tubular (NEEDHAM et al., 2005). A hipercreatinemia presente em ambos os modelos de indução de IRA aqui estudados, em conjunto com o estresse oxidativo, especialmente na medula, e com a degeneração glomerular e tubular após 24 h e sua piora depois de 7 dias, evidenciam uma lesão renal e uma falha da filtração glomerular e reabsorção. Além da elevação dos níveis de creatinina circulante, a elevação da ureia também é considerada um parâmetro útil para diagnosticar a IRA. Porém, não se preconiza a utilização desse parâmetro de forma isolada (OKUSA et al., 2013). O aumento do ácido úrico no plasma em 24 h é o mais provável indutor do estresse oxidativo renal em animais envenenados com vCdt, pois quando esses animais são tratados com sinvastatina (YAMASAKI et al., 2008), ácido lipóico (ALEGRE et al., 2010) ou N-acetil-L-cisteína (FREZZATTI & SILVEIRA, 2011), conhecidos antioxidantes, há melhora na razão GSSG/GSH no tecido renal. Porém, esses agentes não são capazes de diminuir a letalidade causada pelo vCdt (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010; FREZZATTI & SILVEIRA, 2011). Por outro lado, quando o alopurinol (medicamento que diminui a produção de ácido úrico intracelular) é administrado, não só há o reestabelecimento dos valores normais da relação GSSG/GSH, como também diminuição drástica da letalidade causada pelo vCdt, mostrando que o estresse oxidativo e o ácido úrico são as mais importantes causas de morte nesses animais (FREZZATTI & SILVEIRA, 2011). Este efeito protetor causado pelo alopurinol ocorre pelo bloqueio da xantina oxidase, uma vez que a via dessa enzima leva à síntese de ácido úrico e a formação de EROS capazes de atacar componentes celulares e causar morte celular (BUTLER et al., 2000; GEORGE et al., 2006), constituindo-se assim num alvo para o tratamento da IRA causada pelo vCdt. Quanto a diminuição do MDA em 24 h constatada no presente

estudo no córtex e na medula renal dos animais envenenados, pode estar relacionada ao fato de que as lipoproteínas são muito suscetíveis à oxidação por EROS, mas em condições hiperuricêmicas diminuem os níveis dos produtos da peroxidação lipídica (KOCIC et al., 2014). O ácido úrico age como antioxidante no meio extracelular e pró-oxidante quando entra ou é produzido em grandes quantidades no meio intracelular (AMES et al., 1981; KANG et al., 2014). O aumento de ácido úrico sistêmico pode ter sido agravado pelo aumento de EROS e, se isso ocorre, há aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular e ativação de proteases dependentes que convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase, oxidando a xantina e a hipoxantina para ácido úrico, aumentando ainda mais as EROS. Além disso, o aumento de Ca^{2+} intracelular pode ativar a fosfolipase A2 dependente de cálcio, endonucleases e proteases que iniciam a apoptose celular e causam disfunção mitocondrial, diminuindo a produção de ATP no meio extracelular, podendo se dissipar na circulação ou no meio intracelular e reagir com componentes locais (DE FÁTIMA FERNANDES VATTIMO et al., 2011; MALEK & NEMATBAKHS, 2015). Há relatos de que a ativação do RAS local e de receptores de Ang pelo ácido úrico em células endoteliais humanas é dependente da indução de estresse oxidativo (YU et al., 2010). Assim, além de haver uma possível relação entre o aumento de ácido úrico, causado pelo envenenamento, e a Ang II na indução de danos vasculares e renais, estes agentes poderiam gerar hipertensão, arteriopatia aferente, hipertrofia glomerular e inflamação intersticial no rim (MAZZALI et al., 2001; MAZZALI et al., 2002; NAKAGAWA et al., 2003). Por outro lado, o estresse oxidativo no tecido adiposo foi recentemente reconhecido como uma das principais causas de resistência à insulina e, por conseguinte, as alterações induzidas pela hiperuricemia devido ao envenenamento crotálico sobre a homeostase oxidativa do rim pode também ter ocorrido no tecido adiposo, o que poderia implicar numa possível tendência de resistência à insulina (KANG et al., 2014). A ação diabetogênica do ácido úrico foi relatada em 1950, mas até o momento seu mecanismo não é inteiramente conhecido (KUSHIYAMA et al., 2014). Além de afetar a resistência à insulina, existe uma correlação significativa do ácido úrico circulante com fatores de risco para a síndrome metabólica (obesidade, diabetes melito e hipertensão), ocasionando elevação do índice de massa corporal, pressão arterial, glicemia e níveis de triglicérides, bem como diminuição dos valores

de colesterol HDL (ZAPOLSKI et al., 2011; KUSHIYAMA et al., 2014). Um estudo relativamente recente mostra que o aumento de 0,01 mg de ácido úrico / mL no plasma aumenta a incidência de hipertensão, além de mudar a taxa de filtração glomerular em indivíduos sadios (KANG et al., 2014). Além da IRA e da resistência à insulina, o aumento de ácido úrico circulante tem sido associado à doença renal intersticial, aterosclerose coronariana, aumento da expressão de renina (MAZZALI et al., 2002; KHOSLA et al., 2005), hipertrofia glomerular (NAKAGAWA et al., 2003), gota artrítica, nefropatias agudas e isquemia renal, a qual caracteriza uma série de eventos, incluindo alterações no tônus vascular, maior permeabilidade vascular às proteínas plasmáticas e alterações estruturais no túbulo renal, além de ser a principal causa de IRA em pacientes com rins transplantados (HADI et al., 2011; RIEGERSPERGER et al., 2011; LEE et al., 2012). Tendo em vista que em 24 h o *vCdt* causa hiperuricemia superior a 1 mg / mL, é possível hipotetizar que origine alguma propensão para desencadear as comorbidades supracitadas. Sabe-se que o aumento da uricemia em ratos pode promover disfunções renais e cardiovasculares por mecanismos independentes da deposição de cristais, tais como a estimulação do RAAS, resultando em excessiva vasoconstrição, hipertrofia do músculo liso vascular, retenção de sal e água (YU et al., 2010; ZIFF et al., 2016), inibição da NO sintase (MAZZALI et al., 2001), estimulação da arginase (ZHARIKOV et al., 2008) ou aumento de proteína C-reativa (KANG et al., 2005) e da reação direta do ácido úrico com NO para formar 6-aminouracil (GERSCH et al., 2008).

Considerando a importância e consequências da hiperuricemia, o aumento mais expressivo de creatinina e ureia nos animais isquêmicos e os níveis de ácido úrico circulante inalterados nesses animais isquêmicos, pode-se sugerir que, além da indução da IRA hiperuricêmica por *vCdt* ser um modelo novo e específico, não basta levar em consideração apenas as alterações de creatinina e ureia séricas como marcadoras de IRA, o que é preconizado pela AKIN (PINHO et al., 2005; CERDÁ et al., 2008; DAVENPORT, 2008; MEHTA et al., 2007). Como já mencionado, se somente forem consideradas as alterações na creatinina e ureia plasmáticas, o modelo de IRA induzido por *vCdt* deveria ser classificado como indutor de IRA moderada e o modelo de IRA induzida por isquemia como indutor de IRA grave. Porém, além da IRA induzida por *vCdt* ser mais letal, a hiperuricemia é fator preponderante para a letalidade (FREZZATTI & SILVEIRA, 2011).

5.2. Validação dos efeitos na função renal e no estresse oxidativo do tratamento com CTMs no modelo de indução de IRA por isquemia bilateral

Os valores médios considerados normais para os parâmetros renais avaliados no presente estudo em camundongos saudáveis são 0,6 mg/dL para creatinina plasmática (KEPPLER et al., 2007), 7,8 mg/dL para creatinina urinária (DUNN et al., 2004), 0,9 mg/dL para ácido úrico plasmático (YAMAZAKI et al., 2008), 15,4 mg/dL para ácido úrico urinário (YAMAZAKI et al., 2008), 40 mg/dL para ureia plasmática (NAGAO et al., 2006) e 6000 mg/dL para ureia urinária (FREZZATTI & SILVEIRA 2011). Porém, no presente estudo os valores médios dos animais controles saudáveis são 0,4 mg/dL para creatinina plasmática, 13,3 mg/dL para creatinina urinária, 1,5 mg/dL para ácido úrico plasmático, 10,1 mg/dL para ácido úrico urinário, 51,5 mg/dL para ureia plasmática e 1979 mg/dL para ureia urinária. Essas aparentes e eventuais discrepâncias possivelmente devem-se ao kit utilizado, o que de qualquer forma evidentemente não invalida as comparações aqui realizadas entre os diferentes grupos, pois foram utilizados os mesmos kits em todos os grupos.

As sequelas na função renal decorrentes da indução de IRA isquêmica bilateral nos animais sobreviventes, após 48 h da indução, são graves hipercreatinemia, hiperuremia e hipercreatinúria, além de estresse oxidativo. Após 96 h de indução da IRA, o tratamento com CTMs restaura a uremia e o estresse oxidativo nesses animais isquêmicos. As sequelas da indução de IRA isquêmica bilateral nos animais sobreviventes após 7 dias da indução são hipercreatinemia grave, leve degeneração e proliferação celular no glomérulo, presença de infiltrado celular e severas degeneração e necrose tubulares. Durante a isquemia há liberação dos chamados padrões moleculares associados ao perigo, que são moléculas endógenas liberadas durante o estresse e lesão celular. Essas moléculas se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões presentes nas células tubulares renais, células dendríticas intersticiais e células endoteliais, resultando na morte das células tubulares, ativação das células dendríticas intersticiais e lesão de células endoteliais, aumentando a permeabilidade endotelial, expressão de moléculas de

adesão em células endoteliais (KASIMSETTY & MCKAY, 2016). O rim possui receptores do tipo Toll e receptores proteicos com domínio de oligomerização de nucleotídeos (NOD) que são ativados pela elevação de ácido úrico, EROS, além de outros fatores (KASIMSETTY & MCKAY, 2016). Depois de ativados, esses receptores aumentam a produção das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , proteína inflamatória de macrófago 2-alfa (MIP2) e ciclooxigenase 2, que estão envolvidos na inflamação renal e devem contribuir para a lesão por isquemia e reperfusão por intermédio da ativação de NF- κ B e MAPK que, por sua vez, ativam a via das caspases, levando à apoptose celular (KASIMSETTY & MCKAY, 2016). Outros tipos celulares importantes durante a fase de reperfusão são as NK e as células T reguladoras (Tregs) que, após a ativação, produzem IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-1 β . Após a reperfusão renal, o número de células NK aumenta e sua inativação evita o recrutamento de neutrófilos e a lesão renal. As Tregs desempenham um papel vital na supressão da inflamação mediada por células efetoras inatas, após a lesão, quando o tráfego de Tregs para o rim diminui, assim aumentando o número de leucócitos inflamatórios e piorando os danos renais (KASIMSETTY & MCKAY, 2016). Os linfócitos B também participam nas fases iniciais da lesão renal, aumentando a produção de anticorpos nocivos, e quando há uma diminuição de linfócitos B aumenta a regeneração dos túbulos renais, melhorando a lesão renal (KASIMSETTY & MCKAY, 2016). Preconiza-se que a reparação renal induzida pelas CTMs depende primordialmente da proliferação de células epiteliais tubulares e da diferenciação em células renais (ZUBKO & FRISHMAN, 2009; ZHU et al., 2013). A melhora da creatinemia e no grau do infiltrado inflamatório em 7 dias, e a restauração da uremia e estresse oxidativo em 96 h após a indução, causada pelas CTMs nos animais isquêmicos, pode ter sido resultado de uma recuperação funcional do rim por meio de efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos, levando a redução de infiltração de células inflamatórias e a apoptose de células renais (ZUBKO & FRISHMAN, 2009; ZHU et al., 2013; ROSSELLI et al., 2016). Tais efeitos podem ter sido ocasionados não somente pela proliferação de células epiteliais tubulares e diferenciação em células renais, mas também ou tão somente pela liberação de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento pelas CTMs que promoveram a reparação renal, por meio da sua internalização em células tubulares, melhorando o fluxo sanguíneo renal, diminuindo o estresse oxidativo, atenuando a

inflamação renal e a apoptose e permitindo a regeneração vascular, além de proteger contra possíveis glomeruloesclerose, vasculopatia e fibrose por meio de efeitos tróficos (ZUBKO & FRISHMAN, 2009; FRANQUESA et al., 2012; ZHU et al., 2013; MOLINA et al., 2015). Sabe-se que as CTMs endógenas promovem a reparação do tecido renal por mecanismos parácrinos que estimulam a diferenciação e proliferação, sendo que a interação da célula tubular epitelial e da matriz extracelular é crucial para determinar a função renal (LA MANNA et al., 2011; DONIZETTI-OLIVEIRA et al., 2012). Entre esses mecanismos está a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , além do aumento de fatores que tendem a diminuir a resposta inflamatória, como MCP-1 e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Por sua vez, esse efeito anti-inflamatório é bem conhecido pela sua capacidade de reduzir a resposta imune celular e humoral (LA MANNA et al., 2011). O tratamento com as CTMs também pode ter influenciado a imunomodulação dos linfócitos T e de seus subtipos, por sua vez modulando a resposta das citocinas pró-inflamatórias e da via das caspases, deixando os linfócitos T quiescentes por meio de fatores solúveis e mediadores de contato (MOLINA et al., 2015; NAJAR et al., 2016). Dentre as hipóteses dessa supressão estão a depleção de triptofano porIDO induzido pelo IFN- γ , e a supressão da fosforilação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 (STAT5) pelo NO produzido pelas CTMs (MEISEL et al., 2004; SATO et al., 2007; MOLINA et al., 2015; GAO et al., 2016). O IFN- γ coordena as propriedades anti e pró-inflamatórias das CTMs por meio de um ciclo, onde, em sua presença, as CTMs expressam MHC II, o que lhes permite apresentar antígenos, levando a ativação das células Tregs (COULSON-THOMAS et al. 2016). As células Tregs ativadas expressam IFN- γ , que suprime a expressão de MHC II pelas CTMs dificultando o processo inflamatório, diminuindo o infiltrado inflamatório e a proliferação celular, como evidenciado aqui na análise histológica, concluindo o ciclo (COULSON-THOMAS et al. 2016; ZUK & BONVENTRE, 2016). Por outro lado, apesar da via de administração i.v ser a mais adequada para uma estratégia terapêutica com CTMs, não se pode descartar a hipótese de que uma administração local pudesse até produzir melhores resultados que aqueles observados no presente estudo.

5.3. As CTMs melhoram a função renal e o estresse oxidativo na IRA hiperuricêmica: possíveis implicações nas doenças relacionadas com a hiperuricemia e no tratamento do envenenamento crotálico

As sequelas da indução de IRA pelo *vCdt* nos animais sobreviventes, após 48h da indução, são hipercreatinemia grave e leves hiperuricosúria e hipercreatinúria, além de estresse oxidativo. Após 96 h de indução da IRA, o tratamento com CTMs restaura o estresse oxidativo, a creatinemia e a creatinúria nos animais envenenados. As sequelas da indução de IRA pelo *vCdt* que permanecem nos animais sobreviventes após 7 dias da indução são leves degeneração e proliferação glomerulares e moderada degeneração tubular. O presente estudo corrobora a constatação de que o principal indutor de mortalidade pelo *vCdt* é o elevado grau de hiperuricemia aguda (FREZZATTI & SILVEIRA, 2011), uma vez que a uricemia acaba por ser remitida nos animais sobreviventes ao *vCdt*. É importante a procura de tratamentos para situações clínicas onde há hiperuricemia aguda, como a do envenenamento crotálico, já que o ácido úrico pode induzir inflamação por ativação de células apresentadoras de antígenos, por síntese de proteínas C reativa, MCP-1 ou IL-1 β e por aumentar a atividade de células T (KOCIC et al., 2014), além de causar danos no miocárdio, com subsequente aumento de marcadores miocárdicos séricos, como os produtos da oxidação proteica e lipídica, aumento da ativação das enzimas atuantes no sistema cardiovascular (TAMARIZ & HARE, 2015) e diminuição do potencial das células tronco mesenquimais de medula. Em conjunto, estes efeitos podem potencializar o dano no miocárdio ao diminuir o recrutamento de células estaminais hematopoiéticas da medula óssea, células que são necessárias para a regeneração dos cardiomiócitos (KOCIC et al., 2014). A patogênese da hipertensão e danos renais pode envolver um mecanismo independente da deposição de cristais, pela ativação de Ang II e supressão de óxido nítrico sintase (KOCIC et al., 2014). O ácido úrico também é capaz de induzir a mobilização de células endoteliais progenitoras nas primeiras horas de hiperuricemia aguda e essas células permanecem detectáveis no sangue em até 1 semana com uma hiperuricemia persistente (KOCIC

et al., 2014). Quando a hiperuricemia é grave, permanecendo por períodos longos, a mobilização das células endoteliais progenitora é suprimida (KOCIC et al., 2014). Outra doença que parece ter relação com hiperuricemia é a aterosclerose. A dislipidemia é uma base para o início de aterosclerose, enquanto a acumulação de lipídios dentro e fora das células, bem como a proliferação excessiva de células musculares lisas vasculares (VSMCs) são importantes características patológicas dessa doença (LIU et al., 2016). O ácido úrico pode interferir com o metabolismo lipídico, estimulando a adipogênese e aumentando os níveis de lipídios, o que pode favorecer o desenvolvimento da aterosclerose (LIU et al., 2016). A hiperuricemia danifica as VSMCs, além de contribuir para o depósito de sais de cálcio na camada mediana da vasculatura, fibrose das células do músculo liso, degeneração hialina e aparecimento de células de espuma (LIU et al., 2016). Foi demonstrado que o ácido úrico solúvel provoca a proliferação de VSMCs durante o estágio inicial da aterosclerose, enquanto as células do músculo liso mediano sofrem proliferação excessiva e migram para a íntima, resultando em espessamento da íntima e estreitamento do lúmen. As VSMCs também são fonte importante de citocinas e desempenham um papel importante na manutenção e amplificação da proliferação inflamatória (LIU et al., 2016). De qualquer forma, mesmo com a remissão da hiperuricemia, o tratamento com CTMs dos animais sobreviventes ao envenenamento crotálico tem um potencial relevante, ao melhorar sequelas histopatológicas após 7 dias da indução, além de normalizar o estresse oxidativo, a creatinemia e a creatinúria em 96 h. Por outro lado, a hiperuricemia no grupo controle tratado com CTMs pode ter ocorrido pela influência dessas células sobre a migração de células T e células B, causando alterações no metabolismo de purinas (KATO et al., 2000), além da imunomodulação envolvendo ativação de receptores Toll-like (TLRs) e de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), principalmente a p38, que é preponderante para a ativação de xantina oxidase, conversora de xantina em ácido úrico, e é ativada em resposta à estimulação pró-inflamatória com ligantes de membrana associados com TLRs 2 e 4, TLRs endossomais 7 e 8 e de fatores de crescimento de células-tronco (ABOOALI et al., 2014). O ácido úrico tem sido associado como um dos mobilizadores no recrutamento de células estaminais e células endoteliais progenitoras circulantes que possuem o potencial de alterar o fenótipo para promover o reparo vascular e,

também, podem estimular a neovascularização e a substituição endotelial, contribuindo para a cicatrização dos tecidos lesados por meio de uma série de fatores, tais como trombina, histamina, leucotrienos, angiopoietina-2, IL-8, ânion superóxido, VEGF, esfingosina-1-fosfato, ceramida, purinas, serotonina, vasopressina e epinefrina, além de produzir o recrutamento por meio da ação no receptor TLR-4 (KUO et al., 2008; CHADE et al., 2010). As CTMs também podem ter migrado até o rim, já que essas células migram preferencialmente para áreas lesadas com focos de hipóxia, apoptose ou inflamação (STRIOGA et al., 2012), assim melhorando os processos de filtração glomerular e reabsorção tubular e reequilibrando os parâmetros alterados, visto que todos os processos citados podem estar envolvidos na recuperação das alterações de creatinina e ureia no plasma e urina de animais induzidos nos modelos de IRA aqui estudados, além da melhora do estresse oxidativo e do grau de degeneração tubular causado pelo envenenamento. Essa migração também pode ter corrido pelo aumento dos níveis circulantes de angiopoietina-2, que induz a mobilização de células-tronco hematopoiéticas e células endoteliais progenitoras, ação esta que tem sido associada à indução do pré-condicionamento farmacológico em doenças cardiovasculares e renais (KUO et al., 2008). As células endoteliais progenitoras aumentam a proliferação celular no córtex renal (CHADE et al., 2010), o que pode explicar o aumento da proliferação celular no glomérulo observado na análise histopatológica em ambas as induções aqui estudadas. A migração das CTMs é definida como “leucócitos-símile”, pois usa o mesmo mecanismo de passagem entre as células do tecido para atingirem o alvo. Isso pode acontecer de dois modos: ativamente, quando as CTMs se achatariam rapidamente e rolariam pelo endotélio, e passivamente, com os capilares se estreitando, fazendo com que as CTMs fiquem presas por interações físicas e por terem um tamanho celular grande (ZHAO & ZHANG 2016). Recentemente, foi observado que nessa migração há o envolvimento do ácido lisofosfórico (LPA), um fosfolípido bioativo produzido pela ativação de plaquetas, células mesoteliais, fibroblastos e adipócitos, que se liga no receptor LPA-1, via proteína G, aumentando a migração das CTMs (ZHAO & ZHANG 2016). As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), c-Jun N-terminal quinase (JNK), MAPK p38 e as quinases reguladas por sinal extracelular $\frac{1}{2}$ (Erk1/2) possuem um importante papel na migração de células-tronco (ZHAO & ZHANG 2016). A Erk1/2 pode regular a

mobilização das CTMs pela mediação do eixo SDF-1/CXCR4 (fator 1 derivado da célula estromal / receptor de quimiocina CXC tipo 4) e eixo CXCL11/CXCR3 (quimiocina CXC induzida por interferon gama / receptor de quimiocina CXC tipo 3), podendo ser anulada pela MAPK (ZHAO & ZHANG 2016). A fosfatidilinositol - 3 - quinase (PI3K) / Akt está envolvida na migração das CTMs de medula óssea. Apesar de não existirem evidências de sua influência na migração das CTMs de tecido adiposo, sabe-se que a PI3K / Akt possui bastante influencia na proliferação celular e supressão da apoptose (ZHAO & ZHANG 2016). A família de genes homólogos a Ras, membro A (RohA) é um regulador da migração de vários tipos celulares. A LPA induz a ativação de RohA e o tratamento das CTMs com o inibidor de RohA quinase diminui sua migração (ZHAO & ZHANG 2016). O fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) aumenta a migração de CTMs, sendo suprimido pelos anticorpos neutralizantes do receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR- β) (ZHAO & ZHANG 2016).

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostram o sucesso na indução de IRA pelos métodos utilizados, quais sejam isquemia bilateral e *vCdt*. Apesar da hipercreatinemia e da hiperuremia aguda do grupo isquêmico bilateral serem maiores que as do *vCdt*, aparentemente sugerindo uma IRA mais grave, a mortalidade é maior e mais precoce no grupo *vCdt*. Esses dados esclarecem que a creatinina e ureia no plasma não são os únicos parâmetros que devem ser analisados no caso da IRA causada pelo *vCdt*, mostrando que além do *vCdt* propiciar um novo modelo de indução de IRA hiperuricêmica, essa hiperuricemia é fator crucial e de maior severidade no caso desse envenenamento. Sobretudo, conclui-se que as CTMs, por meio de fatores indiretos, ou em decorrência de sua migração para os locais de lesão renal, são capazes de restaurar a creatinemia, a creatinúria, o estresse oxidativo no córtex e medula renal e melhorar o grau de degeneração e necrose glomerular e tubular nos animais envenenados, assim como melhorar a creatinemia, restaurar a uremia e o estresse oxidativo no córtex e medula renal, além de melhorar o grau de infiltração inflamatória nos animais isquêmicos. Essa eficiência terapêutica potencial das CTMs em importantes sequelas da IRA nos sobreviventes dos efeitos agudos do envenenamento crotálico oferece nova perspectiva para a abordagem clínica das IRAs hiperuricêmicas. A caracterização dos mecanismos de ação indireta e direta das CTMs sobre a IRA hiperuricêmica e o efeito da administração precoce das CTMs sobre a letalidade das IRAs em geral merecem ser abordados em futuros estudos.

7. BIBLIOGRAFIA

ABOOALI, M.; LALL, G. S.; COUGHLAN, K.; LALL, H. S.; GIBBS, B. F.; SUMBAYEV, V. V. Crucial involvement of xanthine oxidase in the intracellular signalling networks associated with human myeloid cell function. **Sci. Rep.** v. 9, n. 4, p. 6307, 2014.

AGGARWAL, S.; MOGGIO, A.; BUSSOLATI, B. Concise review: stem/progenitor cells for renal tissue repair: current knowledge and perspectives. **Stem. Cells. Transl. Med.** v. 2, n. 12, p. 1011-1019, 2013.

AKCAY, A.; NGUYEN, Q.; EDELSTEIN, C. L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. **Mediators. Inflamm.** v. 2009:137072, 2009.

ALDERMAN, M.H.; COHEN, H.; MADHAVAN, S.; KIVLIGHN, S. Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients. **Hypertension.** v. 34, n. 1, p. 144-150, 1999.

ALEGRE, V. S.; BARONE, J. M.; YAMASAKI S. C.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon**, v. 56, p. 402-410, 2010.

AMARAL, C.F.; REZENDE, N.A.; DA SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.; MAGALHÃES, R.A.; DOS REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 28, n. 4, p. 220-227, 1986.

AMARAL, C.F.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B.; BUENO, C.M.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; PENAFORTE, C.L.; DINIZ, C.R.; REZENDE, N.A. Time factor in the detection of circulating whole venom and crotoxin and efficacy of antivenom therapy in patients envenomed by *Crotalus durissus*. **Toxicon.** v. 35, n. 5, p. 699-704, 1997.

AMES, B. N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, R. Uric acid provides an antioxidant defebse in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, n. 11, p. 6858-6862, 1981.

AUGELLO, A.; KURTH, T. B.; DE BARI, C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. **Eur. Cell. Mater.** n. 20, p. 121-133, 2010.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In CARDOSO, J.L.C.; FRANCA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr. Animais peçonhentos no Brasil – Clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Ed. Savier.** 2003.

BADYAL, D.K.; DADHICH, A.P.; LATA, H. Animal models of hypertension and effect of drugs. **Indian Journ. Pharmacol.** v. 35, n. 6, p. 349-362, 2003.

BANAS, A.; TERATANI, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUHARA, M.; TAKESHITA, F.; QUINN, G.; OKOCHI, H.; OCHIYA, T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. **Hepatology.** v.46, n. 1, p. 219-228, 2007.

BASILE, D.P.; DONOHOE, D.L.; ROETHE, K.; MATTSON, D.L. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 284, n. 2, p. F338-F348, 2003.

BOLIGNANO, D.; MATTACE-RASO, F.; SIJBRANDS, E. J.; ZOCCALI, C. The aging kidney revisited: a systematic review. **Ageing. Res. Rev.** v. 14, p. 65-80, 2014.

BORGES, R.L.; HIROTA, A.H.; QUINTO, B.M.; RIBEIRO, A.B.; ZANELLA, M.T.; BATISTA, M.C. Uric acid as a marker for renal dysfunction in hypertensive women on diuretic and nondiuretic therapy. **J. Clin. Hypertens. (Greenwich).** v. 11, n. 5, p. 253-259, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemist,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, A.; CASKEY, C. T. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,** v. 91, n. 2, p. 742–746, 1994.

BUCARETCHI, F.; DE CAPITANI, E.M.; BRANCO, M.M.; FERNANDES, L.C.; HYSLOP, S. Coagulopathy as the main systemic manifestation after envenoming by a juvenile South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*): case report. **Clin. Toxicol. (Phila).** v. 51, n. 6, p. 505-508, 2013.

BUTLER, R.; MORRIS, A.D.; BRLCH. J.J.F.; HILL, A.; STRUTHERS, A.D. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. **Hypertension**, v. 35, n. 3, p 746-751, 2000.

CAETANO, E.R.; ZATZ, R.; SALDANHA, L.B.; PRAXEDES, J.N. Hypertensive nephrosclerosis as a relevant cause of chronic renal failure. **Hypertension**. v. 38, n. 2, p. 171-176, 2001.

CARNEVALE, F.C.; MOREIRA, A.M.; PINTO, R.A.P.; BORGES, M.V.; ELKIS, H. Indicações do Tratamento Endovascular nas Estenoses da Artéria Renal. **Rev. Bras. Cardiol. Invas.** v. 14, n. 1, p. 76-81, 2006.

CERDÁ, J.; LAMEIRE, N.; EGGERS, P.; PANNU, N.; UCHINO, S.; WANG, H.; BAGGA, A.; LEVIN, A. Epidemiology of acute kidney injury. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, n. 3, p. 881-886, 2008.

CHADE, A. R.; ZHU, X. Y.; KRIER, J. D.; JORDAN, K. L.; TEXTOR, S. C.; GRANDE, J. P.; LERMAN, A.; LERMAN, L. O. Endothelial progenitor cells homing and renal repair in experimental renovascular disease. **Stem. Cells**. v. 28, n. 6, p. 1039-1047, 2010.

CHOUDHURY, D. Acute kidney injury: current perspectives. **Postgrad. Med.**, v. 122, n. 6, p. 29-40, 2010.

COCA, S.G.; PEIXOTO, A.J.; GARG, A.X.; KRUMHOLZ, H.M.; PARIKH, C.R. The prognostic importance of a small acute decrement in kidney function in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. **Am. J. Kidney Dis.** v. 50, n. 5, p. 712-720, 2007.

COCA, S.G.; YUSUF, B.; SHLIPAK, M.G.; GARG, A.X.; PARIKH, C.R. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Am. J. Kidney Dis.** v. 53, n. 6, p. 961-973, 2009.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; GIUNTI, D.; CAPPIELLO, V.; CAZZANTI, F.; RISSO, M.; GUALANDI, F.; MANCARDI, G. L.; PISTOIA, V.; UCCELLI, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**. v. 107, n. 1, p. 367-372, 2006.

COULSON-THOMAS, V. J.; COULSON-THOMAS, Y. M.; GESTEIRA, T. F.; KAO, W. W. Extrinsic and Intrinsic Mechanisms by Which Mesenchymal Stem Cells Suppress the Immune System. **Ocul. Surf.** v. 14, n. 2, p. 121-134, 2016.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & Disease**, v. 19, n. 1, p. 42–46, 2009.

DANOVIZ M.E.; BASSANEZE V.; NAKAMUTA J.S.; DOS SANTOS-JUNIOR G.R.; SAINT-CLAIR D.; BAJGELMAN M.C; FAÉ K.C.; KALIL J.; MIYAKAWA A.A.; KRIEGER J.E. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. **Stem Cells Dev.** v. 20, n. 4, p. 661-670, 2011.

DAVENPORT A. Renal replacement therapy in acute kidney injury: which method to use in the intensive care unit?. **Saudi. J. Kidney. Dis. Transpl.** v.19, n. 4, p. 529-536, 2008.

DE FÁTIMA FERNANDES VATTIMO, M.; DA SILVA, N.O. *Uncaria tomentosa* and acute ischemic kidney injury in rats. **Rev. Esc. Enferm. USP.** v. 45, n. 1, p. 194-198, 2011.

DE MELLO, W. C. Local Renin Angiotensin Aldosterone Systems and Cardiovascular Diseases. **Med. Clin. North Am.** v. 101, n. 1, p. 117-127, 2017.

DONIZETTI-OLIVEIRA, C.; SEMEDO, P.; BURGOS-SILVA, M.; CENEDEZE, M. A.; MALHEIROS, D. M.; REIS, M. A.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. Adipose tissue-derived stem cell treatment prevents renal disease progression. **Cell Transplant.** v. 21, n. 8, p. 1727-1741, 2012.

DUANN, P.; LIANOS, E. A.; MA, J.; LIN, P. H. Autophagy, Innate Immunity and Tissue Repair in Acute Kidney Injury. **Int. J. Mol. Sci.** v. 17, n. 5, p. 662, 2016.

DUNN, S. R, QI, Z.; BOTTINGER, E. P.; BREYER, M. D., SHARMA, K. Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. **Kidney Int.** v. 65, n. 5, p. 1959-1967, 2004.

ECONOMOPOULOU, M.; BDEIR, K.; CINES, D.B.; FOGT, F.; BDEIR, Y.; LUBKOWSKI, J.; LU, W.; PREISSNER, K.T.; HAMMES, H.P.; CHAVAKIS, T. Inhibition of pathologic retinal neovascularization by alpha-defensins. **Blood.** v. 106, n. 12, p. 3831-3838, 2005.

EJAZ, A. A.; MU, W.; KANG, D. H.; RONCAL, C.; SAUTIN, Y. Y.; HENDERSON, G.; TABAH-FISCH, I.; KELLER, B.; BEAVER, T. M.; NAKAGAWA, T.; JOHNSON, R. J. Could uric acid have a role in acute renal failure? **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** v. 2, n. 1, p. 16-21, 2007.

ESTRADA, E. J.; VALACCHI, F.; NICORA, E.; BRIEVA, S.; ESTEVE, C.; ECHEVARRIA, L.; FROUD, T.; BERNETTI, K.; CAYETANO, S. M.; VELAZQUEZ, O.; ALEJANDRO, R.; RICORDI, C. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. **Cell Transplant.** v. 17, n. 12, p. 1295-1304, 2008.

FEIG, D. I.; KANG, D-H.; JOHNSON, R. J. Uric Acid and Cardiovascular Risk. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 17, p. 1811–1821, 2008.

FRANK, N.Y.; MARGARYAN, A.; HUANG, Y.; SCHATTON, T.; WAAGA-GASSER, A.M.; GASSER, M.; SAYEGH, M.H.; SADEE, W.; FRANK, M.H. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. **Cancer Res.** v. 65, n. 10, p. 4320-4333, 2005.

FRANQUESA, M.; HERRERO, E.; TORRAS, J.; RIPOLL, E.; FLAQUER, M.; GOMÀ, M.; LLOBERAS, N.; ANEGON, I.; CRUZADO, J.M.; GRINYÓ, J.M.; HERRERO-FRESNEDA, I. Mesenchymal Stem Cell Therapy Prevents Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in a Rat Kidney Allograft Model. **Stem Cells Dev.** v. 21, n. 17, p. 3125-3135, 2012.

FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P.F. Allopurinol reduces the lethality associated with acute renal failure induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom: comparison with probenecid. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 5, n. 9, p. e1312, 2011.

FURUICHI, K.; SHINTANI, H.; SAKAI, Y.; OCHIYA, T.; MATSUSHIMA, K.; KANEKO, S.; WADA, T. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. **Clin. Exp. Nephrol.** v. 16, n. 5, p. 679-689, 2012.

GAO, F.; CHIU, S. M.; MOTAN, D. A.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H. L.; TSE, H. F.; FU, Q. L.; LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell. Death Dis.** v. 7, p. e2062, 2016.

GERSCH, C.; PALII, S. P.; KIM, K. M.; ANGERHOFER, A.; JOHNSON, R. J.; HENDERSON, G. N. Inactivation of nitric oxide by uric acid. **Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids**, v. 27, n. 8, p. 967–978, 2008.

GEORGE, J.; CARR, E.; DAVIES, J.; BELCH, J.J.F.; STRUTHERS, A. High-dose allopurinol improves endothelial function by profoundly reducing vascular oxidative stress and not by lowering uric acid. **Circulation**, v. 114, n. 23, p. 2508-2516, 2006.

GNECCHI, M.; HE, H.; MELO, L. G.; NOISEAUX, N.; MORELLO, F.; DE BOER, R. A.; ZHANG, L.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J.; INGWALL, J. S. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. **Stem Cells**. v. 27, n. 4, p. 971-979, 2009.

GONZALEZ-REY, E.; ANDERSON, P.; GONZÁLEZ, M. A.; RICO, L.; BÜSCHER, D.; DELGADO, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. **Gut**. v. 58, n. 7, p. 929-939, 2009.

HADI, N.R.; AL-AMRAN, F.G.; HUSSEIN, A.A. Effects of thyroid hormone analogue and a leukotrienes pathway-blocker on renal ischemia/reperfusion injury in mice. **BMC Nephrol**. v. 12, p. 70, 2011.

HOSTE, E.A.; KELLUM, J.A. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. **Curr. Opin. Crit. Care**. v. 12, n. 6, p. 531-537, 2006.

HUSI, H.; HUMAN, C. Molecular determinants of acute kidney injury. **J. Inj. Violence Res**. v. 7, n. 2, p. 75-78, 2015.

JANG, H.R.; RABB, H. Immune cells in experimental acute kidney injury. **Nat. Rev. Nephrol**. v. 11, n. 2, p. 88-101, 2015.

KANG, D. H.; PARK, S. K.; LEE, I. K.; JOHNSON, R. J. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. **J. Am. Soc. Nephrol**. v. 16, n. 12, p. 3553–3562, 2005.

KANG, D.H.; HA, S.K. Uric Acid Puzzle: Dual Role as Anti-oxidant and Pro-oxidant. **Electrolyte Blood Press**. v. 12, n. 1, p. 1-6, 2014.

KANJANABUCH, T.; SITPRIJA, V. Snakebite nephrotoxicity in Asia. **Semin. Nephrol**. v. 28, n. 4, p. 363-372, 2008.

KASIMSETTY, S. G.; MCKAY, D. B. Ischemia as a factor affecting innate immune responses in kidney transplantation. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** v. 25, n. 1, p. 3-11, 2016.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PloS. Med.**, v. 5, n. 11, p. 218, 2008.

KATO, C.; SATO, K.; WAKABAYASHI, A.; EISHI, Y. The effects of allopurinol on immune function in normal BALB/c and SCID mice. **Int. J. Immunopharmacol.** v. 22, n. 7, p. 547-556, 2000.

KEPPLER, A.; GRETZ, N.; SCHMIDT, R.; KLOETZER, H. M.; GROENE, H. J.; LELONGT, B.; MEYER, M.; SADICK, M.; PILL, J. Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. **Kidney Int.** v. 71, n. 1, p. 74-78, 2007.

KHAN, A.; KHAN, A. H.; ADNAN, A. S.; SYED SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H.; KHAN, I. Management of Patient Care in Hemodialysis While Focusing on Cardiovascular Disease Events and the Atypical Role of Hyper- and/or Hypotension: A Systematic Review. **Biomed. Res. Int.** v. 2016, p. 9710965, 2016.

KHOSLA, U. M.; ZHARIKOV, S.; FINCH, J. L.; NAKAGAWA, T.; RONCAL, C.; MU, W.; KROTOVA, K.; BLOCK, E. R.; PRABHAKAR, S.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. **Kidney Int.**, v. 67, n. 5, p. 1739-1742, 2005.

KOCIC, G.; SOKOLOVIC, D.; JEVTOVIC, T.; CVETKOVIC, T.; VELJKOVIC, A.; KOCIC, H.; STOJANOVIC, S.; JOVANOVIC, A.; JOVANOVIC, J.; ZIVKOVIC, P. Short communication: Effect of commercial or depurinated milk diet on plasma advanced oxidation protein products, cardiovascular markers, and bone marrow CD34+ stem cell potential in rat experimental hyperuricemia. **J. Dairy Sci.** v. 97, n. 11, p. 6823-6827, 2014.

KOMERS, R.; PLOTKIN, H. Dual inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system and endothelin-1 in treatment of chronic kidney disease. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 310, n. 10, p. 877-884, 2016.

KRAMPERA, M.; COSMI, L.; ANGELI, R.; PASINI, A.; LIOTTA, F.; ANDREINI, A.; SANTARLASCI, V.; MAZZINGHI, B.; PIZZOLO, G.; VINANTE, F.; ROMAGNANI, P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem. Cells.** v. 24, n. 2, p. 386-398, 2006.

KRIEGER, E.M.; FRANCHINI, K.G.; KRIEGER, J.E. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. **Medicina Ribeirão Preto.** n. 29 p. 181-192, 1996.

KUO, M. C.; PATSCHAN, D.; PATSCHAN, S.; COHEN-GOULD, L.; PARK, H. C.; NI, J.; ADDABBO, F.; GOLIGORSKY, M. S. Ischemia-induced exocytosis of Weibel-Palade bodies mobilizes stem cells. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 19, n. 12, p. 2321-2330, 2008.

KUSHIYAMA, A.; TANAKA, K.; HARA, S.; KAWAZU, S. Linking uric acid metabolism to diabetic complications. **World J. Diabetes.** v. 5, n. 6, p. 787-795, 2014.

LA MANNA, G.; BIANCHI, F.; CAPPUCCELLI, M, CENACCHI G, TARANTINO L, PASQUINELLI G, VALENTE S, DELLA BELLA E, CANTONI S.; LAUDIA, C.; NERI, F.; TSIVIAN, M.; NARDO, B.; VENTURA, C.; STEFONI, S. Mesenchymal stem cells in renal function recovery after acute kidney injury: use of a differentiating agent in a rat model. **Cell. Transplant.** v. 20, n. 8, p.1193-1208, 2011.

LEE, J.A.; CHOI, J.W.; IN, J.H.; JUNG, H.S.; KIM, Y.S.; JEON, Y.S.; KANG, Y.J.; KIM, D.W.; LIM, Y.G.; PARK, J.H.; JOO, J.D. Hepatic ischemic preconditioning provides protection against distant renal ischemia and reperfusion injury in mice. **J. Korean Med. Sci.** v. 27, n. 5, p. 547-552, 2012.

LERMAN, L.O.; CHADE, A.R.; SICA, V.; NAPOLI, C. Animal models of hypertension: an overview. **J. Lab. Clin. Med.** v. 146, n. 3, p. 160-173, 2005.

LI, X.; LIU, M.; BEDJA, D.; THOBURN, C.; GABRIELSON, K.; RACUSEN, L.; RABB, H. Acute renal venous obstruction is more detrimental to the kidney than arterial occlusion: implication for murine models of acute kidney injury. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 302, n. 5, p. 519-525, 2011.

LIU, Z.; CHEN, T.; NIU, H.; REN, W.; LI, X.; CUI, L.; LI, C. The Establishment and Characteristics of Rat Model of Atherosclerosis Induced by Hyperuricemia. **Stem Cells Int.** 2016. doi: 10.1155/2016/1365257.

MAGALHÃES, R. A.; RIBEIRO, M. M.; DE REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. Rhabdomyolysis secondary to a crotalid bite (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop**, Sao Paulo, v. 28, n. 4, p. 228-233, 1986.

MALEK, M.; NEMATBAKHS, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **J. Renal. Inj. Prev.** v. 4, n. 2, p. 20-27, 2015.

MAZZALI, M.; HUGHES, J.; KIM, Y. G.; JEFFERSON, J. A.; KANG, D. H.; GORDON, K. L.; LAN, H. Y.; KIVLIGHN, S.; JOHNSON, R. J. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1101–1106, 2001.

MAZZALI, M.; KANELIS, J.; HAN, L.; FENG, L.; CHEN, Q.; KANG, D. H.; WATANABE, S.; NAKAGAWA, T.; LAN, H. Y.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia induces a primary renal arteriopathy in rats by a blood pressure independent mechanism. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 282, n. 6, p. 991–997, 2002.

MEHTA, R. L.; KELLUM, J. A.; SHAH, S. V.; MOLITORIS, B. A.; RONCO, C.; WARNOCK, D. G.; LEVIN, A.; Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Crit. Care.**, v. 11, n. 2, p. 31, 2007.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; GÖBEL, U.; DÄUBENER, W.; DILLOO, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**. v. 103, n. 12, p. 4619-4621, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-06---CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>. Acesso em: 08/02/2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento dos Acidentes por Animais Peçonhentos. São Paulo: **Fundação Nacional da Saúde**. 2001.

MOLINA, E. R.; SMITH, B. T.; SHAH, S. R.; SHIN, H.; MIKOS, A. G. Immunomodulatory properties of stem cells and bioactive molecules for tissue engineering. **J. Control. Release**. v. 219, p. 107-18, 2015.

MONTEIRO, H. A. S.; DA SILVA, I. M. S. C.; MARTINS, A. M. C.; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 10, p. 1347-1352, 2001.

MUNSHI, R.; HSU, C.; HIMMELFARB, J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. **BMC Med.** v. 2, n. 9, p. 11, 2011.

MURATA, S.; SUGIYAMA, N.; MAEMURA, K.; OTSUKI, Y. Quantified kidney echogenicity in mice with renal ischemia reperfusion injury: evaluation as a noninvasive biomarker of acute kidney injury. **Med. Mol. Morphol.** 2017.

NAJAR, M.; RAICEVIC, G.; FAYYAD-KAZAN, H.; BRON, D.; TOUNGOUZ, M.; LAGNEAUX, L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy.** v. 18, n. 2, p. 160-171, 2016.

NAGAO, S.; NISHII, K.; KATSUYAMA, M.; KURAHASHI, H.; MARUNOUCHI, T.; TAKAHASHI, H.; WALLACE, D. P. Increased water intake decreases progression of polycystic kidney disease in the PCK rat. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 17, n. 8, p. 2220-2227, 2006.

NAKAGAWA, T.; MAZZALI, M.; KANG, D. H.; KANELIS, J.; WATANABE, S.; SANCHEZ-LOZADA, L. G.; RODRIGUEZ-ITURBE, B.; HERRERA-ACOSTA, J.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. **Am. J. Nephrol.**, v. 23, n. 1, p. 2-7, 2003.

NEEDHAM, E. Management of acute renal failure. **Am. Fam. Physician.**, v. 72, n. 9, p. 1739-1746, 2005.

NITTA, H.; MUNGER, W.; WILSON, E.; RALSTON, R.; AND ALILA, H. Improved In Situ immunodetection of leukocytes on paraffin embedded mouse spleen. **Cell Vision.** v. 4, n. 1, p. 73-80, 1997.

NUNES, T.F.; BRUNETTA, D. M.; LEAL, C. M.; PISI, P. C. B.; RORIZ-FILHO, J. S. Insuficiência renal aguda. **Medicina (Ribeirão Preto)** v. 43, n. 3, p. 272-282, 2010.

OKUSA, M.D.; JABER, B.L.; DORAN, P.; DURANTEAU, J.; YANG, L.; MURRAY, P.T.; MEHTA, R.L.; INCE, C. Physiological biomarkers of acute kidney injury: a conceptual approach to improving outcomes. **Contrib. Nephrol.** v.182, p. 65-81, 2013.

PARK, K.M.; CHEN, A.; BONVENTRE, J.V. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. **J Biol Chem.** v. 276, n. 15, p. 11870-11876, 2001.

PINHO, F. M.; ZANNETA, D. M.; BURDMANN, E. A. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. **Kidney Int.**, v. 67, n. 2, p. 659-67, 2005.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualizações em Insuficiência Renal Aguda: Insuficiência renal após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 3, p. 162-168, 2000.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science.** v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

QUINTAES, P. S. L.; IRENE DE LOURDES NORONHA, I. L. Insuficiência Renal Aguda: Papel dos neutrófilos e moléculas de adesão na fisiopatologia da insuficiência renal aguda isquêmica. **J. Bras. Nefrol.** v. 20, n. 1, p. 74-77, 1998.

REQUIÃO-MOURA, L.R.; DURÃO JUNIOR, MDE. S.; MATOS, A.C.; PACHECO-SILVA, A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. **Einstein (Sao Paulo).** v. 13, n. 1, p. 129-135, 2015.

RIBEIRO, L.A.; ALBUQUERQUE, M.J.; DECAMPOS, V.A; KATZ, G.; TAKAOKA, N.Y.; LEBRAO, M.L.; JORGE, M.T. Deaths caused by venomous snakes in the State of Sao Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. **Rev. Assoc. Med. Bras.** n. 44, p. 312-318, 1998.

RIEGERSPERGER, M.; COVIC, A.; GOLDSMITH, D. Allopurinol, uric acid, and oxidative stress in cardiorenal disease. **Int. Urol. Nephrol.** v. 43, n. 2, p. 441-449, 2011.

ROSSELLI, D. D.; MUMAW, J. L.; DICKERSON, V.; BROWN, C. A.; BROWN, S. A.; SCHMIEDT, C. W. Efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell administration in a model of acute ischemic kidney injury in cats. **Res. Vet. Sci.** v. 108, p. 18-24, 2016.

SAFIRSTEIN, R.; DIMARI, J.; MEGYESI, J.; PRICE, P. Mechanisms of renal repair and survival following acute injury. **Semin Nephrol.** v. 18, n. 5, p. 519-522, 1998.

SALLUSTIO, F.; SERINO, G.; SCHENA, F.P. Potential Reparative Role of Resident Adult Renal Stem/Progenitor Cells in Acute Kidney Injury. **Biores. Open Access.** v. 4, n. 1, p. 326-333, 2015.

SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; SOTO, V.; TAPIA, E.; AVILA-CASADO, C.; SAUTIN, Y. Y.; NAKAGAWA, T.; FRANCO, M.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B.; JOHNSON, R. J. Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 295, n. 4, p. F1134-F1141, 2008.

SATO, K.; OZAKI, K.; OH, I.; MEGURO, A.; HATANAKA, K.; NAGAI, T.; MUROI, K.; OZAWA, K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood.** v. 109, n. 1, p. 228-234, 2007.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells.** v. 25, n. 4, p. 818-827, 2007.

SHARFUDDIN, A. A.; MOLITORIS, B. A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Nat. Rev. Nephrol.** v. 7, n. 4, p. 189-200, 2011.

SIMÕES, E.; SILVA, A. C.; TEIXEIRA, M. M. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. **Pharmacol. Res.** v. 107, p.154-162, 2016

SINGH, Y.; SINGH, K.; SHARMA, P.L. Effect of combination of renin inhibitor and Mas-receptor agonist in DOCA-salt-induced hypertension in rats. **Mol. Cell Biochem.** v. 373, n. 1-2, p. 189-194, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Disponível em: https://sbn.org.br/app/uploads/Diretrizes_Insuficiencia_Renal_Aguda.pdf. Acesso: 14/07/2017.

SRISAWAT, N.; KELLUM, J.A. Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. **Curr. Opin. Crit. Care.** v. 17, n. 6, p. 548-555, 2011.

STAVRIC, B.; JOHNSON, W. J.; GRICE, H. C. Uric acid nephropathy: an experimental model. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 130, n. 2, p. 512–516, 1969.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem. Cells. Dev.** v. 21, n. 14, p. 2724-2752, 2012.

TABERA, S.; PÉREZ-SIMÓN, J. A.; DÍEZ-CAMPELO, M.; SÁNCHEZ-ABARCA, L. I.; BLANCO, B.; LÓPEZ, A.; BENITO, A.; OCIO, E.; SÁNCHEZ-GUIJO, F. M.; CAÑIZO, C.; SAN MIGUEL, J. F. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. **Haematologica.** v. 93, n. 9, p. 1301-1309, 2008.

TAMARIZ, L.; HARE, J. M. Xanthine oxidase inhibitors in heart failure: where do we go from here?. **Circulation.** v. 131, n. 20, p. 1741-1744, 2015.

THETHI, T.; KAMIYAMA, M.; KOBORI, H. The link between the renin-angiotensin-aldosterone system and renal injury in obesity and the metabolic syndrome. **Curr. Hypertens. Rep.** v. 14, n. 2, p. 160-169, 2012.

TIMSIT, M.O.; CARDEÑA, G.G. Flow-Dependent Endothelial Function and Kidney Dysfunction. **Seminars in Nephrology.** v. 32, n. 2, p. 185-191, 2012.

TOGOE, E.B.; SILVA, I.S.; CURY, J.L.; SOUZA, A.S.; BORGES, J.H.; SATURNINO, K.C. Animal model of chronic kidney disease using a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion in White New Zealand rabbits. **Acta. Cir. Bras.** v. 29, n. 10, p. 651-657, 2014.

TYLICKI, L.; LIZAKOWSKI, S.; RUTKOWSKI, B. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for nephroprotection: current evidence and future directions. **J. Nephrol.** v. 25, n. 6, p. 900-910, 2012.

UCHINO, S. The epidemiology of acute renal failure in the world. **Curr. Opin. Crit. Care.** v. 12, n. 6, p. 538-543, 2006.

VISWESWARAN, M.; POHL, S.; ARFUSO, F.; NEWSHOLME, P.; DILLEY, R.; PERVAIZ, S.; DHARMARAJAN, A. Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells - To Wnt, or not Wnt. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 68, p.139-47, 2015.

WRIGHT, J.W.; KAWAS, L.H.; HARDING, J.W. The development of small molecule angiotensin IV analogs to treat Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Prog. Neurobiol.** n. 125, p. 26-46, 2015.

YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; BARONE, J. M.; ALEGRE, V. S.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F. *Crotalus durissus terrificus* venom and simvastatin affect oxidative stress and plasma, urine and renal aminopeptidases in mice. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 445-454, 2008.

YOKOMIZO, V.M.F.; BENEMOND, T.M.H.; BRESSAN, F.F.; SANGALLI, J.R.; PIEIRI, N.C.G.; CASALS, J.B.; MARTINS, D.S.; MEIRELLES, F.V. Células-tronco derivadas de tecido adiposo: isolamento, cultivo in vitro e perspectivas de utilização em dermatologia. **Surg. Cosmet. Dermatol.** v. 3, n. 1, p. 55-59, 2011.

YU, M. A.; SANCHES-LOZADA, L.; JOHNSON, R. J.; KANG, D. H. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. **J. Hypert.** v. 28, n. 6, p. 1234-1242, 2010.

YUGANDHAR, V. G.; CLARK, M. A. Angiotensin III: a physiological relevant peptide of the renin angiotensin system. **Peptides**. v. 46, p. 26-32, 2013.

ZABELL, J.R.; WU, J.; SUK-OUICHAÏ, C.; CAMPBELL, S.C. Renal Ischemia and Functional Outcomes Following Partial Nephrectomy. **Urol. Clin. North Am.** v. 44, n. 2, p. 243-255, 2017.

ZAPOLSKI, T.; WACIŃSKI, P.; KONDRACKI, B.; RYCHTA, E.; BURACZYŃSKA, M.J.; WYSOKIŃSKI, A. Uric acid as a link between renal dysfunction and both pro-inflammatory and prothrombotic state in patients with metabolic syndrome and coronary artery disease. **Kardiol. Pol.** v. 69, n. 4, p. 319-326, 2011.

ZHAO, Y.; ZHANG, H. Update on the mechanisms of homing of adipose tissue-derived stem cells. **Cytotherapy**. v. 18, n. 7, p. 816-827, 2016.

ZHARIKOV, S.; KROTOVA, K.; HU, H.; BAYLIS, C.; JOHNSON, R. J.; BLOCK, E. R.; PATEL, J. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 295, n. 5, p. 1183-1190, 2008.

ZHU, X. Y.; LERMAN, A.; LERMAN, L. O. Concise review: mesenchymal stem cell treatment for ischemic kidney disease. **Stem. Cells.** v. 31, n. 9, p. 1731-1736, 2013.

ZIFF, O. J.; COVIC, A.; GOLDSMITH, D. Calibrating the impact of dual RAAS blockade on the heart and the kidney - balancing risks and benefits. **Int. J. Clin. Pract.** v. 70, n. 7, p. 537-553, 2016.

ZUBKO, R.; FRISHMAN, W. Stem cell therapy for the kidney?. **Am. J. Ther.** v. 16, n. 3, p. 247-256, 2009.

ZUK, A.; BONVENTRE, J. V. Acute Kidney Injury. **Annu. Rev. Med.** v. 67, p. 293-307, 2016.