

**Beatriz Santos Geoffroy Corrêa**

**Avaliação do consumo elevado de sódio e do  
tratamento com células-tronco mesenquimais em  
ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal  
bilateral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia  
Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara  
Furukawa

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2023**

**Beatriz Santos Geoffroy Corrêa**

**Avaliação do consumo elevado de sódio e do  
tratamento com células-tronco mesenquimais em  
ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal  
bilateral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia  
Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara  
Furukawa

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Corrêa, Beatriz Santos Geoffroy

Avaliação do consumo elevado de sódio e do  
tratamento com células-tronco mesenquimais em ratos  
submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral /  
Beatriz Santos Geoffroy Corrêa. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Luzia Naoko Shinohara Furukawa.

Descritores: 1.Isquemia e reperfusão renal  
2.Dieta hipersódica 3.Células-tronco mesenquimais  
4.Injúria renal aguda 5.Terapia celular 6.Ratos  
Wistar

USP/FM/DBD-118/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Estudo desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica  
– LIM 16 da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo.

Protocolo de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no  
Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa nº174-15).

Este trabalho integra o projeto regular (FAPESP 2013/25909-  
1) intitulado *“Avaliação da influência da sobrecarga de sódio  
e do tratamento com N-acetilcisteína ou células-tronco  
mesenquimais em ratos submetidos à isquemia e reperfusão  
renal”*.

Aos meus pais, Paulo e Bárbara, e à  
minha irmã Paola, por segurarem a minha  
mão e jamais soltar.

À Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa, a quem eu tenho uma enorme admiração e carinho, e com quem eu tive o prazer de passar horas e horas estudando novos desafios e desenvolvendo novos projetos. Ela foi a primeira profissional na qual eu me inspirei (e ainda me inspiro) para fazer da ciência uma realidade no Brasil. Serei eternamente grata pela sua paciência, amizade e ensinamentos.

À Carolina Romão e Rafael Canavel Pereira, pela parceria no projeto.

Ao Dr. Joel C. Heimann, Dr. Roberto Zatz e à Dra. Vanda Jorgetti pelos sábios conselhos.

À Dra. Luciene Machado dos Reis e à Dra. Mayara Klimuk Uchiyama, por me ensinar tudo o que sei sobre cultivo celular.

Aos meus amigos de laboratório Ivone, Cléo, Wagner, Silvana e Ádilla, obrigada por me acudir nos momentos em que precisei, pelas conversas descontraídas e pelas memórias que criamos. O ambiente de trabalho se transforma na presença de vocês. Sentirei saudade!

À Julia Braga Vaz, pela incrível companhia na pós-graduação e na vida. Levo a nossa amizade comigo para onde for.

À minha família, e aos meus amigos. O apoio de vocês foi essencial para que eu conquistasse mais um sonho. Obrigada por todo o amor!

Aos animais, pois sem eles, não seria possível esse estudo.

A todos os professores e professoras, e colegas da pós-graduação que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação.

À Faculdade de Medicina da USP, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio a ciência, financeiro e de concessão da bolsa.

À todas as mulheres cientistas ao longo da história, que me permitiram estar no campo da ciência hoje.

The more that you read, the more things  
you will know. The more that you learn,  
the more places you'll go.

Dr. Seuss

## Sumário

### Lista de abreviaturas

### Lista de figuras

### Lista de tabelas

### Resumo

### Abstract

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Injúria renal aguda (IRA).....	1
1.2 Injúria renal aguda e sobrecarga de sódio.....	2
1.3 Células-tronco mesenquimais (CTM).....	3
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
3.1 Animais.....	6
3.2 Dieta.....	6
3.3 Obtenção, cultivo e caracterização de células-tronco.....	8
3.3.1 Obtenção e cultura das células do tecido adiposo.....	8
3.3.2 Capacidade de diferenciação.....	9
3.3.3 Marcação direta.....	10
3.4 Isquemia e reperfusão (I/R).....	14
3.5 Protocolo experimental.....	14
3.5.1 Grupos experimentais.....	14
3.5.2 Evolução ponderal.....	16
3.5.3 Pressão arterial caudal.....	16
3.5.4 Gaiola metabólica.....	17
3.6 Dosagens bioquímicas.....	17
3.7 Histologia renal e cardíaca.....	19
3.8 Imuno-histoquímica.....	19
3.9 Análise estatística.....	20
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Evolução ponderal.....	21
4.2 Consumo hídrico e de dieta, volume urinário e fração de excreção de sódio.....	23
4.3 Pressão arterial caudal.....	25
4.4 Função renal, massas renal e cardíaca, e histologia renal.....	25
4.5 Estresse oxidativo.....	31
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>40</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATP</b>	Adenosinatrifosfato
<b>ATPases</b>	Adenosinatrifosfatases
<b>CICr</b>	Clearance de creatinina
<b>DRC</b>	Doença renal crônica
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EP</b>	Erro Padrão
<b>FeNa</b>	Fração de excreção de sódio
<b>HS</b>	Dieta hipersódica (8% NaCl)
<b>IDR</b>	Imunodifusão radial
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IR</b>	Isquemia e reperfusão
<b>IRA</b>	Insuficiência renal aguda
<b>KDIGO</b>	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
<b>NS</b>	Dieta normossódica (1,3% NaCl)
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>P<sub>Ac</sub></b>	Pressão arterial caudal
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>Sham</b>	Cirurgia fictícia
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alpha

**Vs.**

*Versus*

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b>	Micrografia de células isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade.....	<b>10</b>
<b>Figura 2</b>	Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo branco.....	<b>11</b>
<b>Figura 3</b>	Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo CD29 FITC/ CD44 PE.....	<b>12</b>
<b>Figura 4</b>	Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo CD90 FITC/ CD105 PE.....	<b>13</b>
<b>Figura 5</b>	Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo CD45 APC.....	<b>13</b>
<b>Figura 6</b>	Esquema do protocolo experimental.....	<b>15</b>
<b>Figura 7</b>	Massa corpórea.....	<b>22</b>
<b>Figura 8</b>	Consumo de água, dieta, volume urinário e fração de excreção de sódio.....	<b>24</b>
<b>Figura 9</b>	Pressão arterial caudal.....	<b>25</b>
<b>Figura 10</b>	Clearance de creatinina, creatinina sérica e ureia sérica.....	<b>27</b>
<b>Figura 11</b>	Albuminúria e proteinúria.....	<b>28</b>
<b>Figura 12</b>	Média das massas dos rins corrigidas pelo fêmur e massa cardíaca.....	<b>29</b>
<b>Figura 13</b>	TGF- $\beta$ no córtex renal, TGF- $\beta$ na medula renal, Ed1 no córtex renal E ED1 na medula renal.....	<b>31</b>
<b>Figura 14</b>	Malondialdeído e Ácido úrico sérico.....	<b>32</b>

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1</b>	Composição das dietas normossódica e hipersódica.....	<b>7</b>
-----------------	-------------------------------------------------------	----------

## RESUMO

Corrêa BSG. *Avaliação do consumo elevado de sódio e do tratamento com células-tronco mesenquimais em ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal bilateral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** Tanto em humanos, quanto em animais experimentais, a isquemia renal está associada a uma série de eventos exclusivamente renais ou sistêmicos que podem ser agravados quando associados a outros fatores, tais como a alta ingestão de sódio. A terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) têm se mostrado benéfica na recuperação do tecido renal danificado por insultos isquêmicos. Este estudo avaliou os efeitos do tratamento com CTM derivadas do tecido adiposo e da sobrecarga de 8% de cloreto de sódio na dieta em modelo de I/R renal bilateral em ratos Wistar. **Métodos:** Os animais foram alimentados com dieta hipersódica (HS) ou normossódica (NS) e submetidos à cirurgia fictícia Sham, I/R renal com infusão de 40µL de tampão fosfato-salino (PBS) estéril (I/R+PBS) ou I/R renal com infusão de 2x10<sup>6</sup> de CTM (I/R+CTM) na cavidade intraperitoneal próxima ao insulto, e foram acompanhados por 10 semanas após as cirurgias. Foram avaliadas a ingestão de água, ração, excreção de volume urinário, pressão arterial, função renal e histologia renal, além do estresse oxidativo, avaliado pelo ácido úrico e malondialdeído (MDA) séricos. **Resultados:** A excreção de volume urinário e o consumo de água foram maiores no grupo HS em comparação ao NS. Além disso, a dieta HS aumentou a pressão arterial (PA) e a fração de excreção de sódio (FeNa), os quais diminuíram com o tratamento de CTM. Os níveis séricos de creatinina e ureia não apresentaram diferenças entre os grupos de isquemia tratado e não tratado, nem entre as dietas. Entretanto o clearance de creatinina aumentou com o tratamento de CTM, independente da dieta. A proteinúria e a albuminúria também não apresentaram diferença entre os grupos de isquemia tratado e não tratado com CTM, nem entre as dietas. A dieta HS induziu ao aumento da massa renal, e quando associada a I/R renal, observou-se um aumento da massa cardíaca, entretanto o tratamento com CTM foi capaz de inibir esse aumento da massa cardíaca de forma comparável ao grupo Sham. O nível oxidativo avaliado pelo MDA sérico apresentou-se aumentado com o tratamento de CTM associado à dieta HS, enquanto que sem o tratamento não foi observado esse aumento. O nível de ácido úrico sérico, que avalia a anti-oxidação, mostrou-se diminuído com o tratamento de CTM associado à dieta HS, porém aumentado sem o tratamento. **Conclusão:** As células-tronco mesenquimais mostraram-se eficazes no controle da pressão arterial e na melhora da função renal, auxiliando na recuperação da injúria renal aguda sob influência de ingestão elevada de sódio. Entretanto, sistemicamente as CTM induziram ao maior estresse oxidativo. Estudos posteriores serão necessários para melhor avaliação da associação entre o estresse oxidativo, injúria renal aguda e o elevado consumo de sódio na dieta.

Descritores: Isquemia e reperfusão renal; Dieta hipersódica; Células-tronco mesenquimais; Injúria renal aguda; Terapia celular; Ratos Wistar.

## ABSTRACT

Corrêa BSG. *Evaluation of high sodium intake and mesenchymal stem cells treatment in rats submitted to bilateral renal ischemia and reperfusion* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

**Introduction:** In both humans and experimental animals, renal ischemia is associated with a series of exclusively renal or systemic events that can be aggravated when associated with other factors, such as high sodium intake. Mesenchymal stem cells (MSC) therapy has been shown beneficial in the recovery of kidney tissue damaged by ischemic insults. This study evaluated the effects of MSC's treatment derived from adipose tissue and 8% sodium chloride overload in the diet in a model of bilateral renal I/R in Wistar rats. **Method:** The animals were fed with a high sodium (HS) or normal sodium (NS) diet and underwent Sham surgery, renal I/R with an infusion of 40 $\mu$ L of sterile phosphate-buffered saline (PBS) (I/R+PBS) or renal I/R with infusion of 2x10<sup>6</sup> of MSC (I/R+MSC) in the intraperitoneal cavity close to the insult, and were follow up for 10 weeks after the surgeries. Water and feed intake, urinary volume excretion, blood pressure, renal function and renal histology were evaluated, in addition to oxidative stress, assessed by serum uric acid and malondialdehyde (MDA). **Results:** Urinary volume excretion and water intake were higher in the HS group compared to the NS. Furthermore, the HS diet increased blood pressure (BP) and fractional sodium excretion (FeNa), which decreased with MSC treatment. Serum creatinine and urea levels did not differ between treated and untreated ischemia groups, or between diets. However, creatinine clearance increased with MSC treatment regardless of diet. Proteinuria and albuminuria did not differ between treated and untreated ischemia groups, or between diets. The HS diet induced an increase in renal mass, and when associated to renal I/R, an increase in cardiac mass was observed; however, the MSC treatment inhibited this increase comparable to the Sham group. The oxidative level evaluated by serum MDA has increased with MSC treatment associated with the HS diet, while it was not observed that this increase without MSC treatment. The serum uric acid level, which evaluates the anti-oxidation, reduced with MSC treatment associated with the HS diet, but increased without the treatment. **Conclusion:** The mesenchymal stem cells effectively controlled blood pressure and improved renal function, helping to recover from acute kidney injury under the influence of high sodium intake. However, MSC systemically induced more significant oxidative stress. Further studies will be necessary to assess better the association between oxidative stress, acute kidney injury, and high sodium intake in the diet.

Descriptors: Renal ischemia and reperfusion; High sodium diet; Mesenchymal stem cells; Cellular therapy; Acute kidney injury; Wistar rats.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Injúria renal aguda (IRA)**

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome frequente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (Rewa & Bagshaw, 2014; Selby et al., 2016). A IRA é definida como uma diminuição abrupta da função renal, desenvolvida principalmente por isquemia renal, sepse e nefrotoxicidade por drogas (Makris & Spanou, 2016; KDIGO, 2013). A recuperação incompleta da IRA, pode levar ao desenvolvimento da doença renal aguda, sendo essa associada à alta mortalidade e desfechos que podem culminar na doença renal crônica (Hertzberg et al., 2017; KDIGO, 2013).

A causa mais comum da IRA é pela isquemia e reperfusão (I/R) (Raup-Konsavage, 2018), que consistem, respectivamente, na privação de oxigênio e de outros nutrientes devido a diminuição do fluxo sanguíneo aos tecidos e a consequente restauração desse fluxo para os mesmos. Dessa forma, a I/R resulta na redução abrupta da função renal (Le Dorze et al., 2009), na formação de espécies reativas de oxigênio, infiltração de neutrófilos, peptídeos vasoativos, e depleção de ATP (Bonventre & Yang, 2011; Edelstein et al., 1997).

O processo fisiopatológico da lesão isquêmica altera mecanismos moleculares levando à lesão do epitélio tubular, morte celular por apoptose ou necrose, diminuição da excreção e desequilíbrio da homeostase da água e eletrólitos (Molitoris & Marrs, 1999; Bonventre, 2003; Bonventre & Yang, 2011). No rim pós-isquêmico, devido à diminuição de oxigênio, às células epiteliais tubulares são induzidas ao aumento de fatores pró-fibróticos, tais

como fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e endotelina-1 (ED1) (Yamashita et al., 2001).

Apesar dos avanços nos tratamentos, a IRA ainda é uma preocupação de saúde pública global, sendo amplamente estudada em modelo animal de I/R renal (Zuk & Bonventre, 2016). Por essas razões, mais estudos são necessários para criação de novas estratégias de terapias para o tratamento da IRA.

## **1.2. Injúria renal aguda e sobrecarga de sódio**

Estudos têm demonstrado que fatores ambientais como alta ingestão de sódio pode comprometer a recuperação de uma IRA e predispor a um processo crônico da doença renal aguda. O trabalho de Spurgeon-Pechman e colaboradores em 2007, demonstrou que o alto conteúdo de sódio na dieta administrado após 35 dias de I/R causa um aumento da pressão arterial, albuminúria, hipertrofia renal e alteração nas estruturas glomerulares (Spurgeon-Pechman et al., 2007). No entanto, o papel específico do infiltrado de células, alterações na estrutura glomerular e funcional, lesão tubular, estresse oxidativo induzidos pela IRA somados à sobrecarga de sódio ainda não estão totalmente esclarecidos.

É sabido sobre o importante papel do sódio na manutenção do volume e da osmolaridade no organismo. Porém, o excesso de sódio está associado ao desenvolvimento da hipertensão arterial, de doenças cardiovasculares, renais, entre outras que são crescentes no Brasil (Brasil, 2014).



### **1.3. Células-tronco mesenquimais (CTM)**

A terapia com células-tronco vem despertando grande interesse na comunidade científica devido às suas características peculiares de regeneração tecidual. As células-tronco, tipo mesenquimais (CTM), possuem capacidade de auto-renovação (Lv et al., 2014; Wei et al., 2013) e são definidas como multipotentes. As CTM podem ser obtidas a partir da medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo e por outras fontes menos invasivas, e têm potencial para tratar doenças, tais como a doença de Crohn, síndrome de Sjgren, colite ulcerativa, esclerose múltipla, rejeição de transplante, esclerose sistêmica e lúpus eritematoso sistêmico (Neshati et al., 2018).

O tratamento com CTM, tem se mostrado uma boa opção terapêutica para a IRA, pois pode acelerar o reparo das células renais por meio da liberação de fatores de crescimento e citocinas, além de possuir propriedades parácrinas anti-inflamatória, imunomodulatória e pró-angiogênicas que podem auxiliar no reparo e proteção do tecido contra o infiltrado de leucócitos, fibrose e revascularização (Zhu et al. 2013).

Em 2018, Havakhah e colaboradores evidenciaram que a terapia com CTM contribuiu para uma renoproteção significativa em ratos com IRA induzida por I/R renal. No experimento comentado acima, no qual os animais receberam infusão de CTM imediatamente após a reperfusão renal bilateral de 40 minutos, os mesmos apresentaram melhora significativa na função renal e diminuição da lesão em comparação aos animais não tratados. Em ensaios clínicos, a infusão de CTM tem se mostrado positiva na prevenção da insuficiência renal pós-operatória, sem oferecer riscos sérios ao paciente

(Barnes et. al., 2016). Porém, os modelos experimentais estão elucidando melhor a terapia, onde as CTM demonstram ter efeitos renoprotetores pós-lesão por meio da liberação de fatores promitóticos, antiapoptóticos, anti-inflamatórios e imunomoduladores (Barnes et. al., 2016), proporcionando medidas promissoras para o tratamento da IRA.

## **2. OBJETIVOS**

---

Avaliar o efeito do tratamento com células-tronco mesenquimais em injúria renal aguda sob a influência de consumo de dieta com elevada concentração de sódio em ratos Wistar.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### **3.1 Animais**

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da FMUSP (protocolo de pesquisa nº 174-15).

Os ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar com 6 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, foram mantidos em local com ciclo de luz de 12 horas (escuro e claro), climatizado a 22°C, e receberam ração comercial (CR-1, QUIMTIA –Colombo PR- Brasil) ad libitum do desmame até a 7ª semana de vida.

#### **3.2 Dieta**

Os animais receberam dieta hipersódica (8,0% NaCl e 25,0% proteína - HS) ou normossódica (1,3% de NaCl e 25,0% de proteína - NS) a partir da 8ª até a 21ª semana de vida. Todos os componentes das dietas são iguais exceto o conteúdo de sódio (Tabela 1) e foram adquiridos da Harlan (Harlan Laboratories, Madison, WI 53744-4220, USA), conforme informações na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição das dietas normossódica e hipersódica.

<b>Composição da dieta</b>	<b>Normossódica (0,5% Na ou 1,3% NaCl) (g/Kg)</b>	<b>Hipersódica (3,12% Na ou 8,0% NaCl) (g/Kg)</b>
Caseína	287,0	287,0
Sacarose	313,388	313,388
Amido de milho	200,0	200,0
Óleo de soja	60,0	60,0
Celulose	86,6	20,0
Mistura de vitamina	10,0	10,0
Etoxyquina (antioxidante)	0,012	0,012
Mistura de mineral, Ca-P deficiente	13,37	13,37
Fosfato de cálcio dibásico (CaHPO <sub>4</sub> )	13,4	13,4
Carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> )	6,23	6,23
Cloreto de sódio (NaCl)	10,0	76,6

### **3.3 Obtenção, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais (CTM)**

#### *3.3.1 Obtenção e cultura das células do tecido adiposo*

Ratos machos Wistar de 11 semanas de idade sob a dieta normossódica desde a 8ª semana de vida foram anestesiados com xilazina/ketamina, assepsiados, tricotomizados e uma incisão abdominal foi realizada para a retirada do tecido adiposo gonadal, o qual foi utilizado como fonte de células-tronco mesenquimais. Em seguida, o tecido adiposo foi lavado em PBS+1% gentamicina, centrifugado, e transferido para um tubo falcon contendo tampão de colagenase, onde permaneceu por 30 minutos com agitador à 37°C. O processo de digestão foi interrompido com a adição de soro fetal bovino (SFB), na proporção 1:1 com a amostra, posteriormente centrifugado e o pellet ressuspendido em um meio de cultura contendo Alfa-MEM+10%SFB+1%pen/strep. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada utilizando azul de Tripán.

Essas células foram distribuídas em 02 garrafas de cultura de 75cm<sup>3</sup> e incubadas em estufa de cultura à 37°C. O meio de cultura (Alfa-MEM+10%SFB+1%pen/strep) foi trocado a cada 03 dias, e tripsinizadas a cada 01 semana, período quando atingido a confluência. Cada tripsinização foi considerada uma passagem e então foram realizadas 03 passagens, onde quantificamos o número de células e separamos em tubos contendo aproximadamente 1,5x10<sup>6</sup> células por tubo e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

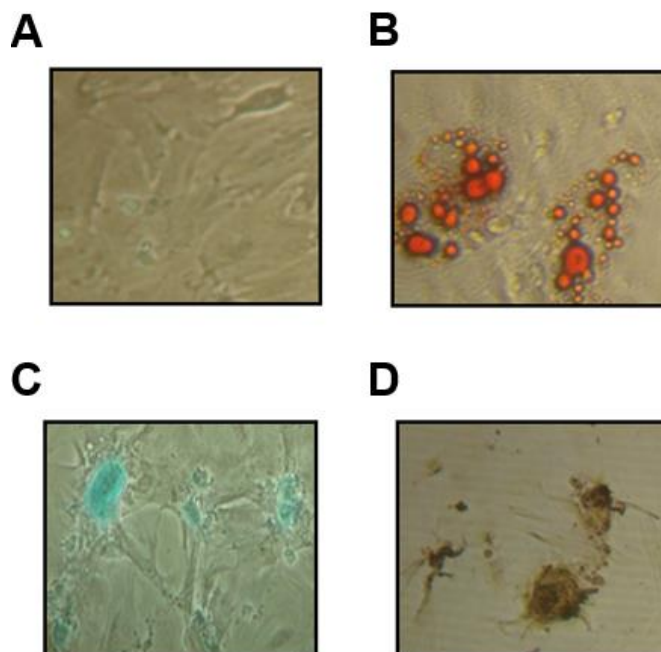
Estas células foram submetidas para verificar as características de células-tronco através da capacidade de diferenciação em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas, e através de marcação direta para anticorpos específicos. Após essa verificação, as células-tronco mesenquimais estavam aptas para serem utilizadas no estudo.

### *3.3.2 Capacidade de diferenciação*

A capacidade de diferenciação em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas das células-tronco mesenquimais foi avaliada através de meios de cultura específicos conforme a técnica descrita por Zago & Tadeu:

1. STEMPRO adipogenesis supplement + revelação com Oil Red - diferenciação adipogênica;
2. STEMPRO chondrogenesis supplement + revelação com Safranina – diferenciação condrogênica;
3. STEMPRO osteogenesis supplement + revelação com fosfatase alcalina e vermelho de Alizarina – diferenciação osteogênica.

As microfotografias das células diferenciadas são apresentadas em seguida.



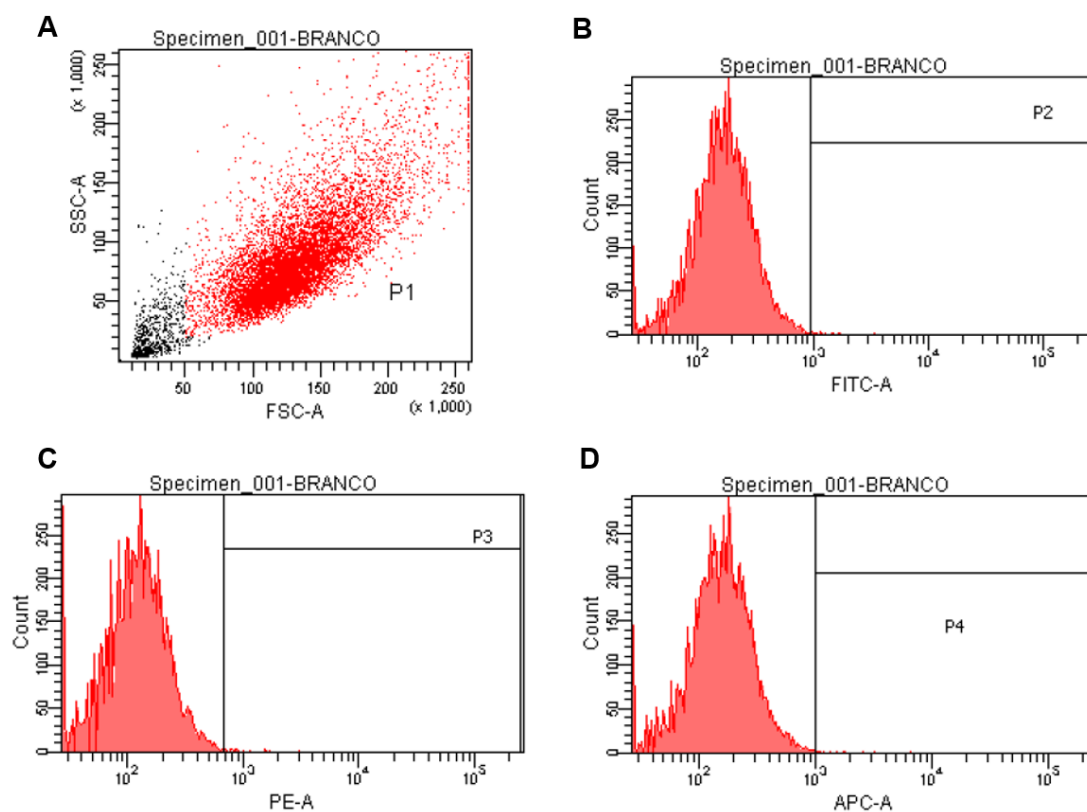
**Figura 1. Micrografia de células isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade. A) Células do controle negativo não diferenciadas; Células diferenciadas em B) Adipócitos (marcados em vermelho); C) Condrócitos (marcados em azul); D) Osteócitos (marcados em um tom puxado para o marrom).**

### 3.3.3 Marcação direta

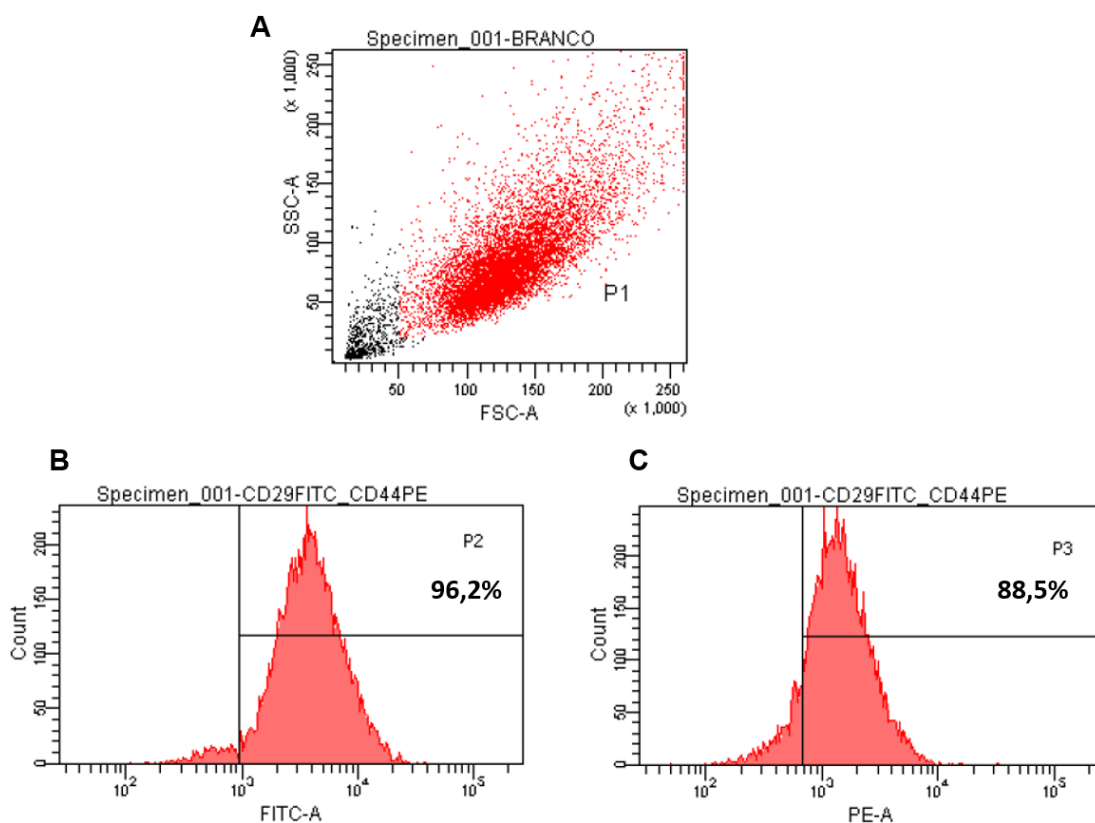
A marcação direta para os anticorpos CD29, CD44, C105 e C45 foi realizada em amostra contendo  $5 \times 10^5$  células/uL, utilizando o citômetro de fluxo FACS Canto II, e o software DIVA. Os eventos foram adquiridos através de 04 tubos, denominados:

- 1- Branco (somente células-tronco)
- 2- CD29 FITC/ CD44 PE
- 3- CD90 FITC/ CD105 PE
- 4- CD45 APC

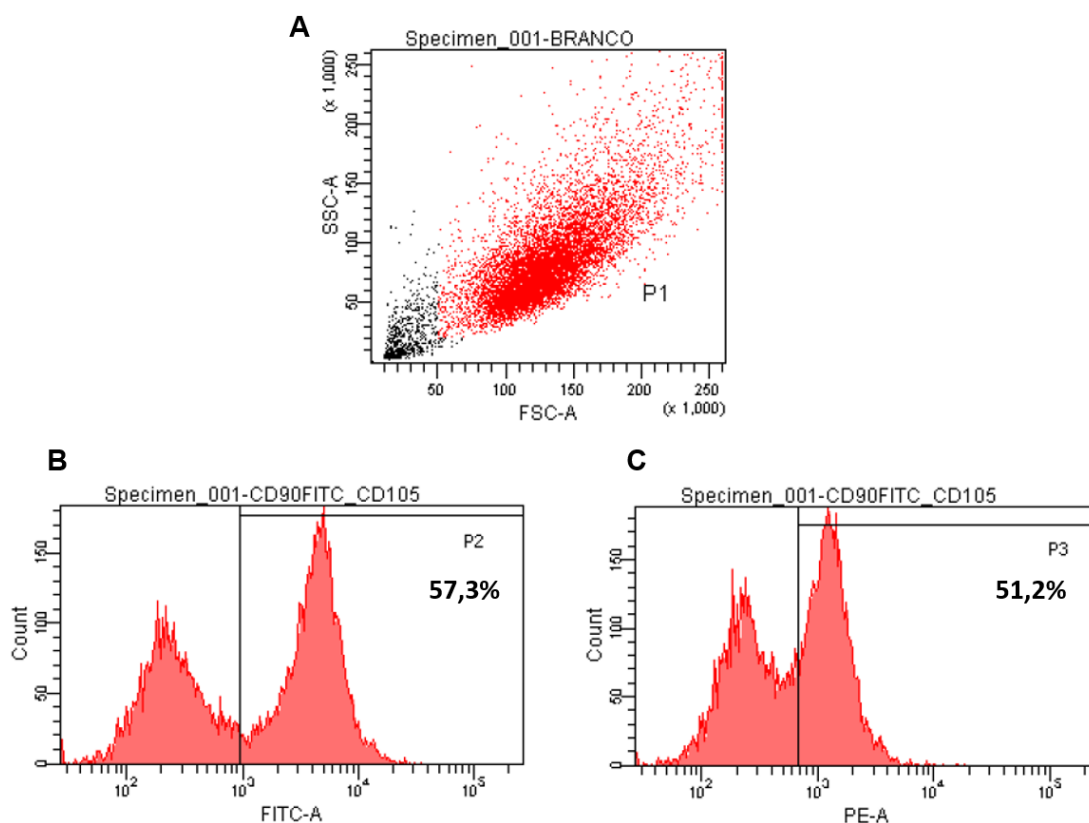




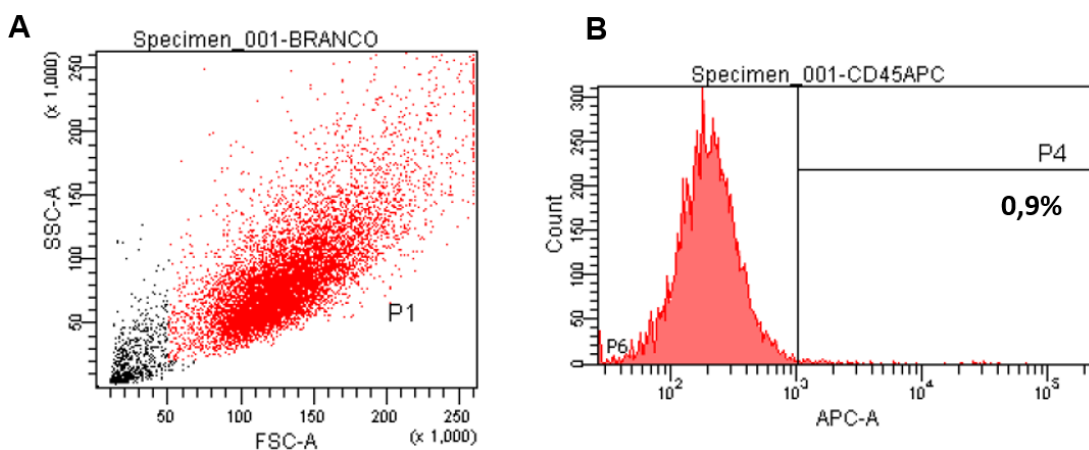
**Figura 2. Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo branco. A) gráfico em *dot plot* da dispersão da população 1 (gate-P1) de células-tronco. Histograma das células da P1 tratadas com o fluorocromo B) FITC; C) PE e D) APC.**



**Figura 3. Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo CD29 FITC/CD44 PE. A)** Gráfico em *dot plot* da dispersão da população (P1) de células-tronco; **B)** P2 representa a positividade para o CD29 marcado com FITC em 96,2% das células selecionadas no gate inicial, correspondente a 8.498 células do total de 10.000 eventos adquiridos; **C)** P3 de células-tronco representa a positividade para CD44 marcado com PE em 88,5% das células correspondente a 7.822 células do total de 10.000 eventos adquiridos.



**Figura 4.** Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo CD90 FITC/CD105 PE. **A)** gráfico em *dot plot* da dispersão da população (P1) de células-tronco; **B)** P2 representa a positividade para o CD90 marcado com FITC em 57,3% das células selecionadas no gate inicial, correspondente a 5.094 células do total de 10.000 eventos adquiridos; **C)** P3 representa a positividade para CD105 marcado com PE em 51,2% das células corresponde a 4.553 células do total de 10.000 eventos adquiridos.



**Figura 5.** Análises realizadas por citometria de fluxo de células-tronco isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar de 10 semanas de idade, e contidas no tubo CD45 APC. **A)** Gráfico em *dot plot* da dispersão da população (P1) de células-tronco; **B)** P4 representa a positividade para CD45 marcado com APC em 0,9% das células selecionadas no gate inicial, correspondente a 79 células do total de 10.000 eventos adquiridos.

### 3.4 Isquemia e reperfusão renal (I/R)

A IRA foi induzida por meio de I/R renal em animais com 11 semanas de vida em ambos os grupos de dieta. Os animais foram anestesiados com 0,15 mL/100g peso corpóreo da mistura de 20 mg/mL xilazina e 50 mg/mL ketamina (2:5 vol/vol), e por meio de uma incisão abdominal, as artérias renais de ambos os rins foram isoladas e clampeadas por 45 minutos, com objetivo de induzir a isquemia, e então os clamps foram retirados e a reperfusão foi visualizada pela mudança de cor do tecido renal para a coloração antes da isquemia. Após a I/R, os animais tiveram a incisão suturada e receberam um tratamento de analgésico com Tramadol (Pechman et al., 2009).

O grupo Sham foi submetido a uma cirurgia fictícia na qual foi realizada uma incisão abdominal e, após 45 minutos, os ratos foram suturados e receberam os mesmos cuidados do grupo I/R.

### 3.5 Protocolo experimental

#### 3.5.1 Grupos experimentais

**NS-Sham:** Animais que receberam dieta normossódica e submetidos à cirurgia fictícia;

**HS-Sham:** Animais que receberam dieta hipersódica e foram submetidos à cirurgia fictícia;

**NS-I/R+PBS:** Animais que receberam dieta normossódica, e foram submetidos a I/R renal, com infusão de 40 $\mu$ L de PBS estéril antes da sutura, na cavidade intraperitoneal;

**HS-I/R+PBS:** Animais que receberam dieta hipersódica, e foram submetidos a I/R renal, com infusão de 40 $\mu$ L de PBS estéril antes da sutura, na cavidade intraperitoneal;

**NS-I/R+CTM:** Animais que receberam dieta normossódica submetidos a I/R renal, com infusão 2x10<sup>6</sup> de CTM em 40 $\mu$ L de tampão fosfato-salino (PBS) estéril antes da sutura, na cavidade intraperitoneal;

**HS-I/R+CTM:** Animais que receberam dieta hipersódica submetidos a I/R renal, com infusão de 2x10<sup>6</sup> de CTM em 40 $\mu$ L de tampão fosfato-salino (PBS) estéril antes da sutura, na cavidade intraperitoneal;



**Figura 6. Esquema do protocolo experimental.** O protocolo experimental foi iniciado com ratos machos Wistar de 8 semanas de vida alimentados com dieta normossódica (NS) contendo 1,3% de cloreto de sódio, ou dieta hipersódica (HS) contendo 8% de cloreto de sódio. Na 11ª semana de vida, os animais das dietas normossódica e hiperssódica foram submetidos às cirurgias controle Sham; isquemia e reperfusão renal bilateral com infusão de tampão fosfato-salino (PBS) estéril (I/R+PBS); ou isquemia e reperfusão renal bilateral com infusão de células-tronco mesenquimais (CTM) em tampão fosfato-salino (PBS) estéril (I/R+CTM). Na 21ª semana de vida dos ratos (10 semanas após cirurgias -Sham ou I/R), ocorreu a eutanásia dos animais.

O protocolo experimental (Figura 6) seguiu da 8ª até a 21ª semana de vida dos animais. Após 10 semanas das cirurgias de I/R ou Sham (21ª semana de vida dos animais), foi realizado o preparo do anestésico utilizando 20mg/mL xilazina e 50mg/mL ketamina (2:5 vol/vol), e em seguida aplicada nos ratos a dose de 0,20mL de anestésico/100g de peso corpóreo dos

animais. De forma subsequente, foi realizada a exsanguinação total dos ratos através da punção da aorta abdominal, configurando a eutanásia. O fêmur foi então retirado, e seu comprimento medido por meio de paquímetro universal (Vonder Grupo OVD, Brasil). Em seguida, os rins e coração foram removidos, pesados em balança analítica (Marte Científica, São Paulo, SP, Brasil, modelo: AS200) e corrigidos pelo comprimento do fêmur de cada animal. O rim esquerdo foi separado para posterior inclusão em parafina e análises histológicas, enquanto o rim direito e o coração foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O sangue coletado foi centrifugado, separado o soro e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análises bioquímicas.

Antes e após a I/R foram avaliados os seguintes parâmetros: pressão arterial caudal, consumo de água e dietas, e função renal.

### *3.5.2 Evolução ponderal*

A massa corpórea dos ratos foi avaliada semanalmente utilizando uma balança eletrônica específica para animais (AS 5500, Marte Científica, São Paulo, SP, Brasil).

### *3.5.3 Pressão arterial caudal*

Previamente à medida de pressão arterial caudal (PAC), os ratos foram mantidos em ambiente aquecido a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 10 a 15 minutos para melhor dilatação dos vasos. A medida da PAC dos animais foi realizada através do cuff de oclusão e do sensor de pulso, ambas colocadas suavemente sobre a cauda utilizando o aparelho da marca Kent Scientific

Corporation, USA, modelo RTBP 2045. O princípio da medida é fundamentado na detecção da distensão do vaso arterial causada pelo pulso de sangue que flui através da artéria caudal e captado por um sensor piezoelétrico sensível, sendo que os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica. Foram consideradas as médias de 5 aferições consecutivas das medidas obtidas na ausência de movimentação do animal.

Os ratos tiveram a pressão arterial caudal aferida no período pré-cirurgias (animais com oito semanas de vida) e 10 semanas após cirurgias (animais com 21 semanas de vida).

#### *3.5.4 Gaiola metabólica*

Os animais foram acondicionados individualmente em gaiolas metabólicas de acrílico (Tecniplast, Itália) por 24h para um período de adaptação, seguido de mais 24h para a coleta de dados de consumo hídrico, de dieta, e volume de excreção urinária de 24h.

As amostras de urina foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

### **3.6 Dosagens bioquímicas**

As dosagens de ureia sérica, e creatinina sérica e urinária foram realizadas utilizando kits (kit creatinina K e kit Ureia UV Liquiform, ref: 104; – ref:96; Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa, Minas Gerais – Brasil) através do equipamento automatizado Cobas Mira Plus (Roche Diagnóstica, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis

de sódio sérico e urinário foram determinados por meio de espectrofotômetro de chama (modelo FC 280, CELM® – São Paulo, Brasil).

As dosagens séricas e urinárias de creatinina foram utilizadas para os cálculos do *Clearance de creatinina* (ClCr):  $(UV/P)$ , sendo U= creatinina urinária (mg/dl), V= volume urinário (ml/min), e P=creatinina sérica (mg/dl) e da *Fração de excreção de sódio*  $[(UNa/PNa)/(UCr/PCr) \times 100 (\%)]$ , uma vez que,  $U_i$ = concentração urinária de sódio (mEq/L); PNa = concentração plasmática de sódio (mEq/L); UCr = concentração urinária de creatinina (mg/dL); PCr = concentração plasmática da creatinina (mg/dL)].

A Proteinúria foi determinada pelo método turbidimétrico sulfosalicílico. Para cada 1 mL de urina foi utilizado 3 mL de ácido sulfosalicílico 3% seguido de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 6 mL de água destilada seguida da leitura em espectrofotômetro (Coleman) no comprimento de onda 620nm. Já a albuminúria foi determinada em amostras de urina por meio da imunodifusão radial (IDR) utilizando gel de agarose e anticorpo anti-albumina para rato.

O estresse oxidativo foi avaliado a partir dos níveis de ácido úrico sérico e do malondialdeído (MDA, nmol/L). O MDA da amostra foi determinado utilizando ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ácido tricloroacético, incubado a 100°C e formando o complexo TBA-MDA com produção de uma cor rosa na reação final. As amostras foram lidas a 540 nm em um espectrofotômetro.



### **3.7 Histologia renal**

Na eutanásia, para fins de análises histológicas e imuno-histoquímicas, os rins dos animais foram retirados e imersos em formalina tamponada 4% por 24 horas. Em seguida, as amostras de rim foram levadas ao processador automático de tecidos Histokinette 2000 (Leica – Nussloch, Alemanha), onde foram inclusas em parafina por um período de 14 horas, para posterior preparação de blocos de parafina.

Os blocos histológicos foram submetidos a cortes de espessura de 4 a 5  $\mu\text{m}$  utilizando um micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica – Nussloch, Alemanha), e que foram aderidos em lâminas revestidas com silano 2%.

### **3.8 Imuno-histoquímica**

A partir de cortes histológicos do tecido renal, foram identificados e quantificados macrófagos. Para isso, foram utilizados anticorpos primários específicos: antimonócito/antimacrófagos CD68 (ED1) e anti-TGF- $\beta$ 1. Após o bloqueio da avidina e biotina endógena e bloqueio inespecífico com soro não imune, os cortes foram incubados com anticorpo primário específico, e a seguir com o anticorpo secundário seguido do complexo Streptavidin-AP. A visualização desta reação foi realizada utilizando uma solução composta de naftol AS-MX-fosfato (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha), corante fast red (Sigma Chemical Co, St Louis) e levamisol (Sigma Chemical Co, St Louis) e também uma solução tampão tris-tamponado a 0,1M. Posteriormente, foram contra corados com

corante Hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha). A quantificação das proteínas foi realizada por meio da microscopia óptica comum por score de células positivas em 30 campos no aumento 200x (score 0: menor que 5% da área com alteração; score 1: 5-25% da área com alteração; score 2: 25-50% da área com alteração; score 3: 50-75% da área com alteração; score 4: acima de 75% da área com alteração).

### **3.9 Análise estatística**

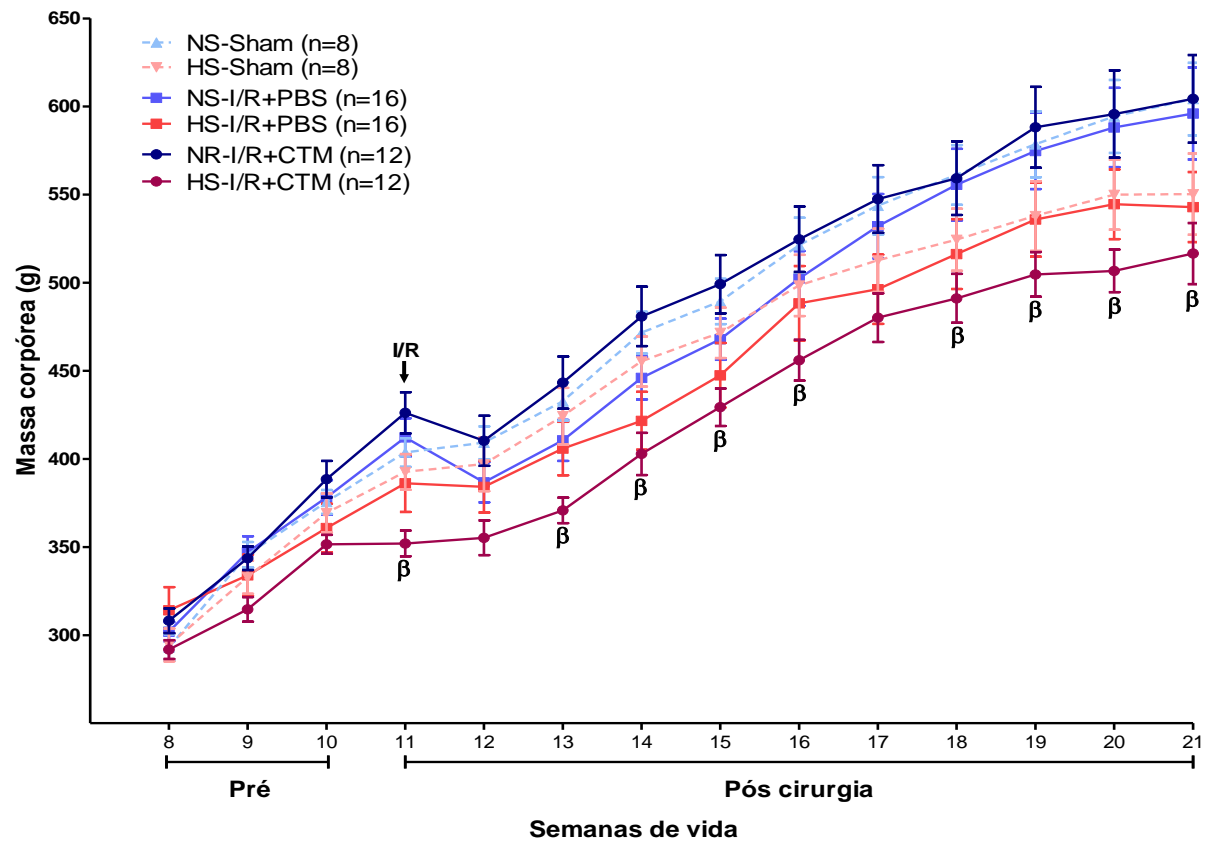
Para a análise dos dados foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*. Primeiramente os dados foram avaliados quanto a sua normalidade de distribuição pelo teste de D'Agostino, e em seguida aplicados o teste t de Student para comparação do grupo Sham, e *Two-way ANOVA* com pós-teste Bonferroni para grupos de tratamento 10 semanas após-cirurgias Sham ou I/R, sendo adotado nível de significância inferior a 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

---

### **4.1 Evolução ponderal**

Ao longo de 10 semanas após-cirurgias Sham ou I/R, a diferença estatística no peso corpóreo foi observada apenas nos animais tratados com CTM, onde o grupo HS-I/R+CTM apresentou menor peso quando comparado ao grupo NS-I/R+CTM, com exceção da 12<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> semanas após cirurgias (Figura 7). Estes dados ilustram os efeitos da associação da sobrecarga e sódio com o tratamento com CTM, resultando em menor ganho de peso corpóreo ao longo das semanas pós-cirurgias enquanto que essa diferença não é observada entre os grupos I/R+PBS e Sham.



**Figura 7. Massa corpórea (g).** Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *Two-way* ANOVA com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).  $\beta$   $p < 0,05$  HS-I/R+CTM vs NS-I/R+CTM

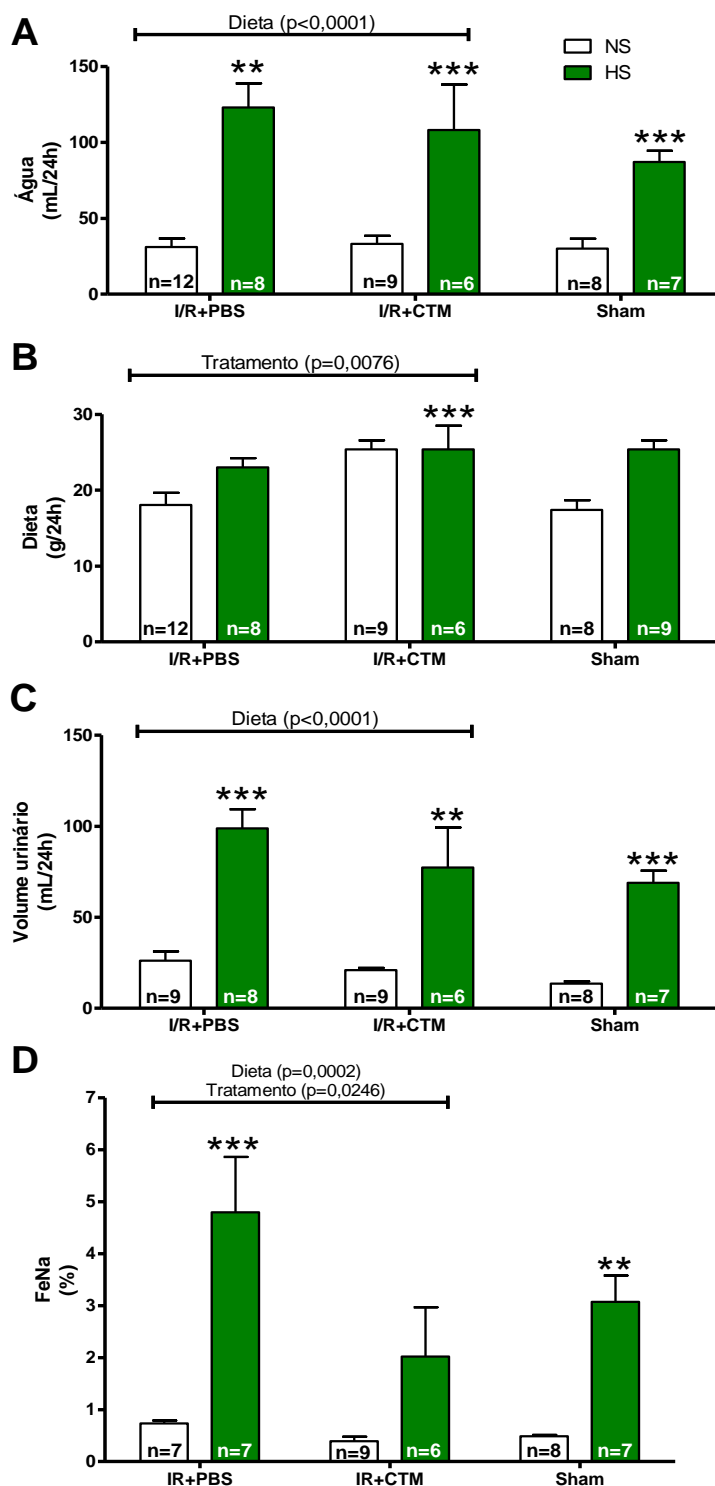
## **4.2 Consumo hídrico e de dieta, volume urinário e fração de excreção de sódio**

Como estudos anteriores revelaram que os dados da ingestão de alimentos e água, e o volume de urina podem ser influenciados devido a uma dieta rica em sódio, acreditamos ser essencial investigar a influência dessas características basais no tratamento das CTM.

O consumo de água foi influenciado pela dieta ( $p < 0,0001$ ), onde o consumo de água foi maior em animais que receberam a dieta HS comparada com os que receberam dieta NS tanto no grupo Sham como nos grupos IR (Figura 8A). O consumo de dieta foi maior nos animais Sham que receberam a dieta HS, entretanto o tratamento com CTM ( $p = 0,0076$ ) induziu ao consumo maior independente da dieta em relação ao grupo sem tratamento (IR+PBS) (Figura 8B). Semelhantemente ao consumo de água, o volume urinário foi influenciado pela dieta ( $p < 0,0001$ ) e não influenciado pelo tratamento CTM (Figura 8C). A fração de excreção de sódio foi maior nos animais que receberam dieta HS comparada aos que receberam dieta NS nos grupos Sham e IR+PBS. Além disso, o tratamento CTM ( $p = 0,0246$ ) induziu a menor FeNa independente da dieta comparado ao grupo sem tratamento (IR+PBS) (Figura 8D).

As dosagens de sódio na urina e no sangue utilizados para os cálculos de FeNa encontram-se nos Anexos 1 e 2.

O consumo de água (Anexo 3), dieta (Anexo 4) e volume urinário (Anexo 5) nos períodos pré-cirurgia são mostrados no final da tese.

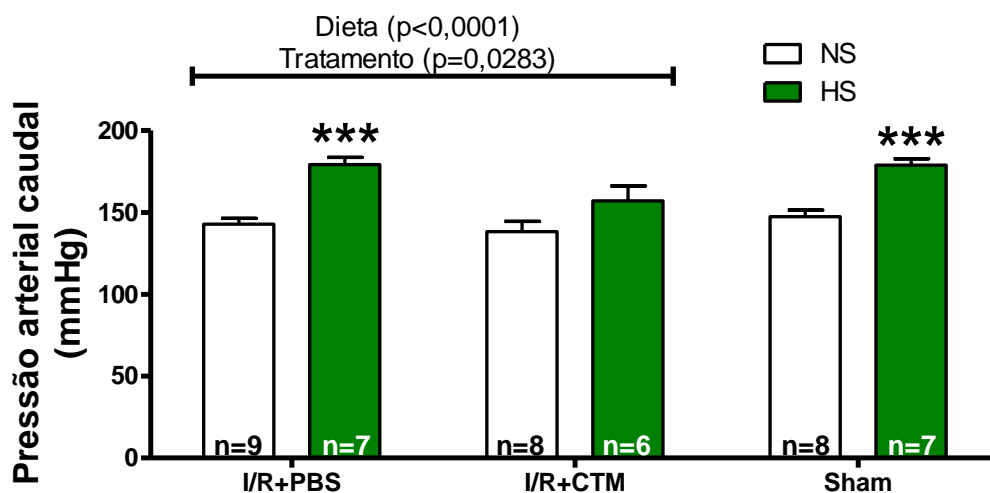


**Figura 8. A) Consumo de água e B) dieta; C) Volume urinário; D) Fração de excreção de sódio** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t* test para o grupo Sham e *Two-way* ANOVA com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ) para os grupos I/R. \*\* $p < 0,01$  HS vs NS; \*\*\* $p < 0,001$  HS vs NS

### 4.3 Pressão arterial caudal

Apesar da dieta HS causar um aumento da pressão arterial (dieta  $p < 0,0001$ ) tanto no grupo Sham como no grupo I/R+PBS, o tratamento com CTM ( $p = 0,0283$ ) foi capaz de reduzir a pressão arterial principalmente nos animais que receberam a dieta hipersódica (Figura 9), revelando um possível efeito protetor das células-tronco mesenquimais.

Dados de pressão arterial no período pré-cirurgia encontram-se no anexo 6.



**Figura 9. Pressão arterial caudal** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t test* para o grupo Sham e *Two-way ANOVA* com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ) para os grupos I/R. \*\*\* $p < 0,001$  HS vs NS

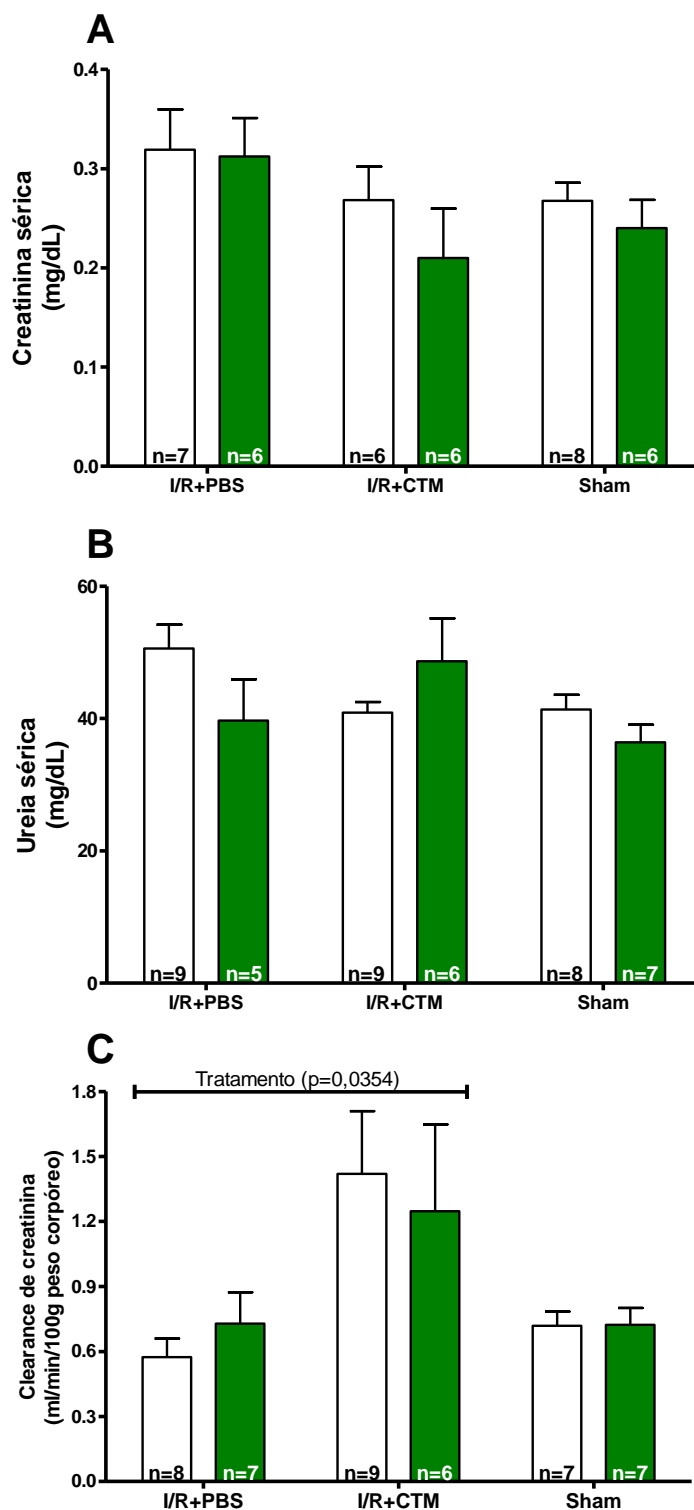
### 4.4 Função renal, massas renal e cardíaca, e histologia renal

Para avaliar como as CTM interferem na recuperação da função renal após I/R associada à ingestão crônica de sódio, avaliamos a creatinina e ureia séricas, clearance de creatinina, albuminúria e proteinúria após 10 semanas de cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais).

A creatinina (Figura 10A) e ureia (Figura 10B) séricas não foram diferentes entre os grupos. No entanto, o fator de tratamento ( $p=0,0354$ ) foi significativo no clearance de creatinina, onde observamos aumento do clearance de creatinina (Figura 10C) no grupo I/R+CTM em relação ao grupo I/R+PBS.

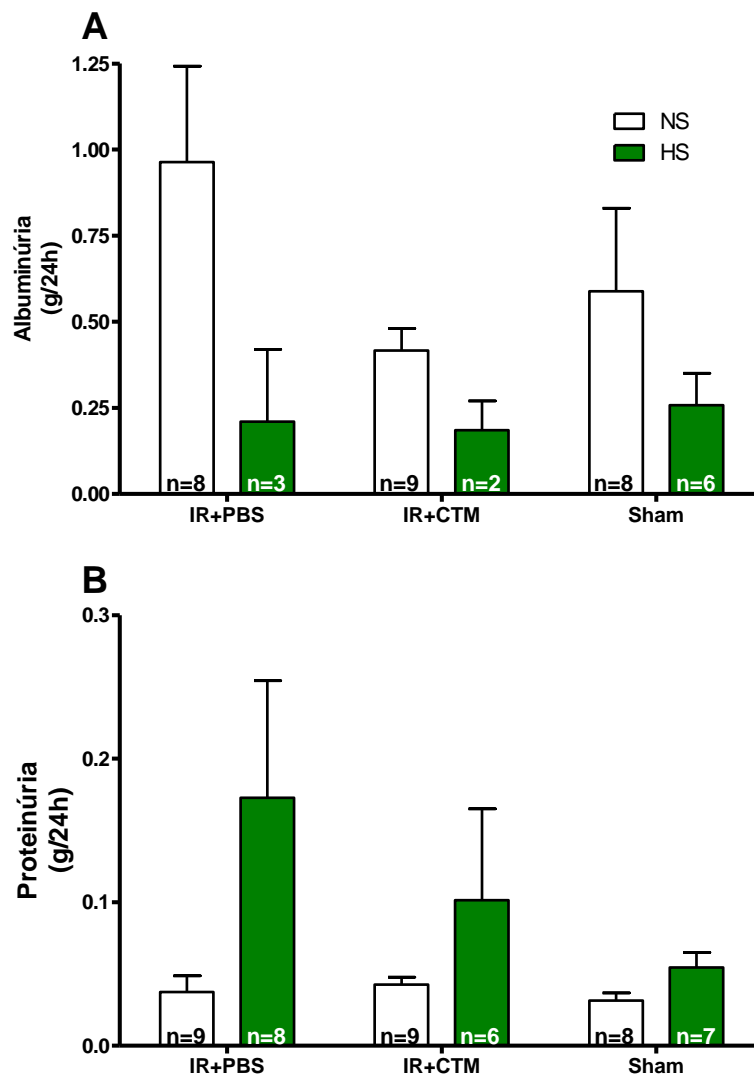
A creatinina sérica dos animais foi avaliada nos períodos pré-cirurgia e na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas pós-cirurgia (Anexo 7) a fim de avaliar o estabelecimento da IRA. No Anexo 8 encontra-se o método de coleta de sangue para análises pré-cirurgia.





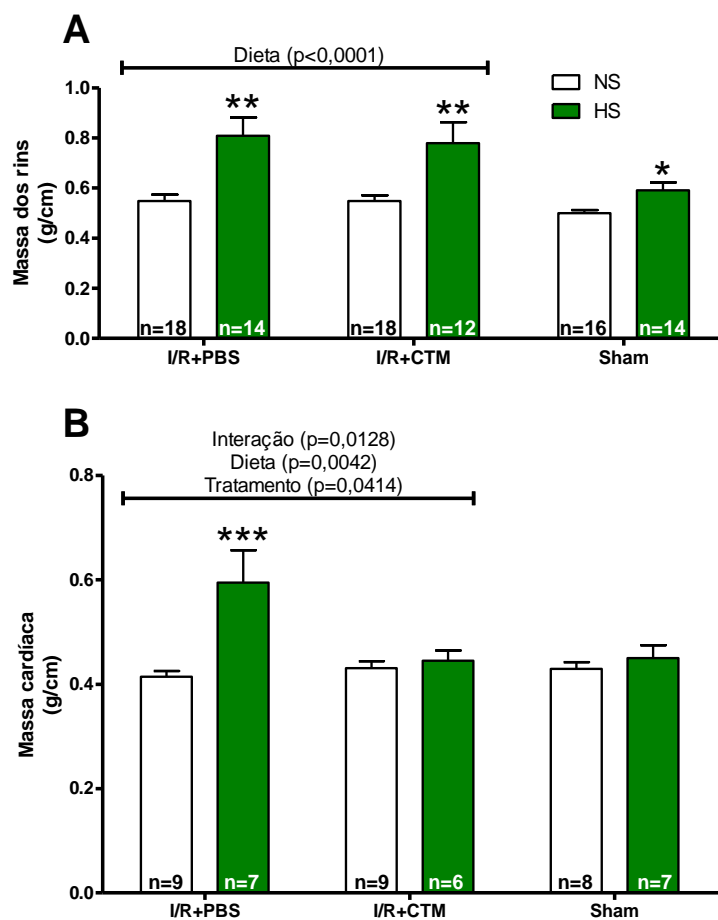
**Figura 10. A) Creatinina sérica; B) Ureia sérica; C) Clearance de creatinina** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t test* para o grupo Sham e *Two-way ANOVA* com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ) para os grupos I/R.

A albuminúria (Figura 11A) não foi diferente entre os grupos, e, de maneira semelhante, a proteinúria também não apresentou diferença (Figura 11B).



**Figura 11. A) Albuminúria; B) Proteinúria** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t test* para o grupo Sham e *Two-way ANOVA* com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ) para os grupos I/R.

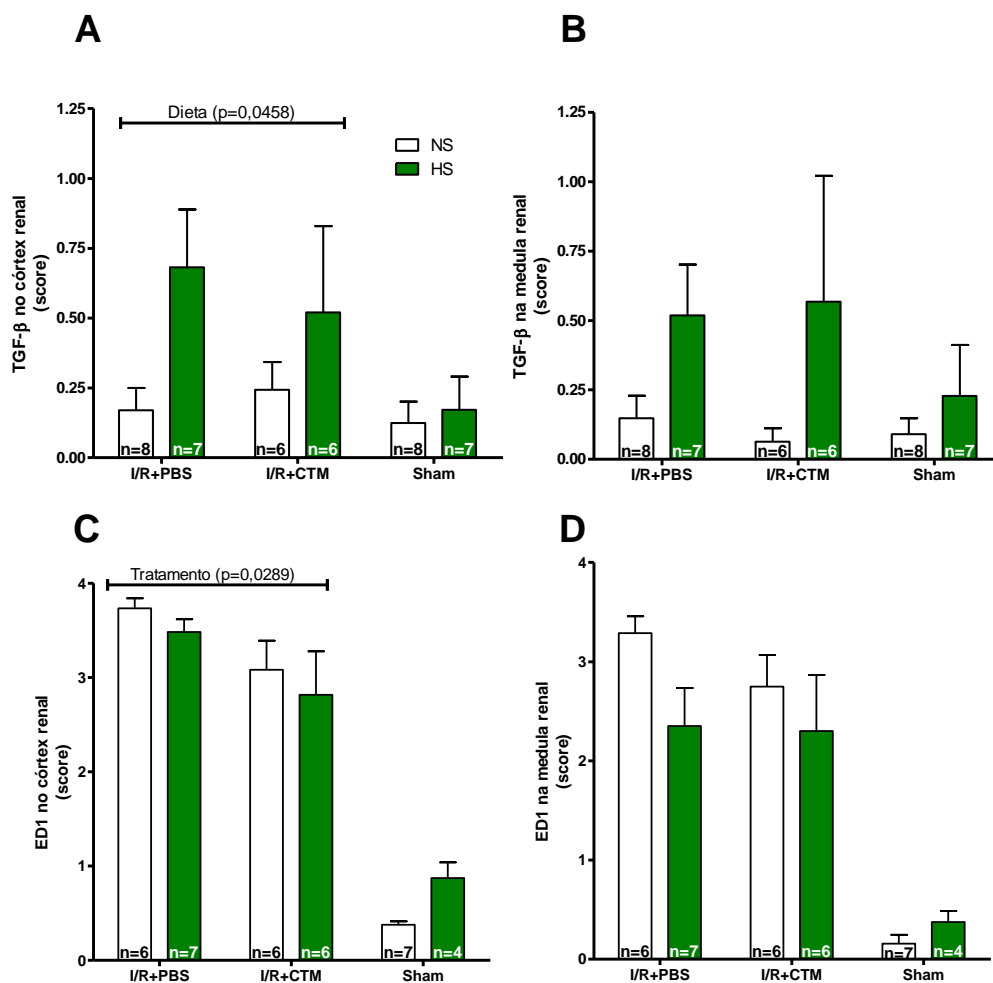
Ao final das 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R, a média das massas renais corrigidas pelo fêmur foram influenciadas pela dieta ( $p < 0,0001$ ), onde a massa renal foi maior nos animais alimentados com a dieta HS comparada com os que receberam dieta NS tanto no grupo Sham como nos grupos IR (Figura 12A). Apresentou uma interação ( $p = 0,0128$ ) na massa cardíaca onde o tratamento com CTM diminuiu nos animais tratados com a dieta HS enquanto que não alterou nos animais tratados com a dieta NS (Figura 12B).



**Figura 12. A) Média das massas dos rins corrigida pelo fêmur; B) Massa cardíaca** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t test* para o grupo Sham e *Two-way ANOVA* com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ) para os grupos I/R. \* $p < 0,05$  HS vs NS); \*\* $p < 0,01$  HS vs NS; \*\*\* $p < 0,001$  HS vs NS

Foi observada maior expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 no córtex renal dos animais que receberam a dieta HS (dieta  $p=0,0458$ ) comparado aos animais que receberam a dieta NS (Figura 13A), enquanto que não foi observada diferença significativa na região medular (Figura 13B).

O tratamento com CTM ( $p=0,0289$ ) diminuiu a expressão proteica de ED1 no córtex renal (Figura 13C) independente da dieta quando comparado ao grupo não tratado (I/R+PBS). Porém, a expressão de ED-1 na medula renal (Figura 13D) não foi diferente entre os grupos.

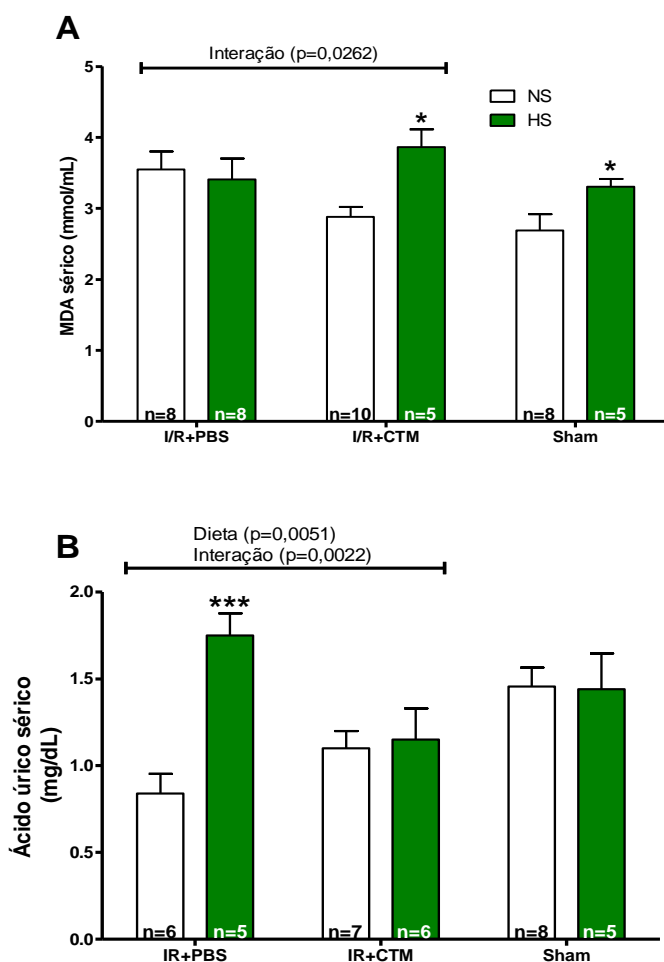


**Figura 13. A) TGF- $\beta$  no córtex renal; B) TGF- $\beta$  na medula renal; C) ED1 no córtex renal; D) ED1 na medula renal** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21<sup>a</sup> semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t* test ou *Two-way* ANOVA com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Estresse oxidativo

Nossos resultados dos perfis oxidante (malondialdeído) e antioxidante (ácido úrico) revelaram que as CTM não apresentaram efeitos benéficos na redução da oxidação celular causada pela I/R renal após 10 semanas de cirurgias (21<sup>a</sup> semana de vida dos animais). A análise do MDA sérico apresentou uma interação significativa ( $p=0,0262$ ), onde o tratamento com CTM diminuiu os níveis de MDA nos animais que receberam a dieta NS e

aumentou nos animais que receberam a dieta HS. Também se observou um aumento de MDA sérico nos animais que receberam a dieta HS no grupo Sham (Figura 14A). A interação ( $p=0,0022$ ) nos níveis séricos de ácido úrico apresenta-se de forma oposta dos níveis de MDA sérico, onde o tratamento com CTM aumentou os níveis séricos de ácido úrico nos animais que receberam dieta NS e diminuiu nos animais que receberam a dieta HS (Figura 14B).



**Figura 14. A) Malondialdeído (MDA); B) Ácido úrico sérico** 10 semanas após-cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t test* para o grupo Sham e *Two-way ANOVA* com pós teste Bonferroni ( $p<0,05$ ) para os grupos I/R. \* $p<0,05$  HS vs NS; \*\*\* $p<0,001$

## **5. DISCUSSÃO**

O presente estudo demonstrou que a ingestão crônica de sódio, em concentrações elevadas, aumenta a pressão arterial tanto em animais Sham como os que sofreram a isquemia e reperfusão renal, corroborando com os estudos anteriores (Romão et al., 2019; Katayama et al., 2014). O interessante foi o tratamento com células-tronco mesenquimais prevenir esse aumento principalmente nos animais que receberam a dieta hipersódica. Essa diminuição significativa provavelmente se deve a ação das CTM no reparo do tecido renal danificado (Shen et al., 2018) e conseqüentemente nas células endoteliais, as quais estão enfraquecidas durante a sobrecarga de sódio afetando a função das artérias de grandes e pequenos calibres (Robinson, Edwards & Farquhar, 2019).

Além do aumento da pressão arterial, a sobrecarga de sódio na dieta também aumentou o volume urinário e a ingestão de água. Foi observado em animais que uma maior ingestão de sal (cloreto de sódio) induz um aumento significativo no volume urinário devido à alta ingestão de água (Cowley et al., 1983; Eriksson, Valtone & Makela, 1984; Fitzsimons, 1963; Kanter, 1953; Denton & Tarjan, 1985; Di Salvo, 1955). Estudos relatam que a ingestão elevada de sódio suprime o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), contribuindo para a redução da reabsorção de Na<sup>+</sup>, gerando danos renais induzidos pelo alto teor de sal (Pavlov et al, 2013; Chakraborty et. Al, 2018). Assim, a reabsorção de água ocorre de forma passiva e lenta, acompanhando o sódio, contribuindo para um maior volume urinário e necessidade de ingestão hídrica.

Em nosso estudo, os animais do grupo Sham alimentados com dieta HS apresentaram maior consumo de dieta em comparação aos da dieta NS e uma das possíveis explicações é devido ao aumento do gasto energético para eliminar o excesso da ingestão de sódio contido na dieta (Coelho et al, 2006). Os animais tratados com células-tronco mesenquimais também apresentaram aumento no consumo de dietas em comparação ao grupo I/R+PBS. Porém, mais estudos serão necessários para esclarecer essa relação.

Além dos efeitos da dieta HS, a I/R também influenciou o balanço hídrico e de sódio, que apresentou maiores valores de excreção e ingestão hídrica, e estes, por sua vez, foram atenuados pelas CTM. A IRA isquêmica, leve a moderada, pode levar ao aumento do fluxo urinário e diminuição da capacidade de concentrar a urina (Kwon et al. 2013). Em 1999, um estudo experimental demonstrou a diminuição dos canais de transporte de aquaporina 2 e 3, bem como dos cotransportadores de Na, K e Cl (NKCC2) no ducto coletor 72 horas após a realização de uninefrectomia do rim direito e I/R renal esquerdo, sugerindo assim que o aumento do volume urinário está associado à perda desses transportadores (Fernández-Llama et al.,1999).

No presente estudo, foi observado que a FeNa aumenta após ingestão elevada de sódio ou durante a reperusão renal após isquemia. Esse resultado está de acordo com o estudo de Teixeira e colaboradores que demonstraram em camundongos BALB/c (resistentes ao sal) alimentados com dieta hipersódica a 8,0% NaCl por 7 dias, uma correlação positiva entre ingestão de sobrecarga de sódio e excreção urinária de sódio com diminuição concomitante dos transportadores corticais de sódio, Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup>-ATPase e



NHE3, e aumento da FeNa. Também mostrou uma associação entre ingestão excessiva de sódio com o desenvolvimento de lesão renal e proteinúria. Portanto, as evidências apresentadas são de que a ingestão de sódio em excesso pode ser responsável por elevar a fração de excreção do íon  $\text{Na}^+$  dos animais. Esses achados também foram relatados em ratos Sprague-Dawley resistentes ao sal que, quando alimentados com a dieta HS por 7 dias, mostraram inibição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e da reabsorção de sódio nos túbulos proximais (Liu J et al., 2011). Possivelmente, as CTM derivadas do tecido adiposo também são capazes de estimular a expressão do gene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, o que leva à melhora da função renal. Em 2020, Changizi-Ashtiyani e colaboradores demonstraram que após 48 horas de I/R renal de 45 min, houve aumento da FeNa, creatinina e ureia séricas, e diminuição do clearance de creatinina em ratos Wistar não tratados com CTM, mas apresentaram melhora nesses parâmetros aqueles que receberam injeção de CTM no momento da I/R.

Proteinúria aumentada pode ser um marcador de filtração renal comprometida. Zhang e colaboradores demonstraram que duas e três semanas após I/R renal bilateral de 40min, ratos isquêmicos apresentavam nível elevado de proteína urinária total, enquanto animais isquêmicos tratados com as CTM tiveram uma redução significativa do parâmetro quando comparados aos não tratados, chegando a níveis semelhantes ao grupo Sham. No presente estudo, a proteinúria dos animais não mostrou diferença entre os grupos, assim como os resultados de ureia e creatinina sérica, o que nos leva a crer que houve um reestabelecimento da função renal. O clearance

de creatinina foi maior no grupo tratado com CTM independente da dieta, revelando uma melhora ainda maior da função renal provavelmente devido aos efeitos anti-inflamatórios e antiapoptóticos característicos das CTM (Zhang et al., 2017; Zhu, Lerman & Lerman, 2013).

A reoxigenação após hipóxia no I/R, induz ao aumento de espécies reativas de oxigênio (Bonventre & Weinberg, 2003), que pode levar a danos nos tecidos (Friedewald & Rabb, 2004; Kieran & Rabb, 2004) e possível recuperação renal incompleta de IRA, levando posteriormente ao desenvolvimento de doença renal crônica (DRC). Após I/R, estudos têm mostrado que a terapia com as CTM auxilia na melhora da função renal, e um dos mecanismos é a redução do estresse oxidativo (Chen et. al., 2011). Curiosamente, os resultados do perfil oxidante e antioxidante revelaram que as CTM induziram ao aumento do stress oxidativo, principalmente nos animais que receberam a dieta HS.

Sabe-se que as manifestações da IRA incluem dano epitelial tubular agudo (Thadhani, Pascual & Bonventre, 1996), inflamação, apoptose, necrose e liberação de espécies reativas de oxigênio (Rovcanin et al., 2016; Chen et. al., 2011). Para compreender as consequências da CTM como tratamento para lesão renal induzida por I/R, foram analisados cortes histológicos e avaliadas as expressões proteicas de TGF- $\beta$ 1 e ED1 nas regiões cortical e medular. Nossos resultados mostraram maior score de citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 na região cortical dos grupos HS após 10 semanas das cirurgias Sham ou I/R (21<sup>a</sup> semana de vida dos animais). Teixeira et al. demonstrou que a dieta HS induziu a lesão tubulointersticial em camundongos BALB/c

medida por um aumento na deposição de colágeno, espaço intersticial e atividade  $\gamma$ -GT, um marcador de lesão tubular em animais. Além disso, a lesão tubulointersticial foi associada a fatores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, como aumento de IL-6, -17, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ .

O score ED-1, marcador de inflamação renal associado aos monócitos/macrófagos, diminuiu no córtex renal com o tratamento de CTM independente da dieta. Por outro lado, na medula renal não houve diferença de TGF- $\beta$ 1 e ED1 entre as dietas e o tratamento com CTM. Estudos experimentais têm mostrado que o tratamento da injúria renal aguda com CTM, derivadas das células do tecido adiposo, diminui a expressão de citocinas e quimiocinas, stress oxidativo, e creatinina sérica, reduzindo a necrose tubular aguda e a infiltração de macrófagos intersticiais no rim isquemiado (Furuichi et al.,2012; Chen et al., 2011; Shih et al, 2013). Entretanto, os dados do presente estudo mostraram que o tratamento com as CTM foi capaz de diminuir apenas a expressão proteica de ED-1 renal, atenuando parcialmente a fibrose renal e inflamação induzida pela ingestão elevada de sal e I/R renal.

Os animais que receberam sobrecarga de sódio na dieta apresentaram aumento da massa renal, relatando dessa forma alguma hipertrofia no órgão. Koletsky relatou em seu estudo experimental que após 6 a 12 meses de ingestão de solução salina a 1%, os ratos apresentaram hipertensão crônica, aumento do coração e nefroesclerose. Além disso, em nosso estudo a associação do consumo crônico de dieta hipersódica com I/R renal contribuiu para o aumento da massa cardíaca, entretanto esse aumento não foi

observado no grupo tratado com CTM. O rim e o coração têm relações fisiológicas e compartilham várias funções para manter a homeostase (Di Lullo et al., 2017). Recentemente, sabe-se que a isquemia, a infecção e o meio urêmico estimulam vários componentes inflamatórios no rim e no coração (Ryšavá et al., 2007; Kingma et al., 2017). Portanto, a inflamação mediada por múltiplos fatores (citocinas, sistema complemento, e outros) pode estar ligada ao aumento do risco cardiovascular e doença renal (Panico et al., 2019). Um estudo de Trentin-Sonoda et al. mostraram a participação de citocinas na hipertrofia cardíaca após I/R renal em camundongos. Evidências sugerem uma associação entre alterações nos componentes do sistema renina-angiotensina, níveis de angiotensina II (Goldsmith, 1999) e citocinas (Chaar et al., 2015), com aumento da massa cardíaca e remodelação cardíaca deletério (Crowley et al., 2006; Kumar et al., 2009; Silva JR et al., 2017).

O presente estudo, demonstrou que as células tronco mesenquimais são capazes de prevenir a disfunção renal causada pela injúria renal aguda através do aumento do clearance de creatinina, diminuição da pressão arterial e inflamação renal num ambiente de sobrecarga elevada de sódio. Entretanto, foi observado um aumento do stress oxidativo.

## **6. CONCLUSÃO**

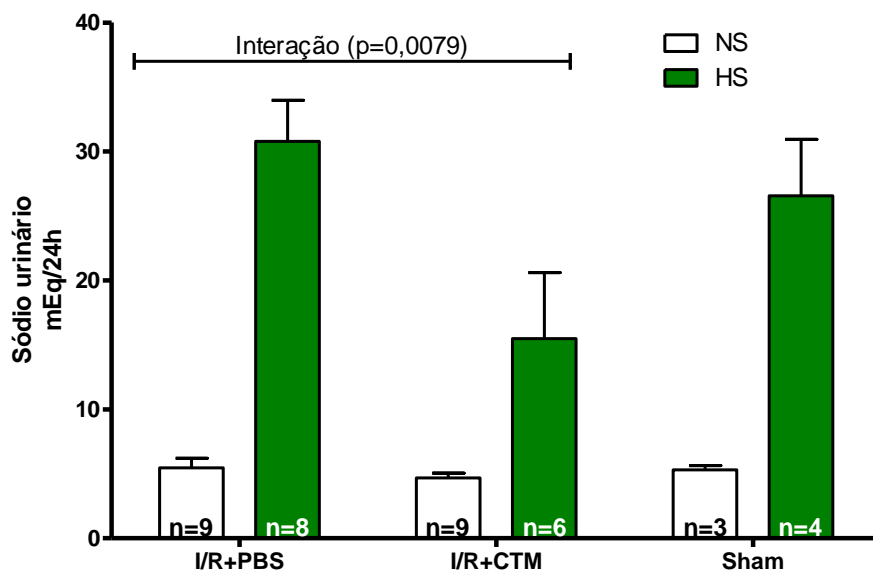
---

1. A sobrecarga de 8,0% de cloreto de sódio na dieta causou a evolução da IRA após 10 semanas de isquemia e reperfusão renal bilateral. Entretanto, o tratamento com as CTM atenuou os efeitos da IRA e preveniu a evolução da doença renal.

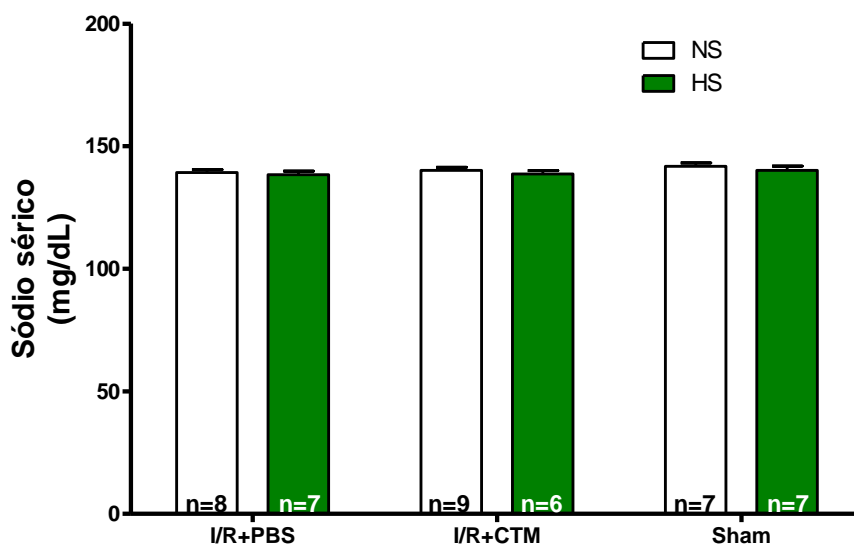
2. As células tronco mesenquimais associadas à dieta rica em sódio induziu ao aumento do estresse oxidativo. Estudos posteriores serão necessários para compreender a relação do aumento do estresse oxidativo, sobrecarga de sódio crônico e injúria renal aguda.

## 7. ANEXOS

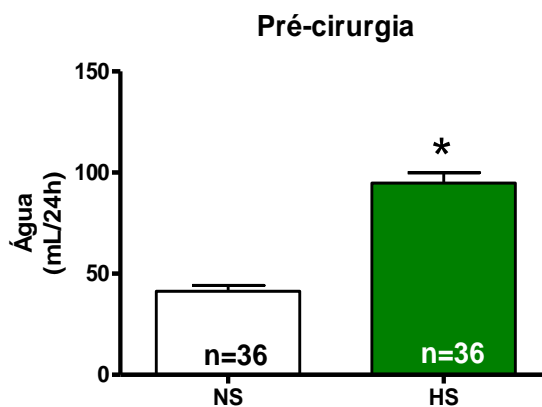
**Anexo 1. Sódio urinário (mEq/24h)** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t test* para o grupo Sham e *Two-way ANOVA* com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ) para os grupos I/R.



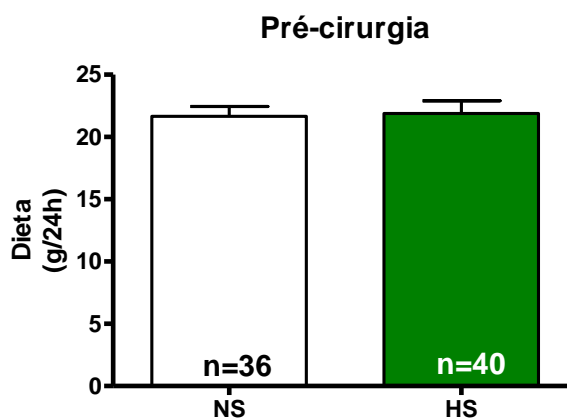
**Anexo 2. Sódio sérico (mg/dL)** 10 semanas após cirurgias Sham ou I/R (21ª semana de vida dos animais). Ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) submetidos à cirurgia fictícia – Sham; ou isquemia/reperfusão e veículo – I/R+PBS; ou isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais – I/R+CTM. Resultados avaliados por *t test* para o grupo Sham e *Two-way ANOVA* com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ) para os grupos I/R.



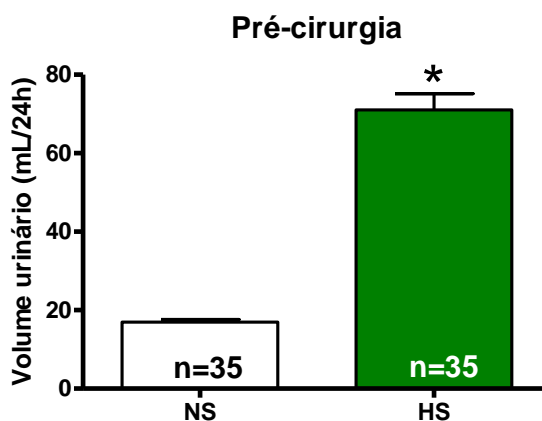
**Anexo 3. Consumo de água (mL/24h)** no período pré-cirurgias dos animais que receberam dieta normossódica - NS ou hipersódica – HS. Resultados avaliados por *t test*.



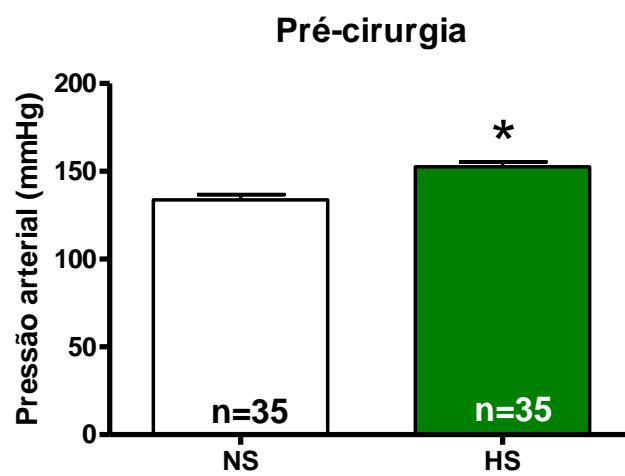
**Anexo 4. Consumo de dieta (g/24h)** no período pré-cirurgias dos animais que receberam dieta normossódica - NS ou hipersódica – HS. Resultados avaliados por *t test*.



**Anexo 5. Volume urinário (mL/24h)** no período pré-cirurgias dos animais que receberam dieta normossódica - NS ou hipersódica – HS. Resultados avaliados por *t test*.



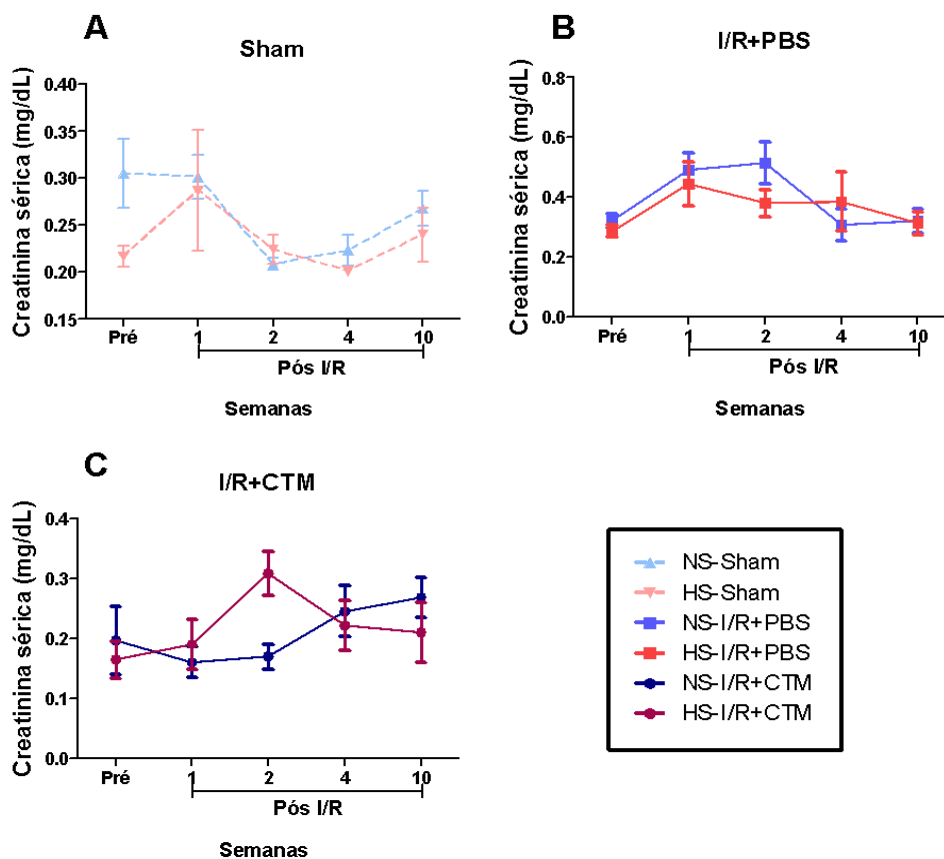
**Anexo 6. Pressão arterial (mmHg)** no período pré-cirurgias dos animais que receberam dieta normossódica - NS ou hipersódica – HS. Resultados avaliados por *t test*.





**Anexo 7. Creatinina sérica (mg/dL)** ao longo do estudo dos animais que receberam dieta normossódica - NS ou hipersódica – HS, submetidos à **A)** Cirurgia fictícia - Sham; **B)** Isquemia/reperfusão e veículo - I/R+PBS; **C)** Isquemia/reperfusão e tratamento com células-tronco mesenquimais - I/R+CTM. Resultados avaliados por *Two-way* ANOVA com pós teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

### Creatinina sérica



### Anexo 8. Método de coleta de sangue para análise pré-cirurgias

A coleta de sangue dos animais foi realizada após 10 semanas de I/R (21ª semana de vida) através de punção da veia caudal dos animais pré-aquecidos durante 10 a 15 minutos a 40°C. As obtenções de plasma e soro foram efetuadas utilizando tubos com EDTA pH 5,0 a 3,8% e tubo seco, respectivamente. Em seguida, os recipientes foram mantidos em gelo e centrifugados a 4°C, 3000 rpm por 15 minutos. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

## **8. REFERÊNCIAS**

Alan SL, Chertow GM, Luyckx V, Marsden PA, Skorecki K, Taal MW. Brenner and Rector's The Kidney E-Book. Elsevier Health Sciences; 2015 Oct 25.

Barnes CJ, Distaso CT, Spitz KM, Verdun VA, Haramati A. Comparison of stem cell therapies for acute kidney injury. *American Journal of Stem Cells*. 2016;5(1):1.

Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 Jun 1;14(suppl 1):S55-61.

Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 Aug 1;14(8):2199-210.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Nov 1;121(11):4210-21.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: hipertensão arterial sistêmica. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 128 p

Chaar LJ, Alves TP, Batista Junior AM, Michelini LC. Early training-induced reduction of angiotensinogen in autonomic areas—the main effect of exercise on brain renin-angiotensin system in hypertensive rats. *PLoS One*. 2015 Sep 15;10(9):e0137395.

Chakraborty S, Galla S, Cheng X, Yeo JY, Mell B, Singh V, Yeoh B, Saha P, Mathew AV, Vijay-Kumar M, Joe B. Salt-responsive metabolite,  $\beta$ -hydroxybutyrate, attenuates hypertension. *Cell reports*. 2018 Oct 16;25(3):677-89.

Changizi-Ashtiyani S, Hafazeh L, Ghasemi F, Najafi H, Babaei S, JalallyMashayekhi F, Hoseini SJ, Bastani B. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on renal function and histopathology in a rat model of ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2020 Aug;23(8):999.

Charles LE, Hong L, Robert WS. The nature of renal cell injury. *Kidney International*. 1997;51(5):1341-51.

Chen YT, Sun CK, Lin YC, Chang LT, Chen YL, Tsai TH, Chung SY, Chua S, Kao YH, Yen CH, Shao PL. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *Journal of translational medicine*. 2011 Dec;9:1-7.

Coêlho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, Bibancos T, Prada PO, Furukawa LL, Furukawa LN, Fukui RT, Casarini DE, Saad MJ, Luz J. High-or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on body weight, food intake and energy balance in rats. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*. 2006 Mar 1;16(2):148-55.

Cowley Jr AW, Skelton MM, Merrill DC, Quillen Jr EW, Switzer SJ. Influence of daily sodium intake on vasopressin secretion and drinking in dogs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1983 Dec 1;245(6):R860-72.

Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Nov 21;103(47):17985-90.

Denton DA, Nelson JF, Tarjan E. Water and salt intake of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus* (L)) following dipsogenic stimuli. *The Journal of Physiology*. 1985 May 1;362(1):285-301.

Di Lullo L, Bellasi A, Barbera V, Russo D, Russo L, Di Iorio B, Cozzolino M, Ronco C. Pathophysiology of the cardio-renal syndromes types 1–5: An update. *Indian heart journal*. 2017 Mar 1;69(2):255-65.

Di Salvo NA. Factors which alter drinking responses of dogs to intravenous injections of hypertonic sodium chloride solutions. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1954 Dec 31;180(1):139-45.

Eriksson L, Valtonen M, Mäkelä J. Water and electrolyte balance in male mink (*Mustela vison*) on varying dietary NaCl intake. *Acta physiologica scandinavica. Supplementum*. 1984 Jan 1;537:59-64.

Fernandez-Llama P, Andrews P, Turner R, Saggi S, Dimari J, Kwon TH, Nielsen S, Safirstein R, Knepper MA. Decreased abundance of collecting duct aquaporins in post-ischemic renal failure in rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999 Aug 1;10(8):1658-68.

Fitzsimons JT. The effects of slow infusions of hypertonic solutions on drinking and drinking thresholds in rats. *The Journal of Physiology*. 1963 Jul;167(2):344.

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. *Clinical and experimental nephrology*. 2012 Oct;16:679-89.

Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney international*. 2004 Aug 1;66(2):486-91.

Goldsmith SR. Angiotensin II and sympathoactivation in heart failure. *Journal of cardiac failure*. 1999 Jun 1;5(2):139-45.

Havakhah S, Sankian M, Kazemzadeh GH, Sadri K, Bidkhorri HR, Naderi-Meshkin H, Bideskan AE, Niazmand S, Bahrami AR, Rad AK. In vivo effects of allogeneic mesenchymal stem cells in a rat model of acute ischemic kidney injury. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2018 Aug;21(8):824.

Hertzberg D, Rydén L, Pickering JW, Sartipy U, Holzmann MJ. Acute kidney injury—an overview of diagnostic methods and clinical management. *Clinical kidney journal*. 2017 Jun 1;10(3):323-31.

Kanter GS. Excretion and drinking after salt loading in dogs. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1953 Jul 1;174(1):87-94.

Katayama IA, Pereira RC, Dopona EP, Shimizu MH, Furukawa LN, Oliveira IB, Heimann JC. High-salt intake induces cardiomyocyte hypertrophy in rats in response to local angiotensin II type 1 receptor activation. *The Journal of Nutrition*. 2014 Oct 1;144(10):1571-8.

KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*. 2013;3(1).

Kieran NE, Rabb H. Immune responses in kidney preservation and reperfusion injury. *Journal of investigative medicine*. 2004 Jul;52(5):310-4.

Kingma JG, Simard D, Rouleau JR, Drolet B, Simard C. The pathophysiology of cardiorenal syndrome: a review of the potential contributions of inflammation. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2017 Nov 29;4(4):21.

Koletsky S. Role of salt and renal mass in experimental hypertension. *Arch. Pathol.*. 1959;68:11-22.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Current hypertension reports*. 2009 Apr 1;11(2):104.

Kwon TH, Frøkiær J, Nielsen S. Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis. *Kidney research and clinical practice*. 2013 Sep 1;32(3):96-102.

Le Dorze M, Legrand M, Payen D, Ince C. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Current opinion in critical care*. 2009 Dec 1;15(6):503-8.

Liu J, Yan Y, Liu L, Xie Z, Malhotra D, Joe B, Shapiro JI. Impairment of Na/K-ATPase signaling in renal proximal tubule contributes to Dahl salt-sensitive hypertension. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jul 1;286(26):22806-13.

Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2014 Jun;32(6):1408-19.

Makris K, Spanou L. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. *The clinical biochemist reviews*. 2016 May;37(2):85.

Molitoris BA, Marris J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure 1 2. *The American journal of medicine*. 1999 May 1;106(5):583-92.

Neshati V, Mollazadeh S, Fazly Bazzaz BS, Iranshahi M, Mojarrad M, Naderi-Meshkin H, Kerachian MA. Cardiogenic effects of characterized *Geum urbanum* extracts on adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Biochemistry and Cell Biology*. 2018;96(5):610-8.

Panico K, Abrahão MV, Trentin-Sonoda M, Muzi-Filho H, Vieyra A, Carneiro-Ramos MS. Cardiac inflammation after ischemia-reperfusion of the kidney: role of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system. *Cell Physiol Biochem*. 2019 Jan 1;53(4):587-605.

Pavlov TS, Levchenko V, O'Connor PM, Ilatovskaya DV, Palygin O, Mori T, Mattson DL, Sorokin A, Lombard JH, Cowley AW, Staruschenko A. Deficiency of renal cortical EGF increases ENaC activity and contributes to salt-sensitive hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013 Jul 1;24(7):1053-62.

Pechman KR, De Miguel C, Lund H, Leonard EC, Basile DP, Mattson DL. Recovery from renal ischemia-reperfusion injury is associated with altered renal hemodynamics, blunted pressure natriuresis, and sodium-sensitive hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2009 Nov;297(5):R1358-63.

Raup-Konsavage WM, Wang Y, Wang WW, Feliars D, Ruan H, Reeves WB. Neutrophil peptidyl arginine deiminase-4 has a pivotal role in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Kidney international*. 2018 Feb 1;93(2):365-74.

Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury—epidemiology, outcomes and economics. *Nature reviews nephrology*. 2014 Apr;10(4):193-207.

Robinson AT, Edwards DG, Farquhar WB. The influence of dietary salt beyond blood pressure. *Current hypertension reports*. 2019 Jun;21:1-1.

Romao CM, Pereira RC, Shimizu MH, Furukawa LN. N-acetyl-l-cysteine exacerbates kidney dysfunction caused by a chronic high-sodium diet in renal ischemia and reperfusion rats. *Life sciences*. 2019 Aug 15;231:116544.

Rovcanin B, Medic B, Kocic G, Cebovic T, Ristic M, Prostran M. Molecular dissection of renal ischemia-reperfusion: oxidative stress and cellular events. *Current medicinal chemistry*. 2016 Jun 1;23(19):1965-80.

Ryšavá R, Kalousová M, Zima T, Dostál C, Merta M, Tesař V. Does renal function influence plasma levels of advanced glycation and oxidation protein products in patients with chronic rheumatic diseases complicated by secondary amyloidosis?. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2007;30(1):1-7.

Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER, Simons-Morton DG, Karanja N. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *New England journal of medicine*. 2001 Jan 4;344(1):3-10.

Selby NM, Fluck RJ, Kolhe NV, Taal MW. International criteria for acute kidney injury: advantages and remaining challenges. *PLoS medicine*. 2016 Sep 13;13(9):e1002122.

Shen WC, Chou YH, Huang HP, Sheen JF, Hung SC, Chen HF. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells attenuate ischemic acute kidney injury and cardiac dysfunction. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018 Dec;9(1):1-2.

Silva Jr SD, Jara ZP, Peres R, Lima LS, Scavone C, Montezano AC, Touyz RM, Casarini DE, Michelini LC. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. *PloS one*. 2017 Dec 12;12(12):e0189535.

Spurgeon-Pechman KR, Donohoe DL, Mattson DL, Lund H, James L, Basile DP. Recovery from acute renal failure predisposes hypertension and secondary renal disease in response to elevated sodium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2007 Jul;293(1):F269-78.

Stringheta, PC et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

Teixeira DE, Peruchetti DB, Souza MC, das Graças Henriques MG, Pinheiro AA, Caruso-Neves C. A high salt diet induces tubular damage associated with a pro-inflammatory and pro-fibrotic response in a hypertension-independent manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2020 Nov 1;1866(11):165907.

Thadhani R, Pascual M, Bonventre J. Medical progress: acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996;334:1448-60.

Trentin-Sonoda M, da Silva RC, Kmit FV, Abrahao MV, Monnerat Cahli G, Brasil GV, Muzi-Filho H, Silva PA, Tovar-Moll FF, Vieyra A, Medei E. Knockout of toll-like receptors 2 and 4 prevents renal ischemia-reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice. *PloS one*. 2015 Oct 8;10(10):e0139350.

Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013 Jun;34(6):747-54.

Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia: contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, and p300/CBP. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Apr 20;276(16):12645-53.

Zago MA, & Covas DT (Ed.). *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. Atheneu, 2006.

Zhang JB, Wang XQ, Lu GL, Huang HS, Xu SY. Adipose-derived mesenchymal stem cells therapy for acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in a rat model. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2017 Dec;44(12):1232-40.

Zhu XY, Lerman A, Lerman LO. Concise review: mesenchymal stem cell treatment for ischemic kidney disease. *Stem cells*. 2013 Sep;31(9):1731-6.

Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury. *Annual review of medicine*. 2016 Jan 14;67:293-307.